



HAL
open science

Signature calcique de la synapse immunologique en presence de l'axe PD-1/PD-L1 dans les leucemies aiguës myeloïdes

Clara Lewuillon

► **To cite this version:**

Clara Lewuillon. Signature calcique de la synapse immunologique en presence de l'axe PD-1/PD-L1 dans les leucemies aiguës myeloïdes. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS017 . tel-04474969

HAL Id: tel-04474969

<https://theses.hal.science/tel-04474969>

Submitted on 23 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LILLE

École doctorale de Biologie Santé de Lille

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
**DOCTEUR DE BIOLOGIE – SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTÉ DE
L'UNIVERSITÉ DE LILLE**

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Signature calcique de la synapse immunologique en présence de l'axe PD-1/PD-L1 dans les leucémies aiguës myéloïdes

Présentée et soutenue publiquement par

Clara LEWUILLON

Le 4 avril 2023

COMPOSITION DU JURY

Pr Salomon MANIER *Président de jury*
Directeur d'équipe Canther, PU-PH CHRU de Lille
Service des Maladies du Sang

Dr Virginie LACRONIQUE-PENARD *Rapporteur*
Directrice de recherche, Inserm 1170, Institut Gustave Roussy

Pr Halima OUADID-AHIDOUCH *Rapporteur*
PU, LPCM UR-Université Picardie Jules Verne 4667

Dr Loïc LEMONNIER *Examineur*
CRCN, Phycell, Inserm U1003

Pr Loïc GARÇON *Examineur*
PU-PH hématologue CHU Amiens-Picardie

Dr Yasmine TOUIL *Directrice de thèse*
Ingénieure de recherche, Canther, Université de Lille

MEMBRES INVITÉS

Pr Dominique COLLARD
Directeur de recherche SMMiL-E, Lille et
LIMMS/CNRS-IIS, Université de Tokyo

Dr Mehmet Çagatay TARHAN
Associate professor, Groupe Systèmes
numériques et sciences de la vie, Junia,
Lille, France
Groupe BioMEMS, IEMN, Lille, France

Travail réalisé au sein du laboratoire CANTHER - "CANcer heterogeneity, plasticity and resistance to THERapies" UMR-S 1277 INSERM - UMR 9020 CNRS, ONCOLille

Équipe : *Facteurs de persistance des cellules leucémiques*

*Les sanglots longs des violons de l'automne
Blessent mon cœur d'une langueur monotone.*

*Tout suffocant et blême, quand sonne l'heure,
Je me souviens des jours anciens et je pleure.*

Paul Verlaine, Chanson d'automne

À mon père

**Signature calcique de la synapse immunologique
en présence de l'axe PD-1/PD-L1 dans les
leucémies aiguës myéloïdes**

RÉSUMÉ

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une maladie du sang causée par une accumulation de cellules immatures appelées cellules leucémiques (CL). Les thérapies conventionnelles comme les chimiothérapies ne permettent pas l'élimination de toutes les CL et leur persistance est appelée maladie minimale résiduelle (MRD). Cette MRD cause la rechute après traitement dans plus de 50% des cas dans un délai de 2 mois à 5 ans malgré le fait que le système immunitaire (SI) adaptatif, et les lymphocytes T (LT) en particulier, participe à l'élimination ou à la dormance/MRD (quiescence, contrôle de la croissance) des CL selon leurs propriétés intrinsèques (expression de certains récepteurs, statut prolifératif). Cela peut être dû à la persistance de cellules souches quiescentes et/ou CL pouvant présenter des mécanismes immunosuppresseurs tels que la signalisation PD-1/PD-L1 aboutissant à une dysfonction du SI *via* l'inhibition de l'activité des LT.

La signalisation calcique et le facteur de transcription NFAT associé gouvernent de nombreuses fonctions cellulaires et moléculaires et peuvent déterminer le devenir de la cellule tumorale : prolifération, apoptose, quiescence et immunoéchappement. Ces signaux calciques sont toutefois peu élucidés et ce qui peut réguler la résistance innée des cellules tumorales contre les LT n'est toujours pas connu à ce jour. Identifier les phénotypes responsables de cette résistance est essentiel dans la compréhension des mécanismes d'immunoéchappement comme la quiescence et l'expression de PD-L1.

Pour cela, la signalisation calcique de lignées cellulaires de LAM et de patients atteints de LAM au diagnostic a été étudiée et a montré une spécificité de signature en fonction (i) du statut de différenciation, (ii) de la quiescence, (iii) de l'activité ABCB1 et de la sous-population cellules souches leucémiques (CSL).

Il est également primordial de mieux comprendre le dialogue bilatéral entre les cellules du SI adaptatif et les CL afin de prévenir les rechutes chez les patients. La signature calcique de LT et CL de patients LAM a été étudiée en fonction de leur phénotype lors de la formation de la synapse immunologique afin de mettre en évidence une potentielle spécificité dépendante des propriétés intrinsèques des CSL et/ou des propriétés des LT.

Cette signalisation calcique a également été étudiée dans des conditions de modulation à l'aide (i) d'un inhibiteur des voies calciques et (ii) d'un traitement chimiothérapeutique afin d'apporter une meilleure compréhension de ces mécanismes régulateurs et de résistance des cellules persistantes.

L'étude de la signalisation calcique des CL et l'utilisation de la technologie microfluidique afin d'étudier la réponse calcique de différentes synapses immunologiques en fonction des

phénotypes des CL et LT à l'échelle de la cellule unique nous permet de mettre en évidence (i) l'implication des canaux SOCs dans la réponse calcique des CL et LT de patients LAM, (ii) une signature calcique liée à une synapse immunologique spécifique formée en fonction des sous-populations de CL et LT et (iii) une modulation de cette signature calcique des sous-populations et de leurs synapses immunologiques formées suite à un traitement avec un inhibiteur des canaux SOCs ou un traitement chimiothérapeutique.

Ce projet multidisciplinaire pourrait donc, à terme, apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes qui contrôlent l'échappement des CL et la MRD dans les LAM (quiescence des CSL, dormance immunologique *via* l'axe PD-1/PD-L1). Ces nouvelles connaissances pourraient offrir de nouvelles perspectives d'immunothérapies ou d'optimisation de protocoles de chimiothérapies et d'immunothérapies actuellement utilisés en clinique en proposant (i) de nouveaux traitements combinant le ciblage des canaux calciques aux thérapies conventionnelles et/ou (ii) une immunothérapie de précision.

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a blood disease caused by an accumulation of immature cells called leukemic cells (LCs). Conventional therapies such as chemotherapy do not eliminate all of the LCs and their persistence is called minimal residual disease (MRD). This MRD causes relapse after treatment in more than 50% of cases within 2 months to 5 years despite the fact that the adaptive immune system (IS), and T lymphocytes in particular, participates in the elimination or dormancy/MRD (quiescence, growth control) of LCs depending on their intrinsic properties (expression of certain receptors, proliferative status). This may be due to the persistence of quiescent stem cells and/or LCs that may exhibit immunosuppressive mechanisms such as the PD-1/PD-L1 signaling leading to IS dysfunction through the inhibition of T lymphocyte activity.

Calcium signaling and the associated transcription factor NFAT govern many cellular and molecular functions and may determine tumor cell fate: proliferation, apoptosis, quiescence and immune escape. These calcium signals are, however, poorly elucidated and what may regulate the innate resistance of tumor cells against T lymphocytes is still not known to date. Identifying the phenotypes responsible for this resistance is essential in understanding immune escape mechanisms such as quiescence and PD-L1 expression.

For this purpose, calcium signaling of AML cell lines and AML patients at diagnosis was studied and showed a signature specificity according to (i) differentiation status, (ii) quiescence, (iii) ABCB1 activity and leukemic stem cell (LSC) subpopulation.

A better understanding of the two-way dialogue between adaptive IS cells and LCs is also crucial to prevent relapse in patients. The calcium signature of T lymphocytes and LCs from AML patients was studied according to their phenotype during the formation of the immunological synapse in order to highlight a potential specificity depending on the intrinsic properties of the LSC and/or the properties of the T lymphocytes.

This calcium signaling was also studied under conditions of modulation with (i) a calcium pathway inhibitor and (ii) a chemotherapeutic treatment in order to provide a better understanding of these regulatory and resistance mechanisms of persistent cells.

The study of LCs' calcium signaling and the use of microfluidic technology to study the calcium response of different immunological synapses according to LCs and T lymphocytes phenotypes at the single cell level allows us to demonstrate (i) the involvement of SOC channels in the calcium response of AML LCs and T lymphocytes, (ii) a calcium signature linked to a specific immunological synapse formed according to the LCs and T lymphocytes subpopulations and (iii) a modulation of the subpopulations' calcium signature and

immunological synapses formed following a treatment with an inhibitor of the SOC channels or a chemotherapeutic treatment.

This multidisciplinary project could therefore ultimately provide new insights into the mechanisms controlling LCs escape and MRD in AML (LSC quiescence, immunological dormancy *via* the PD-1/PD-L1 axis). This knowledge could offer new perspectives for immunotherapies or optimization of chemotherapy and immunotherapy protocols currently used in the clinic by proposing (i) new treatments combining calcium channel targeting with conventional therapies and/or (ii) precision immunotherapy.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Dr Yasmine Touil. Je la remercie pour tout ce qu'elle m'a appris, sa bienveillance, sa patience, sa disponibilité et sa gentillesse. J'ai du mal à penser qu'une thèse aurait pu mieux se passer que la mienne et c'est en grande partie grâce à elle. J'ai pu développer énormément de techniques scientifiques et être impliquée dans de très beaux projets. Je la remercie pour sa confiance pendant ces cinq années et également de m'avoir permis d'accumuler ce bagage scientifique pour l'avenir.

Je remercie également l'École Doctorale de Biologie Santé de Lille et tout particulièrement François Delcroix et Marjorie Vandenhove pour leur professionnalisme et leur disponibilité. Aucun secrétariat ne peut se vanter d'être aussi efficace et réactif que celui-ci et c'est un vrai soulagement que d'avoir une école doctorale qui prend vraiment à cœur d'aider ses doctorants.

La Région a financé mes 3 années de travail ainsi que ces 6 mois supplémentaires suite à la crise du Covid. Leur implication et intérêt pour la recherche scientifique m'a permis de mener à terme mes projets de recherche et je les en remercie.

Je remercie le Pr Salomon Manier d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance de thèse et d'avoir pris le relais du Pr Bruno Quesnel pour diriger l'équipe.

Merci au Dr Virginie Lacronique-Penard d'avoir assisté à tous mes CSI et pour sa bienveillance pendant ceux-ci. Je la remercie également, de même que le Pr Halima Ouadid-Ahidouch, d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit et d'avoir accepté d'être mes rapporteurs.

Enfin, merci au Pr Loïc Garçon d'avoir accepté d'être examinateur.

Pour le Dr Loïc Lemonnier, tout d'abord merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance de thèse, mais encore plus pour ton soutien tout au long de ces années. Ta patience, ton calme et ton humour ont toujours été appréciés durant ces longues journées d'imagerie calcique passées dans le noir en discutant de tout et de rien en espérant voir une réponse calcique.

Un grand merci à Mehmet Çagatay Tarhan et Faruk Azam Shaik, membres de l'équipe collaboratrice du SMMiL-E. Merci pour leur patience et surtout leur calme, que ce soit face à nos nombreuses demandes de confections de dispositifs ou bien face aux cellules que nous donnions qui ne voulaient tout simplement pas coopérer pendant les expérimentations. Merci au Pr Dominique Collard pour sa gentillesse, son intérêt pour mon projet de thèse ainsi que pour ses conseils.

Merci au Pr Bruno Quesnel de m'avoir accueillie au sein de son équipe l'UMR S-1172 et merci à l'IRCL et notamment Micheline, Matthias, Corinne et Michel qui ont toujours su être là pour résoudre les problèmes quels qu'ils soient.

Je tiens à remercier les plateformes techniques qui m'ont aidée dans mon projet et tout particulièrement la plateforme de cytométrie en flux. Un grand merci à Nathalie et Émilie qui ont tout simplement subi un harcèlement constant de ma part que ce soit pour un problème technique sur le cytomètre (cette machine ne m'aimait pas...), un problème de compensation sur FlowJo ou des questions sur la mise au point d'un énième protocole avec le maximum de fluorochromes possible.

D'un côté plus personnel je souhaite remercier Aurélie, Sofia et Quentin pour leur soutien et leur bonne humeur. Merci à vous d'avoir animé les pauses repas de toutes vos histoires et toutes ces discussions qui portaient dans tous les sens. Ces discussions allaient principalement dans le sens de la nourriture, qui aura été notre moteur fondamental durant ces années passées ensemble et je vous remercie aussi pour ça. Aurélie et Sofia merci d'avoir été auprès de moi pour toutes ces expérimentations et pour avoir rendu les moments passés au labo plus agréables, ça n'aurait pas été la même chose sans vous.

À mon binôme de thèse, Meriem, merci tout simplement d'avoir été là et pour ton soutien. Tes paroles rassurantes ont toujours su me remotiver et ça n'aurait pas été pareil sans toi pour calmer mes périodes de stress. Ton calme est inspirant et rassurant, sauf quand il vacille face la question « Mais sinon, tu veux faire quoi plus tard ? » qui nous a rendues malades toutes les deux.

Le plus grand des mercis va évidemment à ma famille. Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir et surtout me supporter. Merci à ma grand-mère qui n'a probablement toujours pas compris ce que j'étudie mais qui me soutient tant que je continue à bien manger (et c'est le

cas). Merci à ma mère et ma sœur pour avoir toujours été là dans toutes les circonstances, heureuses comme malheureuses, sans jamais faillir et pour n'avoir jamais douté de moi. Merci d'avoir fait de la maison un havre de paix où j'ai pu travailler sans contrepartie et me ressourcer auprès de vous. Évidemment, je ne peux pas remercier ma famille sans remercier Merlin, dont les ronronnements constants ont été ma plus grande source d'énergie (j'exagère à peine).

Pour Naïm, les mots manquent pour dire à quel point je te remercie d'avoir été auprès de moi depuis le début. Merci pour tout ce que tu as pu faire pour moi, tout ce que tu m'as apporté et tout ce que tu m'as fait découvrir, en particulier ta soupe et les millionnaire shortbread de Fortnum & Mason, mais aussi tout le reste.

Enfin, hélas non pas un merci mais un hommage à Serge LEWUILLON, historien, archéologue, chercheur, enseignant mais avant tout mon père. Tant de fierté dans un seul nom. Les mots et les remerciements ne pouvant plus l'atteindre, je lui dédie l'entièreté de mon travail.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES SCHÉMAS, FIGURES ET TABLEAUX	14
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	16
INTRODUCTION	21
A. Les leucémies aiguës myéloïdes : une prise en charge difficile et un haut taux de rechute	21
1. Définition de la maladie	21
2. Incidence et mortalité	22
3. Facteurs de risques et mutations	22
3.1 Facteurs de risques génétiques, extrinsèques et évolution de LAM secondaires	22
3.2 L'hématopoïèse clonale	23
4. Classifications des différentes catégories de LAM	23
4.1 Classification Franco-Américano-Britannique	23
4.2 Classification de l'Organisation Mondiale de la Santé	24
4.3 Classification de la European LeukemiaNet	25
5. Diagnostic	26
5.1 Prélèvements et examens	26
5.2 Diagnostic par immunophénotypage	26
5.3 Diagnostic par étude cytogénétique et moléculaire	27
6. Prise en charge de la LAM	28
6.1 La chimiothérapie conventionnelle	28
i. L'agent chimiothérapeutique Ara-C	28
ii. La phase d'induction	28
iii. La rémission complète	29
iv. Le traitement de consolidation/post-rémission	29
6.2 Thérapies combinées ou de substitution	30
i. Thérapies ciblées	30
ii. Immunothérapies	31
7. La maladie minimale résiduelle entraîne la rechute chez les patients	32
7.1 La maladie minimale résiduelle	32
7.2 Détection de la MRD	33
i. Détection par cytométrie en flux	33
ii. Détection par qPCR	33
7.3 Les cellules responsables de la MRD et la rechute associée	34
B. Les cellules souches leucémiques : principales responsables du développement de la maladie	35
1. Les cellules souches hématopoïétiques	35
2. Les cellules souches leucémiques	36
3. Caractérisation des cellules souches leucémiques	37
3.1 Caractérisation immunophénotypique des CSL	37
i. Les cellules leucémiques CD34 ⁺ CD38 ⁻ sont enrichies en CSL	37
ii. Expression des marqueurs extracellulaires CD33 et HLA-DR	39
iii. Expression d'autres marqueurs de surface spécifiques des CSL	40
3.2 Caractérisation génétique des CSL	41
4. Les CSL présentent une résistance innée	42
4.1 Les CSL sont des cellules majoritairement quiescentes	43
4.2 Les CSL présentent une forte activité de la pompe d'efflux ABCB1	44
4.3 Les CSL expriment le ligand inhibiteur PD-L1	45
4.4 Les CSL et le facteur de transcription NFAT	47
5. Les CSL présentent une résistance adaptative grâce à leurs interactions avec le microenvironnement tumoral	50

5.1	Le microenvironnement tumoral	50
5.2	La niche ostéoblastique	51
5.3	La niche vasculaire	52
5.4	L'interaction avec les lymphocytes T	52
C.	L'équilibre fragile résultant de l'interaction entre le système immunitaire et les cellules leucémiques	54
1.	Rôle du système immunitaire dans le contrôle des cellules tumorales	54
1.1	Le SI induit la dormance immunologique des cellules tumorales	54
1.2	Les LT CD8 ⁺ contrôlent la dormance immunologique des cellules tumorales	55
1.3	L'IFN γ sécrété par les LT CD8 ⁺ influe sur la quiescence des cellules tumorales	55
2.	Activation des LT CD8 ⁺	56
2.1	La cascade de signalisation induite par la reconnaissance antigénique via la voie du TCR est dépendante du Ca ²⁺	56
i.	La liaison du TCR au CMH	56
ii.	La voie de signalisation du TCR active les canaux calciques SOCs	57
iii.	L'entrée du Ca ²⁺ extracellulaire par les canaux SOCs entraîne l'activation de facteurs de transcription du LT CD8 ⁺	57
2.2	Voie de signalisation secondaire de co-stimulation du LT CD8 ⁺	58
i.	La voie de co-stimulation participe à l'activation du LT CD8 ⁺	58
ii.	La voie de co-stimulation participe également à l'inhibition de l'activité du LT CD8 ⁺	58
iii.	Rôle de NFAT et du Ca ²⁺ dans l'inactivation du LT CD8 ⁺	59
3.	L'environnement immunosuppresseur de la LAM inhibe l'activité des LT CD8 ⁺	60
3.1	Implication de l'axe PD-1/PD-L1 dans la régulation des LT CD8 ⁺	60
3.2	Rôle de l'axe PD-1/PD-L1 dans les LAM	61
3.3	Ciblage thérapeutique de l'axe PD-1/PD-L1	63
4.	La formation de la synapse immunologique suite à la rencontre entre le LT CD8 ⁺ et la cellule leucémique	65
4.1	La formation de la synapse immunologique est dépendante du Ca ²⁺	65
4.2	La lyse cytotoxique	67
D.	Implication du calcium dans les fonctions cellulaires des cellules leucémiques et LT CD8⁺	69
1.	Le calcium	69
2.	Rôle du Ca ²⁺ dans l'activation du LT	70
2.1	Le Ca ²⁺ permet d'activer le LT	70
2.2	Le Ca ²⁺ permet d'inactiver le LT en modulant NFAT et l'axe PD-1/PD-L1	72
2.3	Le Ca ²⁺ intervient dans la formation de la synapse immunologique et la lyse cytotoxique	72
3.	Les canaux ORAI sont dépendants du stock calcique et des senseurs STIM	74
3.1	Structure et fonctions des canaux ORAI	74
3.2	L'activation des canaux ORAI dépend des senseurs STIM	76
3.3	Le SOCE est induit par l'interaction des canaux ORAI avec les senseurs STIM	78
3.4	Implication du SOCE dans les pathologies cancéreuses	79
i.	Rôle de ORAI1 et STIM1 dans les pathologies cancéreuses	79
ii.	Rôle de ORAI2, ORAI3 et des canaux TRP dans les pathologies cancéreuses	80
3.5	Pharmacologie des canaux SOCs	82
	PUT IN A "CA²⁺LL" TO ACUTE MYELOID LEUKEMIA	84
	OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	117
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	122
1.	Culture cellulaire	122
1.1	Lignées cellulaires	122
1.2	Échantillons de patients	122
1.3	Conditions de culture	123
1.4	Tri et activation des LT CD8 ⁺ de donneurs sains	124
1.5	Traitements des cellules	125
1.6	Inhibition spécifique du niveau d'expression du gène ORAI1 par siRNA	125

2. Immunofluorescence	126
3. Évaluation de la sécrétion d'IFNγ par les LT de donneurs sains et LAM par test ELISA	127
4. Cytométrie en flux	128
4.1 Immunophénotypages/marquages extracellulaires	128
4.2 Discrimination des sous-populations à l'aide de l'exclusion de la rhodamine 123	130
4.3 Mesure du statut quiescent des cellules leucémiques en fonction des sous-populations	131
4.4 Étude de la concentration calcique intracellulaire des cellules	131
4.5 Mesure de la viabilité cellulaire	133
4.6 Évaluation de la lyse cytotoxique suite à la formation de la synapse immunologique entre un LT et une cellule leucémique	134
4.7 Analyse du cycle cellulaire	134
4.8 Tri cellulaire	135
4.9 Utilisation de billes de compensation pour les panels d'immunophénotypage des cellules	136
4.10 Calcul du rapport d'intensité médiane de fluorescence	136
5. Étude de l'homéostasie calcique des LT CD8⁺ et cellules leucémiques à l'aide de l'imagerie calcique et la technologie microfluidique	136
5.1 Fabrication des micro-dispositifs de microfluidique	137
5.2 Préparation des dispositifs pour l'injection des cellules de patients	137
5.3 Étude de l'homéostasie calcique de cellules isolées en imagerie calcique	138
5.4 Étude de la réponse calcique des cellules suite à la formation de la synapse immunologique	139
5.5 Analyses de la réponse calcique des cellules grâce au logiciel MetaFluor	140
6. Étude de l'expression des gènes	142
6.1 Extraction des ARN	142
6.2 Rétro transcription (RT)	142
6.3 Polymérase Chain Reaction en temps réel (qPCR) par la technique Taqman	143
7. Analyses statistiques	143
PAIRING CELLS OF DIFFERENT SIZES IN A MICROFLUIDIC DEVICE FOR IMMUNOLOGICAL SYNAPSE MONITORING	144
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	172
1. Collecte des cellules leucémiques et LT de patients LAM et donneurs sains et immunophénotypage	172
1.1 Immunophénotypage des cellules leucémiques	173
1.2 Immunophénotypage des LT sains et de patients LAM	178
i. Discrimination des LT CD3 ⁺ CD8 ⁺ selon leur expression de PD-1	178
ii. Les statuts de différenciation des LT	179
2. Étude de l'activité calcique des cellules isolées en imagerie calcique à l'aide de la microfluidique	181
2.1 Étude de l'implication des canaux SOCs dans l'entrée capacitive de Ca ²⁺ de LT CD8 ⁺ de donneurs sains et de patients LAM	182
2.2 Activité des canaux SOCs de LT CD8 ⁺ de donneurs sains et de patients LAM	184
2.3 Résultats préliminaires sur l'activité des canaux SOCs des cellules leucémiques isolées	186
3. Étude de l'activité calcique des cellules leucémiques et LT de patients LAM et de LT de donneurs sains après la formation de synapses immunologiques en imagerie calcique à l'aide de la microfluidique	186
3.1 Réponse calcique des LT suite à la formation de synapses immunologiques avec des cellules leucémiques	187
i. Les LT forment des synapses immunologiques avec les cellules leucémiques	188
ii. Activité calcique des LT suite à la formation de synapses immunologiques	188
3.2 Impact d'un traitement à l'Ara-C des cellules leucémiques sur la formation de synapses immunologiques et la réponse calcique des LT	189
i. L'Ara-C diminue la formation de synapses immunologiques actives	190

ii.	Les cellules leucémiques traitées à l'Ara-C induisent une réponse calcique différente de la part des LT	190
3.3	Résultats préliminaires sur la réponse calcique des cellules leucémiques traitées à l'Ara-C durant la formation de la synapse immunologique	191
4.	Étude de la lyse cytotoxique et de la sécrétion d'IFNγ par les LT lors de la formation de synapses immunologiques avec les cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic	193
4.1	Les LT de donneurs sains et LAM induisent une lyse cytotoxique	194
4.2	Évaluation de la sécrétion d'IFN γ par les LT CD8 ⁺ de donneurs sains et LAM	194
i.	Les LT de donneurs sains	194
ii.	Les LT de patients LAM au diagnostic	195
iii.	Sécrétion de cytokines durant la formation de la synapse immunologique et de la lyse cytotoxique	195
	INVOLVEMENT OF ORAI1/SOCE IN HUMAN AML CELL LINES AND PRIMARY CELLS ACCORDING TO ABCB1 ACTIVITY, LSC COMPARTMENT AND POTENTIAL RESISTANCE TO ARA-C EXPOSURE	196
	DISCUSSION	227
1.	Le modèle expérimental de microfluidique permet d'étudier la synapse immunologique	227
2.	Il existe une expression hétérogène des marqueurs extracellulaires des cellules leucémiques de patients LAM	228
3.	Il existe une expression hétérogène des marqueurs extracellulaires des LT de patients LAM et individus sains en fonction de leur statut de différenciation	231
4.	L'homéostasie calcique diffère entre les LT de patients LAM et d'individus sains	234
5.	L'homéostasie calcique impacte l'activation des LT	235
6.	Il existe une différence de réponse entre les synapses immunologiques formées avec des LT allogéniques ou autologues	236
7.	Les cellules leucémiques traitées à l'Ara-C forment des synapses immunologiques différentes de celles formées avec les cellules leucémiques non traitées de patients LAM	237
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	241
	BIBLIOGRAPHIE	247

TABLE DES SCHÉMAS, FIGURES ET TABLEAUX

SCHÉMAS

Schéma 1 : Modèle simplifié de l'hématopoïèse normale et la LAM	21
Schéma 2 : Évolution de la LAM au cours du temps	32
Schéma 3 : Résistance innée de la CSL	49
Schéma 4 : Résistance adaptative de la CSL	53
Schéma 5 : Activation du LT CD8 ⁺ suite à la rencontre avec une cellule leucémique	63
Schéma 6 : Formation de la synapse immunologique entre le LT CD8 ⁺ et la cellule leucémique	68
Schéma 7 : Association de ORAI et STIM pour former le canal CRAC et induire l'entrée capacitive de Ca ²⁺ dans la cellule	77
Schéma 8 : mécanismes pouvant réguler l'immuno-échappement des cellules leucémiques	120
Schéma 9 : Quatre différentes méthodes d'activation du LT	125
Schéma 10 : Réalisation expérimentale de la cinétique calcique de cellules isolées à l'aide de la thapsigargine et de Ca ²⁺ extracellulaire	133
Schéma 11 : Représentation de la capture et de l'enregistrement des cellules lors des expérimentations d'imagerie calcique à l'aide de la microfluidique	141

TABLEAUX

Tableau 1 : Classification FAB des LAM	24
Tableau 2 : Classification OMS des LAM	24
Tableau 3 : Classification ELN des LAM	26
Tableau 4 : Panel de phénotypage des cellules leucémiques	128
Tableau 5 : Panel de tri des LT	129
Tableau 6 : Panel n°1 de phénotypage des LT de donneurs sains et LAM afin de déterminer leur statut de différenciation	129
Tableau 7 : Panel n°2 de phénotypage des LT de donneurs sains et LAM afin de déterminer leur statut de différenciation	129
Tableau 8 : Classification des caractéristiques de patients LAM au diagnostic	172
Tableau 9 : Pourcentage de lyse cytotoxique (%) et de sécrétion d'IFN γ (pg/mL) par les LT de donneurs sains	195
Tableau 10 : Pourcentage de lyse cytotoxique (%) et de sécrétion d'IFN γ (pg/mL) par les LT de patients LAM au diagnostic	195
Tableau 11 : Sécrétion d'IFN γ (pg/mL) par les LT de patients LAM au diagnostic et donneurs sains suite à la lyse cytotoxique	195

FIGURES

Figure 1 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic	174
Figure 2 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic	175
Figure 3 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic après traitement à l'IFN γ	176
Figure 4 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic	177
Figure 5 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires des LT	178
Figure 6 : Analyse par cytométrie en flux du marqueur de surface PD-1 au sein des LT CD3 ⁺ CD8 ⁺	179
Figure 7 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires des LT	181
Figure 8 : Analyse de l'activité des canaux SOCs dans l'homéostasie calcique de LT isolés en imagerie calcique	183
Figure 9 : Analyse de l'activité des canaux SOCs dans l'homéostasie calcique de LT isolés en imagerie calcique	184
Figure 10 : Analyse de l'activité des canaux SOCs dans l'homéostasie calcique de LT isolés en imagerie calcique	185
Figure 11 : Analyse de l'activité des canaux SOCs dans l'homéostasie calcique de cellules leucémiques isolées en imagerie calcique	186
Figure 12 : Formation de la synapse immunologique et réponse calcique	189
Figure 13 : Impact de l'Ara-C sur la formation de la synapse immunologique et la réponse calcique des LT	190
Figure 14 : Impact de l'Ara-C sur la formation de la synapse immunologique et la réponse calcique des cellules leucémiques	192

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ABC : ATP-binding cassette
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARNi : Acide ribonucléique (ARN) interférent
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase
Ang-1 : Angiopoïétine 1
APC : Allophycocyanine
AP-1 : Activator protein 1
Ara-C : Cytosine arabinoside, cytarabine
Ara-C triphosphate : Ara-CTP
ARN : Acide ribonucléique

Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer
BATF : Basic leucine zipper ATF-like transcription factor
Bax : Bcl-2 associated X protein, Bcl-2-like protein 4
Bcl-2 : B cell lymphoma 2
Bid : BH3-interacting domain death agonist
BMP : Bone marrow protein
BTP : Bis(trifluorométhyl)pyrazole
BV421 : Brilliant Violet 421
BV605 : Brilliant Violet 605
BV711 : Brilliant Violet 711
B2M : Bêta2-Microglobuline

Ca²⁺ : Calcium
CAMK : Calmoduline kinase
CAR-T : Chimeric antigen receptor-T
CD : Cluster of differentiation
CDK : Cyclin-dependant kinase
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CNS : Cellule non souche
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CRAC : Calcium release activated channel
CRB2 : Crumbs cell polarity complex component 2
CS : Cellule souche
CsA : Cyclosporine A
c-SMAC : central-Supramolecular adhesion complex, complexe supramoléculaire d'adhésion centrale
CSC : Cellule souche cancéreuse
CSDM : Cellules suppressives dérivées des myéloïdes
CSH : Cellule souche hématopoïétique
CSL : Cellule souche leucémique
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
CXCL12 : CXC chemokine ligand 12

CXCR4 : CXC chemokine receptor type 4

DAG : Diacylglycérol

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DfN : Different from normal

EFS : Établissement Français du Sang

ELN : European LeukemiaNet

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

ESCRT : Endosomal sorting complexes required for transport

FAB : Franco-Américano-Britannique

FACS : Fluorescence-activated cell sorting

F-actine : Filamentous actin

FasL : Fas ligand

FITC : Fluorescein isothiocyanate

FK506 : Tacrolimus

FoxO : Forkhead box O

FYN : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn

HBSS : Hanks' balanced salt solution

HIF1- α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha

hENT1 : human Equilibrative Nucleoside Transporter 1

HLA : Human leukocyte antigen

ICAM1 : Intracellular adhesion molecule 1

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN γ : Interferon gamma

IL : Interleukine

IMF : Intensité moyenne de fluorescence

IP₃ : Inositol trisphosphate

IRF4 : Interferon regulatory factor 4, facteur 4 régulateur de l'interferon

ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

ITSM : Immunoreceptor tyrosine switch motif

JNK : c-Jun N-terminal kinase

K⁺ : Potassium

Klf4 : Kruppel-like factor 4

KO : Knock-out

LAG3 : Lymphocyte-activation gene 3

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

LAIP : Leukemia-associated immunophenotype, phénotypes associés à la leucémie

LCK : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1

LT : Lymphocyte T

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MDR1 : Multi drug resistance

MDSC : Myeloid-derived suppressor cell, cellules myéloïdes suppressives

MO : Moelle osseuse

MRD : Minimal residual disease, maladie minimale résiduelle

MTOC : Microtubule organising centre, centre d'organisation des microtubules

Na⁺ : Sodium

NFS : Numération formule sanguine

NK : Natural Killer

NOD : Non-obese diabetic

NSG : NOD/SCID gamma

Oct-4 : Octamer-binding transcription factor 4

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBMC : Peripheral blood mononuclear cells, cellules mononucléées du sang périphérique

PBS : Phosphate-buffered saline

PD-1 : Programmed cell death protein 1

PD-L1 : Programmed cell death-ligand protein 1

PDMS : Polydimethylsiloxane

PE : Phycoerythrin

Pe-Cf594 : PE-Cf594

PeCy7 : PE-Cyanine7

PerCpCy5.5 : Peridinin chlorophyll-Cyanine5.5

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIP₂ : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP₃ : Phosphoinositide 3 kinase

PLC : Phospholipase C

p-SMAC : peripheral-Supramolecular adhesion complex, complexe supramoléculaire d'adhésion périphérique

RE : Réticulum endoplasmique

Rh123 : Rhodamine 123

ROS : Reactive oxygen species

RT-qPCR : Real time quantitative polymerase chain reaction, PCR quantitative en temps réel

SCF : Stem cell factor, facteur de cellule souche

SCID : Severe combined immunodeficient

SDM : Syndrome myélodysplasique

SEA : Staphylococcus enterotoxin A

SEM : Erreur standard à la moyenne

SERCA : Sarco endoplasmic reticulum calcium ATPase
SI : Système immunitaire
SMMiL-E : Seeding Microsystems in Medicine in Lille – European-Japanese Technologies against Cancer
SOCs : Store-operated channels
SOCE : Store-operated calcium entry
Sox2 : SRY-box 2
STIM : Stromal interaction molecule 1
SVF : Sérum de veau fœtal

TA : Température ambiante
TGF- β : Transforming growth factor beta
TIGIT : T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM-3 : T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein-3
TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNF- α : Tumour necrosis factor alpha
TPO : Thrombopoïétine
Tregs : LT régulateurs
TRP : Transient receptor potential
TRPC : TRP-canonical
TRPV : TRP-vanilloïd

WASp : Wiskott-Aldrich syndrome protein
WT-1 : Wilms Tumor-1

ZAP-70 : Zeta-chain-associated protein kinase 70

2-APB : 2-aminoethyl diphenylborate
5-FU : 5-Fluorouracil

INTRODUCTION

INTRODUCTION

A. Les leucémies aiguës myéloïdes : une prise en charge difficile et un haut taux de rechute

1. Définition de la maladie

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) font partie d'un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par une prolifération rapide et majorée ainsi que par une capacité de survie anormale des progéniteurs ou précurseurs (blastes) hématopoïétiques de la lignée myéloïde. Ces progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques, nichés au sein de la moelle osseuse (MO), présentent des aberrations génétiques induisant un blocage à un stade précoce de la différenciation. La prolifération de ces cellules leucémiques immatures empêche l'hématopoïèse normale et donc la production de cellules sanguines normales (globules rouges, globules blancs, plaquettes), ce qui entraîne alors des difficultés pour l'organisme à lutter contre les infections. Les cellules leucémiques envahissent la MO, le sang et parfois d'autres organes et tissus (Doulatov *et al.* 2022) (Schéma 1).

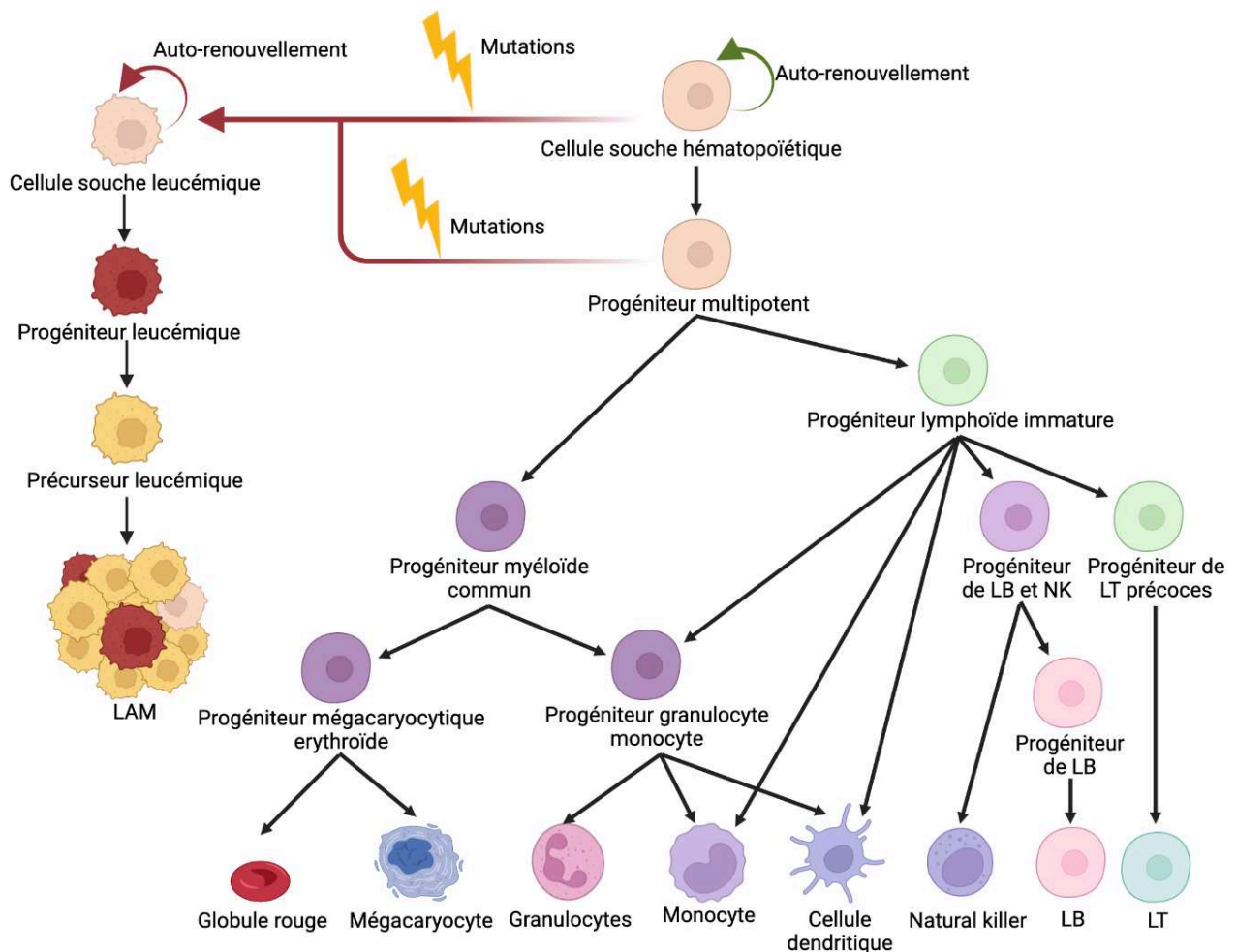


Schéma 1 : Modèle simplifié de l'hématopoïèse normale et la LAM. Principales étapes de l'hématopoïèse normale des différentes lignées hématopoïétiques. La LAM est causée par une prolifération médullaire clonale et/ou polyclonale de cellules présentant des altérations génétiques et bloquées dans leur stade de différenciation précoce.

2. Incidence et mortalité

Les LAM peuvent survenir à tout âge mais moins de 25% sont diagnostiquées avant 25 ans. En Europe, les LAM présentent une incidence de 5 à 8 cas par an pour 100 000 personnes de moins de 50 ans. Cette incidence augmente cependant à 20 cas pour 100 000 adultes de plus de 80 ans, avec un âge médian au diagnostic de 68 ans (Mwirigi, Dillon, et Raj 2017).

3. Facteurs de risques et mutations

Divers facteurs de risques peuvent être associés à la LAM. Il peut s'agir de risques génétiques, extrinsèques, liés à des traitements thérapeutiques, suite à l'évolution de maladies pré-leucémiques ou encore suite à l'hématopoïèse clonale.

3.1 Facteurs de risques génétiques, extrinsèques et évolution de LAM secondaires

Certaines altérations génétiques survenant *de novo* peuvent établir une prédisposition génétique à la LAM comme GATA, EV1 ou encore le syndrome de Down. L'effet de ces altérations génétiques sera décrit plus en détail par la suite.

Seuls quelques facteurs environnementaux, qui sont notamment liés à une exposition importante au benzène, aux radiations ionisantes et aux agents alkylants peuvent expliquer l'apparition de la LAM mais pour un nombre restreint de patients (Hou et Tien 2020). L'utilisation d'un traitement chimiothérapeutique ou de radiations pour un autre cancer peut également induire le développement de la LAM ou permettre le développement de l'hématopoïèse clonale (Maleki *et al.* 2021).

La préexistence d'hémopathies comme les syndromes myélodysplasiques, les désordres myéloprolifératifs ou l'anémie aplasique peut également prédisposer à la survenue d'une LAM dite secondaire. La leucémique chronique peut également évoluer en syndrome aiguë (Zeichner et Arellano 2015).

3.2 L'hématopoïèse clonale

Les LAM sont des maladies pouvant également survenir chez des personnes ne présentant pas de pathologie de prime abord. Les LAM sont majoritairement causées par des altérations génétiques liées à des anomalies chromosomiques ou des mutations de gènes isolés, il est question d'hématopoïèse clonale.

Avec l'âge, les tissus accumulent un nombre croissant de mutations somatiques qui, pour la plupart, n'ont que peu ou pas de conséquences fonctionnelles. Il peut toutefois arriver qu'une mutation confère à une cellule un avantage fonctionnel. L'hématopoïèse clonale est l'expansion rapide d'une lignée, ou clone, de cellules souches ou progéniteurs hématopoïétiques suite à une mutation conférant un avantage compétitif par rapport aux autres clones sans nécessairement l'apparition d'une hémopathie. De ce fait, une proportion importante des cellules sanguines en circulation peut dériver d'une seule cellule souche mutée (Jaiswal et Ebert 2019).

Cependant, certaines mutations somatiques de gènes impliqués dans l'hématopoïèse qui, isolées, n'induisent pas l'apparition de la LAM peuvent toutefois prédisposer : il est question de mutations pré-leucémiques. Ce sont généralement des mutations qui affectent les gènes codant pour les modificateurs épigénétiques tels que *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *IDH1* et *IDH2*, qui sont des mutations souvent acquises précocement et présentes dans le clone fondateur de la LAM (Döhner *et al.* 2017; Short, Rytting, et Cortes 2018).

D'autres mutations plus tardives telles que *NPM1* survenant dans les clones présentant les mutations pré-leucémiques sont responsables du développement de la LAM, il s'agit de mutations initiatrices.

Comme la plupart des tumeurs malignes sporadiques chez l'homme, la LAM est une maladie complexe et dynamique qui évolue dans le temps et qui est caractérisée par de multiples mutations somatiques et la coexistence de clones concurrents (Döhner *et al.* 2017). Si le clone leucémique majoritaire identifié au diagnostic est souvent le plus agressif, un clone minoritaire peut avoir la capacité de résister au traitement et initier la rechute.

4. Classifications des différentes catégories de LAM

4.1 Classification Franco-Américano-Britannique

La première méthode de classification des LAM qui prévalait jusqu'au début des années 2000 est le système de classification international Franco-Américano-Britannique (FAB) de 1996. Ce système de classification est basé sur les caractéristiques morphologiques et cytochimiques des cellules anormales et permet de distinguer 10 sous-types de LAM notés de

M0 à M7 lors de la réalisation du myélogramme. Cette classification ne reflète cependant pas la sévérité de la maladie mais reste un outil indispensable pour l'orientation du diagnostic et la prise en charge initiale (Döhner *et al.* 2022) (Tableau 1).

Groupes	Caractéristiques
LAM 0	Indifférenciée
LAM 1	Myéloblastique sans différenciation
LAM 2	Myéloblastique avec différenciation
LAM 3	Promyélocytaire
LAM 4	Myélo-monocytaire
LAM 4 Eo	Myélo-monocytaire avec éosinophiles anormaux
LAM 5a	Monocytaire sans différenciation
LAM 5b	Monocytaire avec différenciation
LAM 6	Érythroblastique
LAM 7	Mégacaryocytaire

Tableau 1 : Classification FAB des LAM.

4.2 Classification de l'Organisation Mondiale de la Santé

La valeur pronostic limitée de la classification FAB a résulté en 2001 au développement par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) d'une nouvelle méthode de classification pour y intégrer les données cliniques, l'immunophénotype, les données morphologiques, les anomalies cytogénétiques récurrentes et le statut mutationnel de certains gènes.

La dernière version révisée publiée en 2016 organise les LAM en 6 sous-types avec (1) les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, (2) les LAM avec des caractéristiques liées à la myélodysplasie, (3) les néoplasmes myéloïdes liés aux thérapies, (4) les LAM non spécifiées, (5) les LAM associées au sarcome myéloïde et (6) les LAM liées au syndrome de Down (Trisomie 21).

Parmi les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, il existe 11 sous-types classés en fonction de translocations chromosomiques distinctes comprenant *NPM1*, *CEBPA*, *BCR-ABL1* et *RUNX1* mutés. Certaines anomalies génétiques telles que la monosomie 5 ou 7 et la délétion 5q ou 7q permettent également de diagnostiquer les LAM avec des caractéristiques liées à la myélodysplasie (Döhner *et al.* 2022) (Tableau 2).

Groupes pronostics	Principales anomalies génétiques
LAM avec anomalies génétiques récurrentes	t(15;17) (q22;q12) ; <i>PML-PARA</i> (favorable), t(8;21) (q22;q22) ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> (favorable), inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1 ;q22) ; <i>CBF-MYH11</i> (favorable), t(9;11)(p22;q23) ; <i>MLLT3-MLL</i> (intermédiaire), t(6;9)(p23;q34) ; <i>DEK-NUP214</i> (défavorable), inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ;

	<i>RPN1-EVI1</i> (défavorable), LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; <i>RBM15-MKL1</i> Mutations génétiques : <ul style="list-style-type: none"> - Favorables : <i>NPM1</i> muté isolé sans <i>FLT3-ITD</i>, <i>CEBPα</i> - Défavorables : <i>FLT3/ITD</i>, <i>c-KIT</i>.
LAM avec des caractéristiques liées à la myélodysplasie	<ul style="list-style-type: none"> • Pas d'anomalies cytogénétiques récurrentes • Absence de radiothérapie ou chimiothérapie antérieure • Faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique • Ou présentant des anomalies cytogénétiques apparentées à celles des myélodysplasies • Ou présentant une dysplasie sur > 50 % des cellules d'au moins 2 lignées myéloïdes
Néoplasmes myéloïdes liés aux thérapies	Quelque soit le traitement si une seule anomalie cytogénétique associée
LAM non spécifiées	<ul style="list-style-type: none"> • Reprend la classification FAB (M0 à M7 hors M3), en l'absence d'anomalies cytogénétiques ou moléculaires pouvant les classer ailleurs • LAM à précurseurs basophiles • Panmyélose aiguë avec myélofibrose
LAM associées au sarcome myéloïde	Le sarcome myéloïde est une tumeur solide des cellules myéloïdes qui apparaît hors de la MO
LAM liées au syndrome de Down	LAM associée à la trisomie 21

Tableau 2 : Classification OMS des LAM.

Cette classification ayant une valeur pronostic indiscutable ne classe pas les caractéristiques de la LAM selon les risques pronostiques des anomalies cytogénétiques et ne permet pas de déterminer l'issue de la maladie et le traitement thérapeutique à adopter.

4.3 Classification de la *European LeukemiaNet*

Les LAM ont donc ensuite été classées par la *European LeukemiaNet* (ELN) en 3 groupes de risques pronostiques : favorable, intermédiaire et défavorable basés sur les risques cytogénétiques et la reconnaissance de sous-ensembles de maladies moléculaires distinctes de la cytogénétique (Arber *et al.* 2016; Vardiman *et al.* 2009) (Tableau 3).

Malgré les avancées sur l'identification des mutations impliquées dans le développement des LAM, la contribution exacte de chaque mutation individuellement reste encore à être étudiée. En effet, la pathogenèse et la sévérité de la LAM dépendent fortement des interactions entre différentes altérations somatiques. Ainsi, la mutation de *c-KIT* a été associée à t(8;21) ou inv(16), et sa présence a des implications significatives sur le pronostic

permettant de classer la LAM présentant cette mutation comme risque intermédiaire. De même, la mutation de *NPM1* est une mutation souvent associée à la mutation *FLT3-ITD* ou à des mutations de gènes impliqués dans les processus épigénétiques tels que *DNMT3A* et *IDH1* ou *IDH2* et ces associations peuvent induire un pronostic différent (Patel *et al.* 2012).

Par ailleurs, les réarrangements chromosomiques t(8;21), t(15;17) ou inv(16) sont tous associés à un pronostic favorable à 66% chez les patients de moins de 60 ans et à 33% chez les patients de plus de 60 ans (Döhner *et al.* 2010; Estey 2014; Mrózek *et al.* 2012).

Cette classification des anomalies moléculaires et cytogénétiques permet d'aider le clinicien dans la démarche thérapeutique.

Groupes pronostics	Principales anomalies moléculaires et cytogénétiques
Favorable	t(8 ;21)(q22 ;q22.1) ; <i>RUNX1-RUNXT1</i> ; inv(16)(p13.1q22) ou t(16 ;16)(p13.1 ;q22) ; <i>CBFB-MYH11</i> , <i>NPM1</i> muté sans <i>FLT3-ITD</i> ou avec <i>FLT3-ITD</i> ^{low}
Intermédiaire	<i>NPM1</i> muté avec <i>FLT3-ITD</i> ^{high} , <i>NPM1</i> avec <i>FLT3-ITD</i> ^{high} t(9 ;11)(p21.3 ;q23.3) ; <i>MLLT3-KMT2A</i> , anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires non classées dans les groupes favorable ou adverse
Adverse	t(9 ;22)(q34.1 ;q11.2) ; <i>BCR-ABL1</i> , inv(3)(q21.3 ;q26.2) ou t(3 ;3)(q21.3 ;q26.2) ; <i>GATA2</i> , <i>EVI1</i> , <i>RUNX1</i> muté, <i>ASXL1</i> muté, <i>TP53</i> muté, <i>BCOR</i> muté

Tableau 3 : Classification ELN des LAM.

5. Diagnostic

5.1 Prélèvements et examens

Le diagnostic de la LAM est effectué par le biais d'un examen de la MO appelé myélogramme. Cet examen est réalisé sous anesthésie locale afin de prélever une quantité réduite de MO grâce à une aiguille creuse introduite dans un os comme le sternum ou l'os iliaque. L'étude de la MO permet de détecter les cellules anormales, leurs chromosomes et leurs gènes. En parallèle, une prise de sang est également effectuée afin de réaliser la numération de la formule sanguine (NFS) et ainsi quantifier les différentes cellules du sang et détecter les anomalies. Le choix du traitement dépendra des résultats obtenus.

5.2 Diagnostic par immunophénotypage

La LAM est diagnostiquée de différentes manières, la première étant par immunophénotypage grâce à la cytométrie en flux afin d'identifier les marqueurs de surface

cellulaires et intracellulaires qui ne sont toutefois pas exprimés dans tous les cas en raison de l'hétérogénéité de la LAM. La LAM est diagnostiquée à partir de la présence de 20% ou plus de cellules leucémiques dans le sang périphérique ou la MO.

L'immunophénotypage qui permet de déterminer le phénotype anormal des cellules leucémiques (*leukemia-associated immunophenotype*, LAIP) est caractérisé notamment par les marqueurs CD45, CD34, CD117, CD133, CD33, CD13 et est également nécessaire pour le suivi ultérieur de la maladie minimale résiduelle (*minimal residual disease*, MRD). L'analyse de la présence de cellules souches leucémiques (CSL, phénotype CD34⁺ CD38⁻) est aussi réalisée aux différents stades de la maladie (Ossenkoppele et Schuurhuis 2014; Zeijlemaker *et al.* 2019; Pelcovits et Niroula, 2020). Aujourd'hui, le phénotype associé aux CSL serait le suivant : CD34⁺/CD38⁻/CD45RA⁺/CD90⁻/CD123⁺/CD97⁺/TIM-3⁺/CLL-1⁺.

5.3 Diagnostic par étude cytogénétique et moléculaire

Chaque anomalie génétique ayant une valeur pronostic, les tests de génétique moléculaire permettent de dépister toutes les anomalies génétiques qui (i) définissent les catégories de maladie et de risque ou qui (ii) sont nécessaires pour établir un traitement ciblé. Pour déterminer le traitement le plus adapté au patient, l'étude des facteurs pronostics est réalisée et implique un screening pour les anomalies spécifiques comme (i) les fusions génétiques *RUNX1 :RUNX1T1*, *CBFB :MYH11*, *KMTT2A (MLL)* et *MECOM (EVI1)* ou les mutations des gènes *NPM1*, *CEBPA* et *RUNX1* car elles définissent la catégorie de la maladie, (ii) les mutations de *FLT3*, (iii) les anomalies génétiques telles que t(8 ;21), inv(16) ou t(15 ;17), (iv) les anomalies chromosomiques liées à la myélodysplasie comme la perte de matériel chromosomique 5q, 7q ou 17p et (v) les mutations de *TP53* et *ASXL1* car ces facteurs sont associés à un mauvais pronostic.

L'impact pronostique de nombreux marqueurs peut varier car l'effet d'une anomalie donnée peut être dépendante de la présence ou de l'absence d'une autre. Un exemple de cette interaction entre les gènes est qu'une mutation de *NPM1* ne donne un pronostic favorable que lorsque la mutation est seule ou en présence des mutations *IDH1* et *IDH2* et en l'absence de la mutation *FLT3-ITD*, alors que les mutations simultanées d'*ASXL1* et de *RUNX1* donnent un pronostic particulièrement mauvais, tout comme les mutations *PHF6* et *MLL*. Les signatures génétiques permettent donc de déterminer la gravité de la LAM, bien que seul un nombre limité de marqueurs moléculaires comme les mutations impliquant *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3-ITD* et *c-KIT* sont considérés comme pertinents dans le diagnostic de la maladie et le protocole de prise en charge thérapeutique (Döhner *et al.* 2022; Pelcovits et Niroula, 2020; Patel *et al.* 2012).

Le diagnostic de la LAM est complété par l'étude de l'activité de la myéloperoxydase afin de confirmer l'origine myéloïde de ces cellules et la recherche de la présence de corps d'Aurer observés le plus fréquemment dans les LAM avec t(8;21) (Arber *et al.* 2016).

6. Prise en charge de la LAM

6.1 La chimiothérapie conventionnelle

i. L'agent chimiothérapeutique Ara-C

Les analogues nucléosidiques font partie d'une famille majeure d'agents antinéoplasiques utilisés dans le traitement des hémopathies malignes. L'analogue pyrimidique modifié par un sucre appelé la cytarabine (1- β -D-ara binofuranosylcytosine ; ara-C) est l'un de ces analogues et est l'agent clé utilisé dans le traitement anti-tumoral standard durant la chimiothérapie d'induction en combinaison avec une anthracycline mais également en monothérapie durant la phase de consolidation chez les patients atteints de LAM.

L'Ara-C est transporté dans les cellules leucémiques par des transporteurs membranaires comme le *human Equilibrative Nucleoside Transporter 1* (hENT1). Une fois à l'intérieur des cellules, l'Ara-C est phosphorylé en ara-C monophosphate par l'enzyme désoxycytidine kinase, puis en ara-C diphosphate par la désoxycytidine monophosphate kinase. Enfin, la nucléoside diphosphate kinase permet l'obtention d'ara-C triphosphate (ara-CTP) qui est un métabolite actif de l'Ara-C. L'ara-CTP est incorporé dans les brins d'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire pour inhiber la synthèse de l'ADN, ce qui affecte de manière préférentielle les cellules à division rapide comme les cellules cancéreuses.

La réponse au traitement ou la cytotoxicité de l'ara-C dépendent de l'incorporation de l'ara-CTP dans l'ADN et donc de sa concentration (Kufe *et al.* 1984; Huang et Plunkett, 1995; Yamauchi 2011).

L'effet de ce médicament sur la signalisation calcique des cellules leucémiques sera détaillé dans mon projet de thèse.

ii. La phase d'induction

Le traitement actuel le plus communément utilisé repose sur la chimiothérapie intensive souvent appelée « 7+3 » du fait de sa durée de 7 jours de perfusion de cytosine arabinoside (cytarabine, Ara-C) ou d'autres agents similaires (cladribine, fludarabine, clofarabine) en continu par intraveineuse à la dose de 100 à 200 mg/m²/jour suivis de 3 jours

d'anthracyclines à la dose de 36 à 45 mg/m² en dose totale. Les anthracyclines utilisées peuvent être le daunorubicine, idarubicine ou mitoxantrone avec une dose variable pour chacun d'entre eux.

Cette chimiothérapie comporte successivement une phase d'induction qui vise à réduire la masse de cellules leucémiques afin de restaurer l'hématopoïèse normale, puis une phase de consolidation afin de renforcer la rémission complète, c'est-à-dire la disparition des signes de la maladie et la non détection des cellules leucémiques (Döhner *et al.* 2010; 2017; Dombret et Gardin 2016).

iii. La rémission complète

Suite au traitement chimiothérapeutique, une rémission complète se caractérise par la présence de moins de 5% de cellules leucémiques dans la MO, un nombre absolu de neutrophiles supérieur à 1 x 10⁹/L, un nombre de plaquettes supérieur à 100 x 10⁹/L et l'absence de transfusion sanguine.

La rémission complète est obtenue chez 60 à 80% des patients de moins de 60 ans et chez 40 à 60% des patients de plus de 60 ans. Cette rémission dépend également du type de LAM qui affecte les patients. La rémission complète est dose-dépendante bien que cela soit moins significatif chez les patients de plus de 65 ans. De la même manière, de trop fortes doses d'Ara-C s'avèrent toxiques pour le patient.

Les taux de rémission complète sous un traitement conventionnel 7+3 sont d'environ 70 à 85% avec une génétique favorable, de 60 à 75% avec une génétique intermédiaire et de 25 à 40% avec une génétique défavorable.

Toutefois, la plupart des patients ayant obtenu une rémission complète après le traitement d'induction rechutent et la durée médiane de rémission complète sans allogreffe est d'environ 1 an (Döhner *et al.* 2017).

iv. Le traitement de consolidation/post-rémission

Afin de maintenir le patient en rémission, une chimiothérapie de consolidation est mise en place après la phase d'induction. Elle peut être réalisée avec les mêmes drogues ou non que celles utilisées lors de la phase d'induction, et ce, à haute dose pendant plusieurs cycles.

Concernant les LAM à risque favorable ou intermédiaire, aucun traitement n'est recommandé après la thérapie de consolidation puisque le risque de rechute est jugé inférieur à 35%. Cependant, d'autres thérapies traditionnelles peuvent compléter la chimiothérapie intensive lorsque celle-ci n'est pas jugée suffisante pour atteindre une

rémission complète, ou lorsque les patients présentent des risques intermédiaires ou défavorables (Burnett *et al.* 2013; Löwenberg 2013).

Ces thérapies traditionnelles sont les greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques (provenant d'un donneur sain) ou autologues (provenant du même patient dont les CSH ont été isolées après traitement de consolidation), et l'infusion de lymphocytes de donneurs afin de restaurer l'hématopoïèse et une réponse immunitaire effective contre les cellules leucémiques (Cornelissen et Blaise 2015).

Souvent, la greffe de CSH n'est pas jugée utile car les risques de toxicité ou de complications sont plus élevés que les bénéfices de cette greffe. En réalité, seule une minorité de patients reçoit une greffe des CSH notamment à cause de l'âge avancé, des comorbidités, de la toxicité de précédentes thérapies, de l'incapacité à atteindre un stade de rémission complète, d'une rechute ou de leucémie réfractaire (Döhner *et al.* 2022).

En première intention, le protocole moins agressif venetoclax/azacitidine est recommandé chez les patients âgés ne supportant pas la chimiothérapie intensive. Le venetoclax est un inhibiteur de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et permet ainsi de ralentir la progression de la maladie et l'azacitidine (Vidaza) influe sur DNMT1 et entraîne l'inactivation des ADN méthyltransférases, ce qui engendre une hypométhylation de l'ADN (Pollyea *et al.* 2022).

6.2 Thérapies combinées ou de substitution

i. Thérapies ciblées

La dépendance des thérapies précédemment développées à l'activité des lymphocytes T (LT) indique une sensibilité des cellules de LAM à l'action cytotoxique du système immunitaire (SI) et justifie l'utilisation des thérapies ciblant des anomalies récurrentes et immunothérapies qui sont de plus en plus étudiées pour le traitement des LAM en complément ou en remplacement du traitement conventionnel (Khaldoyanidi *et al.* 2021).

Certaines thérapies ciblées peuvent inhiber les protéines kinases ou d'autres protéines impliquées dans des voies de signalisation modifiées dans les LAM. La midostaurine, un inhibiteur de *FLT3*, se lie au domaine catalytique des kinases et peut compléter la chimiothérapie intensive en cas de facteurs pronostics défavorables, de rechute ou de maladie réfractaire chez les patients âgés de moins de 60 ans atteints de LAM associée à la mutation *FLT3* (Döhner *et al.* 2022).

Suite à la découverte de modifications épigénétiques récurrentes chez des patients atteints de LAM, des thérapies ciblant les régulateurs épigénétiques *IDH1* et *IDH2* comme

l'ivosidenib et l'enasidenib respectivement ont été développés et ont montré une amélioration de la survie des patients (Stein *et al.* 2017; DiNardo *et al.* 2018).

ii. Immunothérapies

Les immunothérapies permettent de stimuler le système immunitaire pour éliminer les cellules cancéreuses. Il existe notamment des anticorps monoclonaux couplés à des agents cytotoxiques ciblant des antigènes présents à la surface des cellules leucémiques. Par exemple, le gemtuzumab est un anticorps monoclonal dirigé contre CD33 et couplé à l'ozogamicine, une molécule cytotoxique. Le gemtuzumab ozogamicin est utilisé à faible dose et peut être associé à une chimiothérapie conventionnelle ou utilisé en monothérapie d'induction et de consolidation chez les patients présentant une LAM CD33⁺ (Lambert *et al.* 2014). L'anticorps dirigé spécifiquement contre l'antigène CD123, qui est le récepteur à l'IL-3 exprimé par les progéniteurs et précurseurs leucémiques et couplé à un agent cytotoxique, a montré une forte efficacité tumorale *in vitro* et *in vivo* (Kovtun *et al.* 2018).

L'immunothérapie concerne également l'inhibition de points de contrôle immunitaires régulant négativement l'activité des LT, notamment les axes inhibiteurs PD-1/PD-L1 et CTLA-4. L'inhibition de ces points de contrôle permet le maintien de l'activité des LT et ainsi l'élimination des cellules leucémiques. Ces points de contrôle et leurs inhibiteurs seront développés dans la suite de ce manuscrit.

Une autre stratégie repose sur la vaccination de peptides antigéniques tels que WT1 afin d'éduquer les LT et leur permettre de reconnaître et éliminer les cellules leucémiques présentant l'antigène spécifique (Greiner *et al.* 2008).

Ces dernières années, le développement de cellules T à récepteur d'antigène chimérique (*chimeric antigen receptor-T*, CAR-T) a émergé. Il s'agit de modifier génétiquement les LT d'un patient *in vitro* afin qu'ils expriment des récepteurs de synthèse liant un antigène tumoral exprimé à la surface des cellules cancéreuses. Ceci permet l'induction de la réponse lymphocytaire contre les cellules leucémiques indépendamment du HLA qui peut être sous-exprimé. À ce jour, des cellules CAR-T ciblant les antigènes CD33 et CD123 qui sont exprimés chez une majorité des patients atteints de LAM sont actuellement en phase d'essai clinique. Cependant, ces antigènes se trouvent être également exprimés par les cellules myéloïdes saines, ce qui peut rendre cette thérapie aspécifique et explique les essais cliniques encore en cours à ce jour (Gill, Maus et Porter 2016 ; Kenderian *et al.* 2015 ; Cartellieri *et al.* 2016).

7. La maladie minimale résiduelle entraîne la rechute chez les patients

7.1 La maladie minimale résiduelle

Malgré 60 à 80% de chance d'obtenir une rémission complète chez les patients de moins de 60 ans après une chimiothérapie intensive, la rechute peut survenir dans 50 à 70% des cas dans un délai de 2 mois à 5 ans, et seuls 30 à 40% des patients de moins de 70 ans survivent 5 ans après le diagnostic (Döhner *et al.* 2017).

Chez les sujets de plus de 70 ans, ou ne pouvant recevoir de traitement intensif, les chances de survie à long terme sont de l'ordre de 10 à 15%. Malgré les thérapies actuelles, ce type de pathologie néoplasique reste donc en 2023 un défi thérapeutique (Döhner *et al.* 2022).

Cette difficulté à maîtriser la maladie s'explique par la présence au sein de la MO de cellules leucémiques résistantes à la chimiothérapie et en nombre suffisamment faible pour qu'elles soient indétectables par les examens de routine : il s'agit de la maladie minimale résiduelle (*minimal residual disease, MRD*). Ces cellules responsables de la MRD sont associées à la résurgence de la maladie qui entraîne la rechute chez les patients (Hackl *et al.* 2015; Shlush *et al.* 2017; Ho *et al.* 2016; Thomas et Majeti 2017) (Schéma 2).

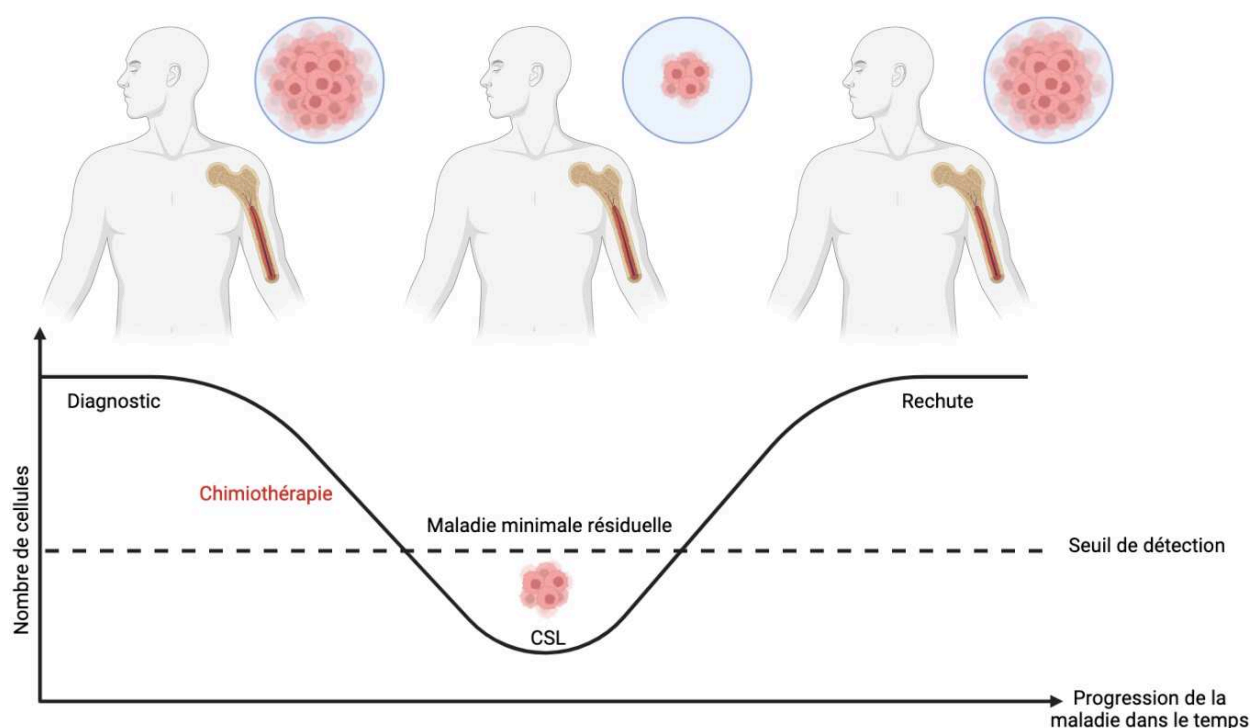


Schéma 2 : Évolution de la LAM au cours du temps. La maladie minimale résiduelle peut survenir après le traitement chimiothérapeutique et la rémission complète. La quantité de cellules en MRD peut se trouver sous les seuils de détection (ligne en pointillés). La MRD

peut induire des rechutes plus ou moins tardives, ou alors les cellules résiduelles peuvent persister en situation d'équilibre avec le système immunitaire.

7.2 Détection de la MRD

Il existe deux approches méthodologiques utilisées dans la détection de la MRD qui diffèrent dans leur sensibilité de détection, à savoir la cytométrie en flux, qui détecte environ 1 cellule sur 10 000 et les techniques moléculaires comme la PCR quantitative en temps réel (*real time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) qui détecte 1 cellule sur 1 million. La MRD peut être évaluée à des moments précoces, notamment après le traitement d'induction et de consolidation afin d'évaluer le statut de rémission et ainsi déterminer la cinétique de la réponse de la maladie. La MRD peut également être évaluée après le traitement de consolidation dans le but de prédire une potentielle rechute.

i. Détection par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une approche détectant les marqueurs phénotypiques aberrants exprimés par les cellules leucémiques résiduelles. Il existe deux stratégies partiellement complémentaires. La première stratégie est l'immunophénotype associé aux leucémies (*leukemia associated immunophenotype*, LAIP) qui est établi à partir du phénotype des cellules leucémiques au diagnostic. Ce phénotype est déterminé par une combinaison unique et spécifique d'antigènes, faisant qu'un LAIP ne décrit pas nécessairement l'ensemble des cellules leucémiques et plusieurs LAIP peuvent être définis pour une LAM. Une modification des LAIP est observée chez 70% des patients après rechute avec un changement complet dans 24% des cas.

La seconde stratégie relève de l'identification d'immunophénotypes différents de la normale (*Different from normal*, DfN) qui sont des combinaisons d'antigènes déterminés sur des échantillons de suivi indépendamment du diagnostic et qui sont donc identiques pour toutes les LAM.

Le statut de rémission évalué par cytométrie en flux est informatif chez 90% des patients atteints de LAM et contribue à la classification du risque de rechute.

ii. Détection par qPCR

La méthode de détection par qPCR permet de détecter l'expression des anomalies cytogénétiques ou des mutations de gènes exprimés par les cellules leucémiques. Chez environ 60% des jeunes adultes, les cellules leucémiques sont informatives pour un marqueur moléculaire qui peut être suivi par des tests de RT-qPCR basés sur l'ARN. Les

marqueurs moléculaires comprennent les gènes mutés comme *NPM1*, les transcrits de fusion comme *MLLT3-KMT2A*, ou les gènes surexprimés comme *WT (Wilms tumor)-1*.

La sensibilité du test dépend de l'expression relative de la cible dans les cellules leucémiques par rapport aux gènes de référence. L'expression élevée du gène muté *NPM1* au sein des cellules leucémiques permet une sensibilité de détection très élevée contrairement à la fusion des gènes *MLLT3-KMT2A* qui offre une sensibilité de détection bien plus faible en raison de la faible expression du gène de fusion. La sensibilité du test varie donc également en fonction de la cible ainsi qu'entre les patients.

Il a récemment été mis en évidence que le gène suppresseur de tumeur *WT1* est surexprimé chez environ 80% des patients atteints de LAM et peut donc être considéré comme une caractéristique spécifique de la LAM. Il a également été montré que les patients présentant des niveaux élevés de *WT1* dans le sang périphérique après traitement chimiothérapeutique rechutaient en moyenne 12 mois après le diagnostic (Ommen *et al.* 2008).

Un seuil de positivité élevé et persistant en RT-qPCR ou un niveau croissant de cellules leucémiques détectées par cytométrie en flux après traitement est prédictif de la rechute et permet de distinguer les probabilités de rechute entre les patients. De plus, la détection de la MRD offre une possibilité d'intervention précoce afin de prévenir la rechute (Döhner *et al.* 2017).

7.3 Les cellules responsables de la MRD et la rechute associée

La détection et le suivi de la MRD sont complexifiés par l'hétérogénéité de la LAM. Différentes possibilités expliquent l'origine des cellules leucémiques responsables de la rechute.

Suite au traitement, les sous-clones leucémiques présentant des aberrations et phénotypes différents au moment du diagnostic peuvent être éliminés, acquérir de nouvelles mutations ou présenter une instabilité antigénique. Ding *et al.* ont montré à l'aide du séquençage et de l'analyse du génome entier que, chez certains patients, la rechute peut être liée à la réapparition du sous-clone majoritairement responsable de la maladie présentant de nouvelles mutations qui témoignent d'une évolution clonale lui permettant d'échapper au système immunitaire (Ding *et al.* 2012).

Chez d'autres patients, le sous-clone leucémique majoritaire a été éliminé grâce à la chimiothérapie et la rechute se caractérise par l'émergence d'un sous-clone qui était minoritaire au diagnostic, chimiorésistant et porteur de mutations déjà présentes au diagnostic (Bachas *et al.* 2012; Hope, Jin, et Dick 2004; Ng *et al.* 2016; Shlush *et al.* 2014).

Le traitement peut également entraîner l'émergence d'un nouveau clone leucémique et il est aussi possible qu'après rémission complète, des sous-clones porteurs des principales mutations récurrentes *DNMT3A*, *NPM1*, *IDH1* et *NRAS*, précurseurs de la maladie, persistent toujours et puissent être la source de réévolutions clonales ultérieures (Kim *et al.* 2016; Genovese *et al.* 2014; Young *et al.* 2016).

Des études restent cependant nécessaires pour définir les mutations comme *DNMT3A* et *IDH1/2* indicatrices de clones leucémiques associés à une rechute parmi les mutations associées aux clones préleucémiques qui sont peu prédictifs de la rechute malgré leur persistance après chimiothérapie et rémission (Döhner *et al.* 2017).

B. Les cellules souches leucémiques : principales responsables du développement de la maladie

1. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) produisent les cellules sanguines tout au long de la vie d'un individu. Elles sont caractérisées par la quiescence, l'auto-renouvellement et la différenciation en plusieurs lignées différentes (van Velthoven et Rando 2019).

Les CSH sont des cellules indifférenciées à longue durée de vie qui sont uniques dans leur capacité à produire par division asymétrique une cellule souche fille afin de maintenir la réserve de cellules souches et une cellule fille qui, après plusieurs divisions, est destinée à se différencier. La quiescence des cellules souches est cruciale pour éviter leur épuisement dans des conditions de stress et pour maintenir un approvisionnement en cellules sanguines matures afin d'assurer la préservation des tissus tout au long de la vie d'un individu (Urbán et Cheung 2021).

Seule une faible quantité de CSH quitte son état de quiescence et entre dans le cycle cellulaire en réponse à un stress hématopoïétiques. Cette entrée dans le cycle cellulaire induit la prolifération et différenciation des CSH dans le but de produire des cellules sanguines matures ou s'autorenouveler afin de reconstituer la réserve de CSH. La quiescence est donc primordiale pour protéger le compartiment de CSH et maintenir la réserve de CSH sur de longues périodes, mais également pour éviter des divisions cellulaires répétées qui induiraient une accumulation de mutations. Une sortie de quiescence par un trop grand nombre de CSH conduit à un épuisement prématuré de la réserve de CSH, une altération de l'auto-renouvellement et un défaut de production de cellules matures, ce qui entraîne *in fine* une défaillance hématologique. Cet équilibre entre

quiescence et prolifération est rigoureusement régulé par des mécanismes intrinsèques aux CSH et par l'interaction de ces dernières avec leur microenvironnement (van Velthoven et Rando 2019; Urbán et Cheung 2021; Boyd et Rodrigues 2018; Wilson et Trumpp 2006; Essers *et al.* 2009).

2. Les cellules souches leucémiques

Les chercheurs Furth et Kahn ont découvert en 1937 que des cellules leucémiques inoculées à des souris étaient capables d'induire la leucémie et la mort en 15 à 50 jours chez 5% des souris. Cela suggère donc que les hémopathies malignes contiennent une sous-population minoritaire de cellules capables de développer la leucémie une fois transplantées dans une souris hôte (Furth *et al.* 1937).

Par la suite, en 1970 Clarkson *et al.* ont mis en évidence l'organisation hiérarchique et la prolifération hétérogène des hémopathies. Les chercheurs ont observé que les CSL à cycle lent résistent à la chimiothérapie et causent la rechute en sortant de leur état de quiescence afin de renouveler les réserves de cellules leucémiques (Clarkson *et al.* 1970). Ces études sont ensuite appuyées par Pierce *et al.* qui ont identifié que, contrairement aux cellules différenciées, seules les cellules indifférenciées peuvent former des tumeurs, ce qui confirme l'hypothèse qu'un sous-ensemble de cellules cancéreuses appelées cellules souches tumorales sont à l'origine de la tumorigénèse (Pierce et Wallace 1971).

Ce sont les chercheurs Lapidot *et al.* qui ont, pour la toute première fois, proposé le concept de cellules souches cancéreuses (CSC) dans les LAM et ont donc identifié les cellules souches leucémiques (CSL). Ensuite, d'autres chercheurs ont prouvé que les CSL jouaient un rôle crucial dans l'oncogénèse, le traitement et le diagnostic de la LAM (Lapidot *et al.* 1994).

Les CSL proviennent soit de CSH normales, soit de cellules progénitrices plus différenciées qui ont acquis des caractéristiques malignes leur permettant de se différencier pour à nouveau présenter les caractéristiques de CSH. L'équipe dirigée par John Dick a été la première à démontrer que les cellules de LAM sont organisées de la même manière hiérarchique que les cellules de l'hématopoïèse normale avec les CSL au sommet de cette hiérarchie (Bonnet D, Dick JE 1997). Les CSL, qui sont majoritairement quiescentes (O'Reilly, Zeinabad et Szegezdi 2021), possèdent une capacité d'auto-renouvellement plus importante que celle des CSH, ce qui entraîne l'expansion rapide de cellules leucémiques plus différenciées et ainsi une importante prolifération cellulaire. Des études ont montré que, lorsque transplantées chez des modèles animaux

immunodéficients, les CSL se logent dans la MO, initient et maintiennent la maladie à long terme en proliférant et générant de nouvelles cellules leucémiques.

Il a également été constaté que ces CSL sont présentes à raison d'une cellule pour 250 000 à 1 000 000 de cellules leucémiques. Différentes études ont démontré la présence de CSC dans divers cancers et confirmé leur rôle dans la résistance aux traitements et le pronostic défavorable des patients (Walcher *et al.* 2020, Huang *et al.* 2020, Eun, Ham et Kim 2017).

La MRD et la rechute associée pourraient être causées par cette population de cellules souches leucémiques présentes en faible quantité au moment du diagnostic mais plus prédominantes à la rechute (Toledo-Guzmán *et al.* 2018; Eun, Ham, et Kim 2017). La recherche de la présence de CSL chez le patient LAM à différents stades de la maladie est réalisée en clinique et, afin d'éradiquer la maladie et atteindre une rémission complète, les traitements doivent donc être capables d'éliminer les CSL et c'est pourquoi, dans le but d'améliorer les chances de survie des patients, il est important de mieux caractériser les mécanismes de régulation de ces dernières (Hope, Jin, et Dick 2004; Krause et Van Etten 2007; Dick 2005).

3. Caractérisation des cellules souches leucémiques

3.1 Caractérisation immunophénotypique des CSL

Les CSL étant responsables de la MRD et de la rechute, il est important de mieux les identifier pour ainsi mieux les cibler lors de la mise en place des traitements thérapeutiques (Hope, Jin, et Dick 2004; Krause et Van Etten 2007). Plusieurs études ont donc identifié une signature spécifique de marqueurs de surface cellulaires exprimés par les cellules leucémiques permettant de les différencier. Cette signature permet de discriminer les cellules leucémiques des cellules normales mais il est toutefois également important de distinguer des cellules leucémiques la sous-population initiatrice de leucémie, les cellules souches leucémiques (Kern *et al.* 2003; Al-Mawali *et al.* 2008).

i. Les cellules leucémiques CD34⁺ CD38⁻ sont enrichies en CSL

Le marqueur de surface cellulaire CD34 est un marqueur exprimé spécifiquement par une population minoritaire de cellules immatures de la MO qui comprend les cellules progénitrices et cellules souches pluripotentes. Il a été montré que 75% des échantillons de patients atteints de LAM présentent une expression positive du marqueur CD34 pourtant présent sur uniquement 10% des cellules leucémiques. Une étude a également mis en

évidence que la capacité d'auto-renouvellement est propre à la sous-population CD34⁺ (Boyd et Rodrigues 2018).

L'expression de CD38 sur la population CD34⁺ permet de discriminer les cellules engagées dans la différenciation. Le phénotype CD34⁺ CD38⁻ définit donc les cellules immatures de LAM comme l'ont montré des études *in vitro* et *in vivo* (Lapidot *et al.* 1994).

Pour la première fois, en 1997, grâce au trieur de cellules par fluorescence (*fluorescence activated cell sorting*, FACS), et en se basant sur l'expression des CSH, Dick *et al.* sont parvenus à isoler au sein des cellules leucémiques une sous-population de cellules CD34⁺ CD38⁻. Les chercheurs Bonnet et Dick ont décrit que seules les cellules leucémiques qui présentent le phénotype CD34⁺ CD38⁻ de manière similaire aux CSH normales ont la faculté d'initier la LAM. Ils les ont donc dénommées les CSL ou cellules initiatrices de la leucémie (Bonnet D, Dick JE 1997).

Pour appuyer ce propos, d'autres études ont montré que la sous-population CD34⁺ CD38⁻ transplantée au sein de souris SCID permet le développement de la LAM chez ces souris. Les cellules de LAM présentant ce phénotype sont donc considérées comme initiatrices de LAM, tandis qu'à *contrario* les populations CD34⁺ CD38⁺ et CD34⁻ n'induisent ni le développement ni la prolifération des cellules leucémiques. De plus, des études *in vitro* témoignent de la résistance à la chimiothérapie des cellules CD34⁺ CD38⁻ à l'inverse des cellules CD34⁺ CD38⁺ (van Rhenen *et al.* 2005; Ishikawa *et al.* 2007; Costello *et al.* 2000).

La sous-population minoritaire et hétérogène de cellules LAM immatures exprimant le phénotype CD34⁺ CD38⁻ a été établie comme étant la population contenant des CSH qui présentent le plus de mutations au diagnostic mais aussi majoritairement présente lors de la rechute (Pollard *et al.* 2006). Plusieurs laboratoires ont montré qu'un taux élevé de CSL CD34⁺ CD38⁻ au moment du diagnostic est corrélé à une évolution défavorable concernant la réponse au traitement et à la survie globale du patient LAM (Bachas *et al.* 2012; Hope, Jin, et Dick 2004; Sarry *et al.* 2011).

Les cellules CD34⁺ CD38⁻ sont donc une sous-population enrichie en cellules chimiorésistantes, initiatrices de la leucémie, capables d'auto-renouvellement et pouvant entraîner la rechute en maintenant une réserve de cellules leucémiques. Le suivi de la LAM est donc réalisé en étudiant majoritairement l'expression du compartiment CD34⁺ CD38⁻ comprenant les CSL de LAM (Thomas et Majeti 2017; Craddock *et al.* 2013; Eppert *et al.* 2011; Pollyea et Jordan 2017).

ii. *Expression des marqueurs extracellulaires CD33 et HLA-DR*

Le marqueur extracellulaire CD33 est un antigène de différenciation myéloïde qui est exprimé durant l'hématopoïèse normale par les précurseurs myéloïdes mais pas les CSH. Au contraire, CD33 est surexprimé par les cellules leucémiques dans 85 à 90% des LAM, bien que les progéniteurs pluripotents leucémiques montrent une plus faible expression de CD33 contrairement aux précurseurs leucémiques qui sont considérés CD33⁺. Cet antigène n'est donc pas complètement spécifique des cellules leucémiques. Cependant, la différence d'expression de CD33 entre les cellules leucémiques et précurseurs myéloïdes normaux, et étant donné qu'il est exprimé par les CSL de la LAM, permet de faire de CD33 la cible dans le développement de traitements de la LAM (Sperr *et al.* 2005; Hamann *et al.* 2002; Thomas et Majeti 2017).

Plusieurs études ont déterminé qu'une grande proportion de cellules CD34⁺ CD38⁻ exprime CD33 (Hauswirth *et al.* 2007). Cependant, une étude intéressante a montré que CD33 est moins exprimé à la rechute comparée au diagnostic et est également moins exprimé par les CSL comparées à la population totale des cellules leucémiques. Dans cette même étude, l'expression de CD33 semble varier en fonction du type de mutations. En effet, CD33 semble être plus fortement exprimé lorsque les cellules expriment *NPM1* muté/*FLT3*, *NPM1* muté/*FLT3-ITD* et *NPM1/FLT3-ITD* que lorsqu'elles expriment *NPM1/FLT3*. Enfin, cette étude montre également que l'expression de CD33 ne diffère pas entre les LAM classées dans les groupes de risques favorables et défavorables (Haubner *et al.* 2019).

Human leukocyte antigen (HLA)-DR est le récepteur de surface exprimé par les cellules cibles présentant l'antigène au récepteur de surface (*T cell receptor*, TCR) du LT lui permettant de reconnaître la cellule cible et de l'éliminer. Une étude a montré que les cellules leucémiques de 21% de patients LAM au diagnostic présentant le phénotype CD33⁺ CD34⁺ n'exprimaient pas HLA-DR (San Miguel *et al.* 1997; Gorczyca *et al.* 2011).

Les mutations génétiques ou l'*immunoediting* des CSL ont entraîné une diminution de l'expression des molécules HLA de classe II et des régulateurs associés nécessaires à la reconnaissance par les LT. Étant donné que les cellules immunitaires éliminent les cellules cancéreuses exprimant fortement le HLA/complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) responsable de la reconnaissance immunitaire, les cellules cancéreuses dont l'expression est réduite ou absente échappent à l'immunosurveillance du SI. Des études ont par ailleurs montré chez des patients LAM la diminution d'expression du HLA/CMH comme étant un mécanisme immunosuppresseur caractéristique des cellules responsables de la rechute (Christopher *et al.* 2018; Zeiser et Vago 2019).

D'autre part, une autre étude a montré qu'une exposition des cellules leucémiques HLA-DR⁻ à l'Ara-C induit l'augmentation de l'expression de leur HLA de type II. L'Ara-C permettrait donc de moduler l'expression de HLA-DR et faciliterait l'élimination des cellules leucémiques (Toffalori *et al.* 2019).

iii. Expression d'autres marqueurs de surface spécifiques des CSL

À cause de l'hétérogénéité des LAM, la caractérisation détaillée des marqueurs de surface des CSL de LAM n'a, à ce jour, toujours pas permis d'identifier un marqueur unique universellement exprimé par les CSL et non par les autres types de cellules leucémiques et CSH normales. De ce fait, cibler en immunothérapie les marqueurs de CSL également présents sur d'autres types cellulaires pourrait causer une toxicité envers les autres cellules non cibles.

Toutefois, certains marqueurs spécifiques des CSL ont été identifiés et observés comme étant soit sous-exprimés comme CD90 et CD117 (Blair et Sutherland 2000), soit surexprimés comme CD123, CD44, CD47, CD69, CD99, CLL-1, CD32, CD25, IL1RAP, GPR5 et CD93 au sein des CSL CD34⁺ CD38⁻ par rapport aux CSH CD34⁺ CD38⁻ normales (Jaiswal *et al.* 2009; van Rhenen *et al.* 2007; Askmyr *et al.* 2013; Anguille, Van Tendeloo, et Berneman 2012).

Ces marqueurs de surface semblent être des cibles prometteuses pour éradiquer les CSL de LAM, comme par exemple le marqueur CD123 qui est un antigène restreint à la lignée et qui a été ciblé avec un anticorps monoclonal. En effet, étant donné que CD123 est préférentiellement exprimé par les CSL CD34⁺ CD38⁻ et non par les CSH normales, cibler ce marqueur a entraîné une diminution du compartiment de CSL injecté à un modèle de xénogreffe (van der Lee *et al.* 2019; Pizzitola *et al.* 2014; Kenderian *et al.* 2015).

De même, le marqueur de surface *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein-3* (TIM-3) est un point de contrôle inhibiteur du SI surexprimé au sein des cellules leucémiques et CSL, permettant ainsi de les discriminer des CSH normales (Jan *et al.* 2011; Kikushige *et al.* 2010).

L'étude de Haubner *et al.* montre cependant une plus faible expression de TIM-3 par les CSL que par la population totale de cellules leucémiques à la rechute comparée au diagnostic. Selon cette même étude, l'expression de TIM-3 ne diffère pas non plus entre les LAM classées dans les groupes de risques favorables et défavorables (Haubner *et al.* 2019).

Malgré les contradictions observées dans la littérature, ce marqueur reste tout de même intéressant pour l'immunophénotypage des cellules leucémiques étant donné son absence d'expression par les CSH normales.

3.2 Caractérisation génétique des CSL

Le suivi de la LAM est réalisé en évaluant l'expression de marqueurs aberrants des cellules leucémiques ou en mesurant l'expansion anormale du compartiment CD34⁺ CD38⁻ contenant les CSL de LAM. L'identification d'un antigène de surface spécifiquement exprimé par les CSL pourrait être exploité pour des approches thérapeutiques en évitant les effets hors cible. Toutefois, l'expression hétérogène de ces marqueurs de surface au sein d'une même sous-population fait qu'un tel marqueur n'a pour le moment pas été identifié.

Les marqueurs antigéniques de la LAM sont classifiés en (i) antigènes restreints au statut de différenciation des cellules, (ii) antigènes associés à la leucémie, c'est-à-dire étant sous ou sur-exprimés par rapport aux cellules normales, comme *WT1* qui est surexprimé dans les LAM, et (iii) antigènes spécifiques de la leucémie, c'est-à-dire issus de mutations comme *NPM1* (Ommen *et al.* 2008).

De nombreux biomarqueurs du cancer reposent sur le profilage mutationnel. Cependant, le haut degré de complexité moléculaire de la LAM représente un défi considérable pour la mise en œuvre clinique de ces approches.

Des études ont montré qu'il existait un lien entre les mutations spécifiques des CSL et les résultats cliniques dans de grandes cohortes de patients LAM. Une première étude a montré que l'expression génique des CSL CD34⁺ CD38⁻ par rapport aux cellules CD34⁺ CD38⁺ et CD34⁻ avait permis d'établir un score de CSL qui était un facteur prédictif de la survie et de l'absence de rechute dans 4 cohortes de patients. Une autre étude a mis en évidence une signature d'expression génétique des CSL avec certains gènes enrichis dans les CSL partagés par les CSH normales comme *HOPX*, *CD34* et *ICAM1*, faisant de cette signature un prédicteur de la survie des patients (Eppert *et al.* 2011; Gentles 2010; Jung *et al.* 2015).

Une autre étude intéressante démontre que, malgré une chimiothérapie basée sur les anomalies cytogénétiques et moléculaires qui définissent les catégories de risques favorables, intermédiaires et défavorables, certains patients ne répondent pas au traitement ou finissent par rechuter malgré l'absence de facteurs de risques défavorables. L'identification de biomarqueurs permettant de discriminer les patients à haut risque est donc nécessaire pour établir les stratégies thérapeutiques. Le taux élevé de rechute en LAM pouvant être attribué à la persistance de CSL possédant des propriétés de résistance comme la quiescence, cette étude s'est focalisée sur les biomarqueurs prédictifs et/ou pronostics liés au phénotype souche des cellules.

Une liste de gènes spécifiquement exprimés de manière différentielle entre les CSL et les cellules leucémiques non souches a donc été établie à partir de cellules de patients atteints de LAM. Le nombre de gènes spécifiques des CSL s'élève à 17 (LSC17) et sont *GPR56*, *AKR1C3*, *CD34*, *NGFRAP1*, *EMP1*, *SMIM24*, *SOCS2*, *CPXM1*, *CDK6*, *KIAA0125*, *DPYSL3*, *MMRN1*, *LAPTM4B*, *ARHGAP22*, *NYNRIN*, *ZBTB46* et *DNMT3B*. Le score LSC17 s'est avéré hautement pronostique dans cinq cohortes indépendantes et a largement contribué à la prédiction précise de la résistance au traitement initial. Les patients présentant un score LSC17 élevé ont obtenu de mauvais résultats avec les traitements actuels, y compris la transplantation de cellules souches allogéniques.

La forte valeur pronostique du score LSC17 pour l'ensemble des différents types de LAM suggère que les perturbations causées par les mutations se combinent à des altérations des propriétés souche qui confèrent une résistance au traitement standard de la LAM (Ng *et al.* 2016).

Néanmoins, des études contradictoires sur le métabolisme montrent toutefois que les cellules de LAM résistantes à la chimiothérapie ne seraient pas enrichies en CSL CD34⁺ CD38⁻ avec une signature de gènes spécifiques mais présenteraient plutôt une signature métabolique spécifique se traduisant par des niveaux élevés de ROS et de phosphorylation oxydative (Farge *et al.* 2017).

4. Les CSL présentent une résistance innée

Les CSC semblent être résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie, une propriété qui explique la récurrence inévitable de la tumeur même après un premier traitement réussi. À l'inverse, l'absence de CSC dans des modèles murins de glioblastome confère à la tumeur une sensibilité à la chimiothérapie, un arrêt de la croissance de la tumeur et prolonge la survie des souris sans régénération apparente du cancer.

Les CSL sont responsables de la MRD et la rechute chez le patient atteint de LAM. L'échappement des CSL au SI et leur persistance après chimiothérapie s'expliquent cependant par leur résistance innée qui se traduit par leur capacité à (i) entrer en quiescence et avoir un cycle cellulaire ralenti, (ii) réduire l'expression de ligands ou récepteurs d'activation comme leur CMH, (iii) augmenter l'expression de ligands inhibiteurs et de transporteurs induisant une résistance aux médicaments et (iv) manipuler les facteurs solubles du microenvironnement (Khaldoyanidi *et al.* 2021; Liu *et al.* 2006; Li *et al.* 2008; Chen *et al.* 2012; Dean 2009; Kusumbe et Bapat 2009; Marieke Alida Gertruda Essers et Trumpp 2010). Les mécanismes précis régulant la résistance innée restent cependant encore peu connus.

4.1 Les CSL sont des cellules majoritairement quiescentes

La dormance cellulaire, ou quiescence est un état non prolifératif où les cellules sont hors du cycle cellulaire mais de manière réversible. La plupart des CSH sont quiescentes afin de prévenir l'épuisement prématuré de cellules souches qui assurent le maintien tissulaire ou tumoral. Une faible proportion de ces CSH peut tout de même sortir de son état de quiescence et entrer dans le cycle cellulaire afin de se développer et se différencier rapidement pour générer des cellules sanguines matures. Toutefois, la majorité des CSH reste quiescente afin d'éviter l'apparition de mutations génétiques et épigénétiques générées par la différenciation et pouvant entraîner le cancer (Boyd et Rodrigues 2018).

La LAM est caractérisée par son haut taux de rechute malgré les traitements établis et le fort de taux de rémission obtenu. Il a été confirmé que les cellules initiatrices de leucémie et qui survivent à la chimiothérapie sont enrichies en une sous-population dormante dans la MO (Saito *et al.* 2010).

Des études indiquent que les CSC survivent aux chimiothérapies qui ciblent les cellules en division en se maintenant en phase G0 du cycle cellulaire, phase de dormance cellulaire. Les CSC pourraient ensuite être activées pour proliférer, ce qui conduirait au phénomène de récurrence. Une autre étude a montré que des CSL quiescentes en phase G0 du cycle cellulaire transplantées dans des souris *non-obese diabetic* (NOD)/*severe combined immunodeficient* (SCID) induisaient le développement de la leucémie. Il semblerait donc que les CSL quiescentes soient responsables de la rechute. De plus, il a aussi été montré qu'après que des souris transplantées aient subi un traitement chimiothérapeutique au 5-fluorouracil, les cellules résistantes identifiées présentaient un potentiel de division fortement diminué.

Des recherches révèlent également que le statut quiescent des cellules de la sous-population CD34⁺ CD38⁻ est confirmé par une signature génétique différente de celle de la sous-population CD34⁺ CD38⁺ (sous-expression des gènes *CREBP*, *FZD5*, *BMPR1A* par exemple)(Cheng *et al.* 2000; Gal *et al.* 2006). Plus récemment, une étude a mis en évidence la présence de CSL CD34⁺ CD38⁻ dans la niche endostéale de la MO d'une souris NOD/SCID γ (NSG) xénotransplantée avec des cellules de LAM. Ces CSL CD34⁺ CD38⁻ étaient majoritairement quiescentes avec 0,5% de cellules en G0 et résistantes à l'Ara-C (Ishikawa *et al.* 2007; Yoriko Saito *et al.* 2010; Thomas et Majeti 2017).

La quiescence, ou dormance cellulaire, est liée à une absence d'expression du marqueur de prolifération Ki67. Contrairement à la sénescence, la quiescence, qui est définie par un arrêt du cycle cellulaire en phase G0, est réversible. Ainsi, une cellule en phase G0 du cycle

cellulaire peut réactiver sa prolifération. La quiescence est donc un mécanisme sous-jacent à la résistance aux traitements chimiothérapeutiques dépendant du cycle cellulaire (Osisami et Keller 2013; Aguirre-Ghiso 2007).

L'équilibre entre la quiescence et la prolifération est contrôlé par des mécanismes intrinsèques aux CSC et des signaux extrinsèques provenant du microenvironnement avec lequel interagissent les CSC et qui instaure une résistance adaptative aux chimiothérapies ainsi qu'aux thérapies ciblées. Ces signaux intrinsèques et extrinsèques contribuent à la MRD et à la rechute après traitement (Malladi *et al.* 2016).

Les principaux mécanismes intrinsèques de la quiescence des CSC sont (i) P53 qui cible P21 pour induire la quiescence et empêcher les cellules de rentrer dans le cycle cellulaire, (ii) l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) et la régulation des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire par l'activation des protéines *forkhead box* (FoxO) en réponse à un stress oxydatif, (iii) la protéine *hypoxia inducible factor* (Hif) 1- α dont le niveau est élevé au sein des CSC quiescentes et qui permet de réguler leur métabolisme et les maintenir en quiescence, et enfin (iv) le facteur de transcription *Nuclear Factor of Activated T cell* (NFAT) qui détermine l'induction de la quiescence ou de la prolifération selon le membre de la famille NFAT activé (Reya *et al.* 2001; Wilson et Trumpp 2006; Y. Liu *et al.* 2009; Spradling, Drummond-Barbosa, et Kai 2001; Tothova *et al.* 2007; Takubo *et al.* 2010; Patterson *et al.* 2021; Dick 2008).

4.2 Les CSL présentent une forte activité de la pompe d'efflux ABCB1

Ce qui distingue les CSC des autres types de cellules est leur caractéristique fonctionnelle identique à celle des cellules souches normales qui est la surexpression de pompes d'efflux. Ces dernières leur permettent d'exclure les drogues plus efficacement que les cellules non souches. Ces cellules résistantes surexpriment les transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC) et notamment ABCB1 (MDR1) pour les CSL. La famille de transporteurs ABC regroupe des transporteurs transmembranaires de la membrane plasmique qui agissent comme des pompes ATPases capables d'expulser des molécules endogènes ou substances exogènes grâce à l'énergie fournie par l'ATP.

Le test d'efflux de colorant fluorescent Rhodamine 123 (Rh123) permet de mettre en évidence l'activité de ces pompes et d'identifier la sous-population qui les surexprime et excluent donc ce colorant. Les CSL normales et cellules leucémiques quiescentes ont été identifiées comme étant des cellules à faible rétention de Rh123 et sont donc enrichies en pompes d'efflux. De plus, des études semblent montrer que le niveau d'expression de

MDR1 serait corrélé à la MRD et la rechute associée du patient LAM (Boyer *et al.* 2019; Touil *et al.* 2013; Sharom 2011; Al-Mawali, Gillis, et Lewis 2009).

4.3 Les CSL expriment le ligand inhibiteur PD-L1

Les points de contrôle immunitaires permettent la régulation des fonctions effectrices des cellules du système immunitaire comme les *natural killer* (NK) et les LT. Les molécules inhibitrices comme *programmed cell death protein 1* (PD-1, B7), *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* (CTLA-4), *lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3) ou *T-cell immunoglobuline and mucin-domain containing-3* (TIM-3) jouent un rôle dans l'équilibre du SI.

L'axe de PD-1 et son ligand *programmed death ligand 1* (PD-L1, B7-H1 ou CD274) a d'abord été observé comme système de régulation des LT par les cellules dendritiques. En effet, PD-1 est exprimé par le LT et PD-L1 par la cellule dendritique dans le but de rétrocontrôler l'activité des cellules du système immunitaire en prévention de l'autoimmunité. Bien que PD-1 soit une cible connue de NFAT, l'induction de l'expression de PD-L1 par NFAT reste une hypothèse encore aujourd'hui (Ritprajak et Azuma 2015).

L'une des propriétés majeures de résistance innée au SI et aux chimiothérapies des cellules leucémiques, et plus particulièrement des CSL, est la surexpression des ligands des points de contrôle immunitaires des LT. Cette surexpression est d'ailleurs encore plus marquée en rechute. Dans les LAM, l'axe de régulation immunitaire PD-1/PD-L1 est l'axe majoritairement étudié (Kikushige *et al.* 2010; Yang *et al.* 2014; Lichtman *et al.* 2021; X. Chen *et al.* 2008; Graf *et al.* 2005; Herbst *et al.* 2014).

PD-L1 et PD-L2 sont des ligands de PD-1. La molécule PD-L1 est une protéine transmembranaire codée par le gène 274 et exprimée par les LT, LB, cellules dendritiques, macrophages, cellules souches mésenchymateuses et d'autres cellules non hématopoïétiques comme les cellules endothéliales. L'expression de PD-L2 est, quant à elle, restreinte à moins de types cellulaires comme les cellules dendritiques et les macrophages (Freeman *et al.* 2000; Currie *et al.* 2009).

L'expression de PD-L1 a été observée comme étant augmentée dans les cancers et associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs solides et les LAM mais, concernant PD-L2 les informations restent encore limitées à ce jour, bien que ce ligand ait également été observé dans certains cancers. PD-L1 est exprimé constitutivement dans 30 à 60% des cellules de LAM selon les patients et une étude a montré que le taux d'expression de PD-L1 dans les cellules de LAM varie de 18 à 50% dans le sang périphérique et dans la MO. Cette expression est augmentée au moment de la rechute par rapport à celle observée au

diagnostic et est associée à un mauvais pronostic (Berthon *et al.* 2010; X. Chen *et al.* 2008; L. Chen 2004; Ishida *et al.* 2002; Hino *et al.* 2010; Hamanishi *et al.* 2007).

L'augmentation de l'expression des ligands inhibiteurs du SI à la surface des cellules de LAM est identifiée comme un mécanisme d'échappement immunitaire dans la rechute post-transplantation allogénique de CSH et est corrélée avec une augmentation du pronostic défavorable (Jinesh *et al.* 2017; Wu *et al.* 2017; Greiner *et al.* 2017; Brodská *et al.* 2019; Toffalori *et al.* 2019; Williams *et al.* 2019; Zajac *et al.* 2018; Norde *et al.* 2011).

Des études ont mis en évidence une augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules CD34⁺ dans les LAM comparées à des cellules normales, ce qui est associé à un pronostic défavorable. Cependant, d'autres études n'ont pas trouvé de corrélation entre l'expression de PD-L1 et la forte expression de CD34 (Yang *et al.* 2014; Brodská *et al.* 2019).

De nombreux types de LAM présentent une surexpression de PD-L1, notamment les LAM *NPM1* muté comparées à des LAM *NPM1* non muté. De même, l'expression de PD-L1 a été détectée comme étant généralement plus élevée au sein des cellules souches CD34⁺ CD38⁻ de LAM *NPM1* muté comparée à la LAM *NPM1* non muté. Cela valide probablement l'hypothèse selon laquelle les réponses immunitaires dirigées par *NPM1* jouent un rôle dans l'immuno-échappement des cellules tumorales *via* l'expression de PD-L1. Cibler *NPM1* prodiguerait donc peut-être une immunothérapie individualisée prometteuse pouvant être associée aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires PD-1/PD-L1 afin d'améliorer la réponse immunitaire (Greiner *et al.* 2017).

La liaison de PD-L1, ligand exprimé par les cellules leucémiques, avec son récepteur PD-1 exprimé à la surface des LT permet d'inhiber l'activité de ces derniers en inhibant leur prolifération et sécrétion de cytokines cytotoxiques pour ainsi échapper à la lyse cytotoxique du SI (Berthon *et al.* 2010; Xueyan Chen et Cherian 2017).

Cette hypothèse a été soutenue par des modèles expérimentaux de dormance tumorale comme la souris leucémique DA1-3b qui présente des cellules cancéreuses dormantes surexprimant le ligand immuno-régulateur PD-L1 qui se lie à PD-1 exprimé à la surface des LT afin d'inhiber leur activation et réponse immunitaire (Keir *et al.* 2008).

Dans un modèle murin de dormance leucémique syngénique, il a également été mis en évidence que la surexpression de PD-L1 par des cellules leucémiques résiduelles leur permet de résister à la lyse cytotoxique induite par les LT CD8⁺. Dans le même sens, des études ont montré que les CSC, dont les CSL, exprimaient PD-L1, favorisant ainsi leur échappement à la réponse lymphocytaire T cytotoxique (Saudemont et Quesnel 2004; Jinesh *et al.* 2017; Wu *et al.* 2017; Dhodapkar *et al.* 2015; Greiner *et al.* 2017).

De manière intéressante, des études ont aussi montré que l'expression de PD-L1 pouvait dépendre du statut quiescent ou prolifératif de la cellule tumorale. L'étude de Payne *et al.* a démontré que les cellules Ki67^{low} présentant un cycle cellulaire ralenti sont plus susceptibles de surexprimer PD-L1 que les cellules quiescentes Ki67⁻. Cette modulation de l'expression de PD-L1 permet donc aux cellules d'échapper ou non à la lyse cytotoxique par les cellules du SI (Payne *et al.* 2016).

4.4 Les CSL et le facteur de transcription NFAT

Plusieurs facteurs de transcription jouent un rôle clé dans le destin des cellules souches, dont la famille de facteurs de transcription NFAT avec NFATc1 (NFAT2, NFATc), NFATc2 (NFAT1, NFATp), NFATc3 (NFAT4, NFATx) et NFATc4 (NFAT3). Ces protéines NFAT possèdent deux domaines conservés : le domaine de liaison à l'ADN (*DNA binding domain*, DBD), qui est le domaine caractéristique de la famille NFAT, et le domaine régulateur N-terminal sensible au calcium (Ca²⁺), appelé région d'homologie NFAT (*NFAT homology region*, NHR). La différence entre les membres NFAT réside dans les structures N et C terminales (Rao, Luo, et Hogan 1997; Vihma, Pruunsild, et Timmusk 2008).

Les protéines NFAT sont des facteurs de transcription dont l'activité de NFATc1 à 4 est régulée par le calcium tandis que NFATc5 répond au stress osmotique. La forme inactivée de NFATc1 à 4 réside dans le cytoplasme sous la forme phosphorylée et une activation de récepteurs de surface couplés au calcium comme des récepteurs tyrosine kinase déclenchent la cascade de signalisation *via* la phospholipase C (PLC) qui induit un influx calcique par entrée capacitive de calcium (*store-operated calcium entry*, SOCE). En réponse à la forte concentration de calcium, la calmoduline active des enzymes cibles comme la calcineurine et la calmoduline kinase (CAMK). La calcineurine se fixe à NFAT au niveau de ses motifs peptidiques PxxIT et retire les phosphatases. Le changement de conformation qui fait suite à sa déphosphorylation expose un signal de localisation nucléaire de NFAT. La forme déphosphorylée de NFAT est ainsi capable d'aller au noyau pour se lier à l'ADN mais cette liaison est souvent faible et c'est pourquoi NFAT se dimérise avec divers partenaires comme les protéines *Activator protein 1* (AP-1) Fos et Jun afin de réguler la transcription et induire la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines et de molécules d'adhésion. Les protéines NFAT peuvent interagir avec d'autres facteurs de transcription, soit pour amplifier, soit pour réprimer l'action des NFAT (Macian 2005; H. Wu *et al.* 2007; Badran *et al.* 2002; H. Li, Rao, et Hogan 2011).

Des inhibiteurs de la calcineurine ont été développés comme la cyclosporine (CsA) ou tacrolimus (FK506) dans le cas de rejets de greffe après une transplantation afin de contrer

les effets immunosuppresseurs du SI, mais aussi pour inhiber la transcription de cytokines dépendantes de NFAT. Plus récemment, le peptide VIVIT a été développé pour se lier directement au site de fixation PxxIT de la calcineurine sur NFAT afin d'obtenir une inhibition plus sélective (Gwack *et al.* 2007; Gabriel *et al.* 2016).

À ce jour, NFAT a majoritairement été étudié au sein de cellules de la lignée myéloïde normale et peu d'équipes ont étudié l'implication de NFAT dans les LAM. Une étude récente a montré une surexpression des isoformes NFATc2 et NFATc3 dans la LAM à la rechute comparée au diagnostic. De même, il a été montré que les LAM avec une mutation *FLT3-ITD* (25% des cas de LAM) présentent une activation constitutive de NFATc1 qui confère une résistance accrue à la chimiothérapie (Patterson *et al.* 2021; Metzelder *et al.* 2015).

D'autres études ont montré que l'expression de NFAT est plus élevée chez les cellules indifférenciées CD34⁺ que chez les cellules différenciées de la lignée myéloïde. Le chercheur Kiani et son équipe a montré que NFATc1 à 3 mais pas NFATc4 étaient exprimés dans les cellules CD34⁺ de manière altérée dans la lignée myéloïde. NFATc2 est moins exprimé dans les cellules différenciées de la lignée myéloïde à l'inverse de NFATc1 et 3 qui voient leurs expressions augmentées chez les cellules différenciées. De plus, l'inhibition de la signalisation NFAT-calcineurine avec la CsA permet la différenciation de CSH CD34⁺ en neutrophiles, ce qui suggère que la famille NFAT est responsable de la régulation de la différenciation chez les cellules normales (Patterson *et al.* 2021; Kiani *et al.* 2007; 2004).

Le cycle cellulaire est régulé par des complexes protéiques composés de cyclines et de kinases dépendantes des cyclines (*cyclin-dependant kinases*, CDK). L'activité des cyclines et CDK est contrôlée en réponse à un stimuli et contrôle la progression du cycle cellulaire. Un article publié dans *Cell* qui étudie les cellules souches du follicule pileux a identifié la voie de signalisation NFAT-calcium-CDK4 comme un régulateur central de la quiescence des cellules souches. NFATc1 serait surexprimé au sein de ces cellules souches et responsable de l'inhibition de la CDK4 qui est nécessaire pour la progression du cycle cellulaire en phase G1/S du cycle cellulaire. NFATc1 est donc responsable de la quiescence de ces cellules et une inhibition de NFATc1 induit l'augmentation du niveau d'expression de CDK4 et la prolifération des cellules (Horsley *et al.* 2008).

Des études effectuées sur des tumeurs solides ont mis en avant le rôle de la famille NFAT dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose en décrivant NFAT comme régulateur majeur de gènes tels que P21, *c-myc*, Fas ligand et *Tumor necrosis factor* (TNF)- α . En effet, la surexpression de NFATc2 semble induire l'apoptose et réprimer le cycle cellulaire. La dérégulation de NFATc2 dans les cancer contribue à la survie des cellules cancéreuses, bien que des études contradictoires indiquent des effets anti-apoptotiques de NFATc1 qui

permettrait la prolifération et la répression de la mort cellulaire (Robbs *et al.* 2008; Mognol *et al.* 2012, 2016; Robbs, Lucena, et Viola 2013; Caetano *et al.* 2002).

Malgré ces études sur les rôles distincts et parfois opposés des différents membres de la famille NFAT sur l'apoptose et le cycle cellulaire, ces données suggèrent que les différents membres NFAT régulent les mécanismes apoptotiques et peuvent permettre la survie des cellules tumorales.

Dans les LAM, le rôle de NFAT en fonction des membres, des isoformes et des co-activateurs dans l'induction de la quiescence, la survie ou la balance entre prolifération et différenciation n'est pas élucidé. Chaque membre de la famille NFAT peut contribuer de manière différentielle à la pathogénèse de la LAM et devrait être étudié indépendamment des autres membres.

Aussi, les voies de signalisation en amont de NFAT peuvent jouer un rôle dans le devenir de la cellule. Il a notamment été montré qu'en fonction de l'isoforme de la phospholipase C, NFAT induisait soit la quiescence (PLC γ 1), soit la différenciation (PLC γ 2) des cellules. L'activité de NFAT ou sa dérégulation peuvent donc diriger les cellules vers la quiescence en inhibant le cycle cellulaire ou favoriser la différenciation selon la voie cellulaire activée en amont (Patterson *et al.* 2021) (Schéma 3).

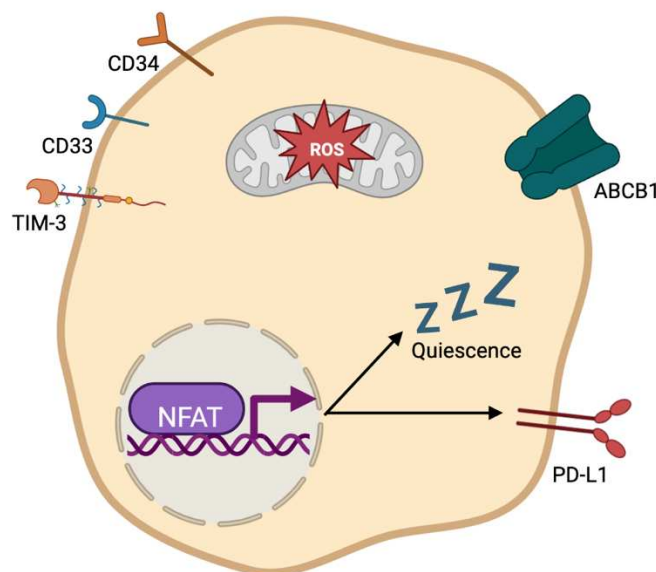


Schéma 3 : Résistance innée de la CSL. La résistance innée des CSL se traduit par leur capacité à entrer en quiescence, réduire l'expression de leur CMH/HLA-DR, augmenter l'expression de molécules inhibitrices comme TIM-3 et PD-L1 ainsi que des pompes d'efflux ABCB1 afin d'exclure plus rapidement les molécules chimiothérapeutiques. Le facteur de transcription NFAT détermine l'induction de la quiescence et module l'expression de PD-L1.

5. Les CSL présentent une résistance adaptative grâce à leurs interactions avec le microenvironnement tumoral

La LAM a deux environnements distincts : le sang périphérique et la moelle osseuse. En plus de la résistance innée, les CSL peuvent présenter une résistance adaptative en interagissant avec les cellules présentes dans le microenvironnement. Les CSL résident principalement dans la MO où un environnement immunosuppresseur leur permet d'être protégées du SI.

5.1 Le microenvironnement tumoral

La MO est composée par plusieurs cellules : les cellules endothéliales, les cellules stromales et les cellules immunitaires comme les NK, les LT cytotoxiques, les LT régulateurs (Tregs) et les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC). Ce microenvironnement évolue en fonction de la présence de cellules tumorales et participe à la rechute en les protégeant des traitements : il s'agit du microenvironnement tumoral (Khaldoyanidi *et al.* 2021).

Le microenvironnement étant composé de cellules hétérogènes et interagissant avec les cellules cancéreuses et CSC, il joue un rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses et la cancérogénèse, et présente des mécanismes extrinsèques régulant la quiescence (Hanahan 2022).

Ce microenvironnement tumoral présente une réduction de l'activité des LT cytotoxiques et des NK ainsi qu'une accumulation de Tregs et MDSC. Également, en réaction contre les cellules leucémiques, les cellules immunitaires sécrètent des cytokines inflammatoires comme l'interféron (IFN)- γ dans le microenvironnement, ce qui favorise l'expression de molécules inhibitrices à la surface des cellules leucémiques.

La plupart des CSC résident dans des zones hypoxiques près de la surface des os et loin des capillaires, ce qui laisse supposer que les zones hypoxiques sont importantes pour la diminution de la prolifération des CSC. En effet, un microenvironnement hypoxique confère des caractéristiques intrinsèques de dormance aux cellules leucémiques qui peuvent rester dormantes puis entrer dans le cycle cellulaire, proliférer et induire la rechute (Wang *et al.* 2015; Calvi *et al.* 2003; Shiozawa *et al.* 2008; Fluegen *et al.* 2017).

5.2 La niche ostéoblastique

En 1978, le chercheur Schofield a suggéré que les CSH interagissaient avec des facteurs de régulation et signaux dans une niche spécialisée. Ces niches spécialisées sont situées dans la MO près de l'endoste, qui est une surface interne située à l'interface entre l'os et la moelle. L'endoste est constitué d'ostéoblastes et ostéoclastes et forme la niche ostéoblastique, tandis que l'endothélium forme la niche vasculaire avec les cellules vasculaires et périvasculaires qui interviennent également dans les interactions de la niche. Dans des conditions normales, les CSH normales dépendent de ces interactions avec les niches ostéoblastique et vasculaire de la MO qui sont essentielles à leur survie, prolifération et différenciation. Cependant, le remodelage du microenvironnement que forment ces niches est régulièrement observé dans les tumeurs malignes (Schofield R. 1978).

Dans la LAM, les cellules leucémiques résident majoritairement dans la MO où leur croissance perturbe les niches de la MO des CSH normales et créent un microenvironnement hospitalier qui leur permet de communiquer par le biais de cytokines et chimiokines avec les autres cellules. Ces signaux influencent la capacité des CSL à s'autorenouveler, maintenir leur quiescence et empêcher l'apoptose. Les interactions avec le microenvironnement permettent donc aux CSL de se protéger du SI (Schepers, Campbell, et Passegué 2015; Colmone *et al.* 2008).

Des études ont en effet démontré que des CSL injectées par voie intraveineuse se logent, se greffent et résident dans la région endostéale. Ceci est dû à la signalisation coordonnée de chimiokines et molécules d'adhésion par les cellules du microenvironnement modifié en faveur des cellules leucémiques. Le dialogue entre les cellules initiatrices de la leucémie et le microenvironnement tumoral dans lequel elles résident a donc un impact sur la régulation de la dormance cellulaire et contribue à la résistance aux chimiothérapies (Nurieva, Liu, et Dong 2011; Roboz et Guzman 2009; Konopleva et Jordan 2011; Zhang *et al.* 2003).

La niche ostéoblastique, qui est composée d'ostéoblastes et ostéoclastes, maintient les CSL en quiescence et aide à leur adhésion au sein de la niche car une étude a montré que la déplétion d'ostéoblastes réduit la cellularité de la MO et induit une hématopoïèse extramédullaire. Les ostéoblastes sécrètent des facteurs tels que le facteur de cellules souches (*stem cell factor*, SCF), l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et la thrombopoïétine (TPO) qui permettent d'interagir avec les CSH. Le maintien des CSL dans la niche ostéoblastique s'explique par l'axe *CXC chemokine ligand 12* (CXCL12)- *CXC chemokine receptor type 4* (CXCR4) où CXCL12 est exprimé par les ostéoblastes et CXCR4 par les CSL. CXCR4 est associé au maintien du phénotype souche des cellules leucémiques et l'expression de CXCL12 par les ostéoblastes attire ces CSL vers les niches de la MO. L'enrichissement en

molécules d'adhésion a été documenté dans la signature de la quiescence des CSH (Visnjic *et al.* 2004; Thorén *et al.* 2008; Czechowicz *et al.* 2007; Roato et Ferracini 2018).

Les cellules de la niche ostéoblastique sécrètent également la *bone morphogenic protein* (BMP) qui permet aux CSH de rester quiescentes car il a été montré qu'une inhibition de cette protéine entraîne une activation des CSH et leur prolifération (Kobiela *et al.* 2007; Mira *et al.* 2010).

5.3 La niche vasculaire

La niche vasculaire, quant à elle, permettrait aux cellules leucémiques de se diviser activement. Des études ont montré que les MDSC se retrouvent en plus grand nombre chez les patients LAM et induisent une tolérance aux LT *via* des mécanismes comme PD-L1, l'arginase, l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), un excès de ROS ou encore de multiples cytokines comme le *tumor growth factor* (TGF)- β et l'interleukine (IL)-10 (Curti *et al.* 2009).

De plus, la présence de MDSC est corrélée avec un plus grand nombre de LT régulateurs, indiquant un potentiel rôle dans la progression de la maladie (Ustun *et al.* 2011; Szczepanski *et al.* 2009; Delia *et al.* 2018; Sun *et al.* 2015; Lu et Gabrilovich 2012).

5.4 L'interaction avec les lymphocytes T

Les interactions entre les cellules de LAM et le SI créent un environnement immunosuppresseur avec une diminution, voire suppression, des fonctions cytotoxiques des LT et une augmentation de l'activité des cellules de l'immunité régulant le SI.

Les LT sécrètent des cytokines dont l'IFN γ et des études ont observé après un traitement à l'IFN γ une augmentation de l'expression du ligand PD-L1 à la surface des cellules leucémiques mais pas à la surface de cellules normales (Berthon *et al.* 2010; Krönig *et al.* 2014). La sécrétion d'IFN γ par les LT dans le microenvironnement tumoral semble donc induire la résistance des cellules leucémiques au SI *via* l'activation de l'axe PD-1/PD-L1.

Les Tregs modulent l'immunosuppression à travers la production de cytokines inhibitrices comme l'IL-10 et le TGF- β . À terme, cela module la prolifération des LT et augmente leur apoptose. La présence de Tregs est généralement augmentée dans les LAM et est liée à un mauvais pronostic car ils semblent être chimiorésistants et contribuer à la rechute. De plus, l'expression de PD-L1 joue également un rôle dans l'induction et le maintien des Tregs, ce qui augmente l'immunosuppression au niveau de l'organisme (Francisco *et al.* 2009; Lichtenegger *et al.* 2014).

Les stimuli reçus et changements dans les signaux des niches tumorales modulent la quiescence et l'immunoéchappement des CSL. Les interactions entre le microenvironnement tumoral hautement protecteur et les CSL sont donc cruciales pour le maintien des CSL en dormance sur une plus ou moins longue période et ces mêmes interactions peuvent également leur permettre de sortir de quiescence afin de reprendre leur croissance et proliférer pour induire la rechute (Spradling, Drummond-Barbosa, et Kai 2001; Kopp *et al.* 2005).

Au moment du diagnostic, les cellules peuvent déjà se disséminer dans les organes secondaires sous la forme de cellules quiescentes. Le blocage des interactions avec le microenvironnement immunosuppresseur comme traitement thérapeutique serait donc une stratégie prometteuse pour perturber le cycle des CSL et ainsi entraîner leur élimination (Dean, Fojo, et Bates 2005; Lane, Scadden, et Gilliland 2009) (Schéma 4).

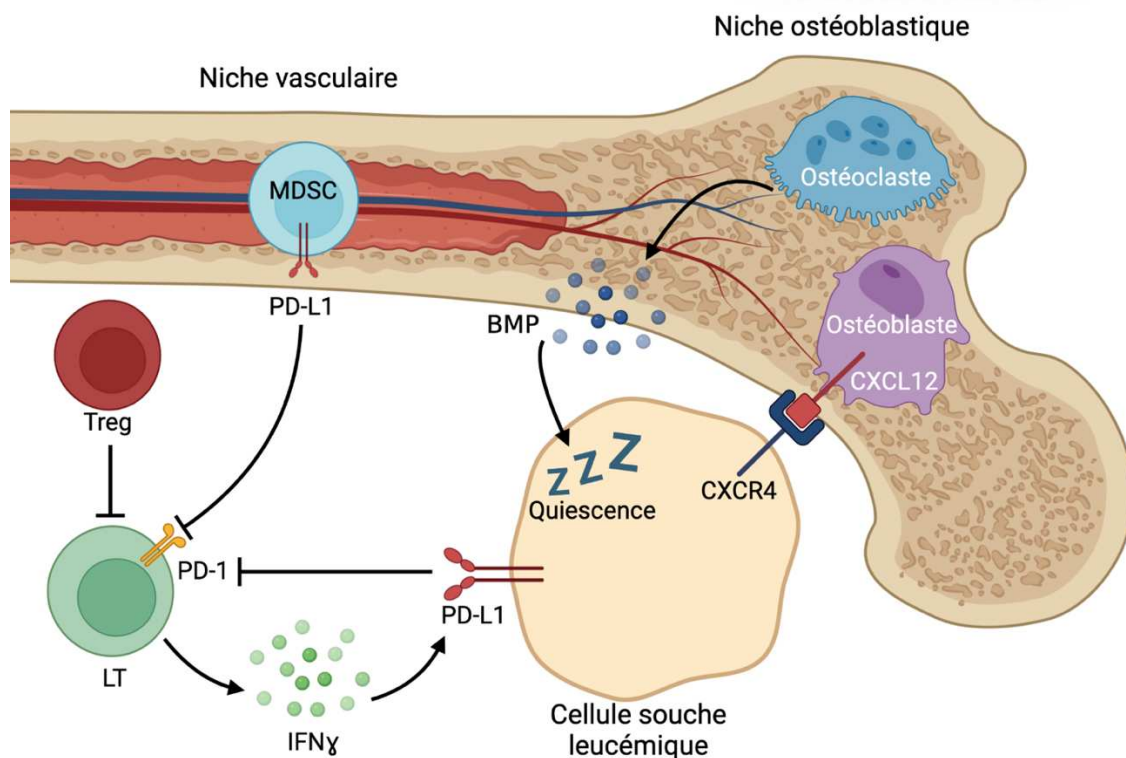


Schéma 4 : Résistance adaptative de la CSL. Les CSL résident dans un microenvironnement tumoral situé au niveau de la niche vasculaire et la niche ostéoblastique. Le microenvironnement tumoral est composé de cellules qui inhibent les fonctions immunitaires des LT comme les Tregs et les MDSC. Les ostéoblastes de la niche ostéoblastique expriment CXCL12 qui, en se liant au récepteur CXCR4 des cellules leucémiques, permet l'adhésion des cellules leucémiques à la niche. L'expression de PD-L1 est induite par l'IFN γ sécrété par les LT et favorise l'échappement immunitaire. Parmi les régulateurs de la quiescence des CSL, la BMP sécrétée par les ostéoclastes est un régulateur positif de la quiescence des CSL.

C. L'équilibre fragile résultant de l'interaction entre le système immunitaire et les cellules leucémiques

1. Rôle du système immunitaire dans le contrôle des cellules tumorales

1.1 *Le SI induit la dormance immunologique des cellules tumorales*

Les cellules tumorales présentent des altérations de leurs processus cellulaires et génétiques et expriment des néoantigènes tumoraux absents des cellules normales. Les néoantigènes sont présentés à la surface des cellules tumorales par leur CMH et peuvent ainsi induire des réponses immunitaires anti-tumorales par le biais d'une cytotoxicité médiée par les LT. Le degré d'affinité de liaison du TCR pour le néoantigène détermine l'intensité de réponse du LT, c'est-à-dire sa capacité à assurer des fonctions effectrices antitumorales. Cependant, les cellules cancéreuses peuvent moduler et diminuer l'affinité de leurs néoantigènes afin d'empêcher l'activation du LT, diminuer son activité cytotoxique et réaliser l'échappement tumoral. Ainsi, le système immunitaire a un impact majeur sur la prolifération et progression tumorale en reconnaissant ces néoantigènes tumoraux (Sim *et al.* 2020; Poole *et al.* 2022; T. Liu *et al.* 2021).

Il existe 3 types d'interactions entre le SI et les cellules cancéreuses. Le SI est capable de (i) contribuer de manière active à l'élimination des cellules tumorales, (ii) contrôler leur croissance : il est question d'équilibre ou de dormance immunologique ou (iii) perdre le contrôle des cellules tumorales et elles sont alors capables de réaliser l'immuno-échappement.

La dormance tumorale, dite dormance immunologique, est caractérisée par la persistance de cellules tumorales résiduelles pendant des périodes prolongées sans réapparition de la maladie. Cet état a été précédemment défini comme la MRD et la contribution du système immunitaire à ce phénomène de MRD a été décrite dans différents modèles expérimentaux de cancers. En effet, le SI adaptatif peut maintenir les cellules tumorales dans un état de quiescence (qualifié de dormance cellulaire) ou contrôler leur croissance en les maintenant dans un état d'équilibre entre la lyse cytotoxique et la prolifération. Le SI peut également remodeler les cellules tumorales mais cette pression continue et sélective peut conduire à une phase d'échappement tumoral (Ross 2007; MacKie, Reid, et Junor 2003).

Le rôle actif du SI sur le contrôle de la croissance des cellules tumorales et la sortie de leur état de dormance immunologique a été observé dans le cas de transplantations non intentionnelles de cellules tumorales dormantes. Des organes de donneurs en rémission complète d'un mélanome depuis des décennies (Kauffman, McBride, et Delmonico 2000) ou sans aucun antécédent de cancer (Myron Kauffman *et al.* 2002) ont été transplantés à des patients immunodéprimés. Les patients receveurs ont alors développé des cancers car la déficience de leur SI a permis la sortie de dormance immunologique des cellules tumorales nichées dans les organes des donneurs. Ces derniers ne manifestaient aucun signe clinique de maladie car leur SI actif contrôlait la dormance immunologie des cellules tumorales et empêchait leur prolifération.

Une autre étude a montré dans un modèle animal que la dissémination précoce des cellules résiduelles de mélanome avant le développement de la tumeur primaire entraînait leur persistance dans les organes dans un état quiescent. Les cellules résiduelles sont contrôlées par le SI, ce qui mène à un état d'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Foltys *et al.* 2009; Baccarani *et al.* 2010; Brewer *et al.* 2009; Shankaran *et al.* 2001).

1.2 Les LT CD8⁺ contrôlent la dormance immunologique des cellules tumorales

Le SI joue donc un rôle crucial dans le contrôle des cellules tumorales et des modèles expérimentaux ont montré l'implication du SI adaptatif, et surtout des LT CD8⁺. En comparant des souris immunodéficientes à des souris immunocompétentes, il a été observé qu'une déplétion des LT CD8⁺ entraînait un réveil des cellules persistantes dormantes, aboutissant alors à une croissance tumorale (Dighe et Old, 1994). Le rôle des LT CD8⁺ dans le contrôle de la croissance a également été mis en évidence dans une autre étude où la déplétion de ces LT CD8⁺ a provoqué une croissance de métastases pulmonaires (Eyles *et al.* 2010).

1.3 L'IFN γ sécrété par les LT CD8⁺ influe sur la quiescence des cellules tumorales

L'étude d'un modèle de lymphome murin montre que la sécrétion de cytokines comme l'IFN γ par les LT CD8⁺ situés dans le microenvironnement de la MO pouvait induire la quiescence des cellules tumorales (Farrar *et al.* 1999). L'équipe de Braumüller a par la suite mis en évidence que l'arrêt du cycle cellulaire de cellules tumorales du pancréas était induit

par l'IFN γ et le TNF- α *in vitro* et *in vivo* (Braumüller *et al.* 2013). De la même manière, dans un modèle de lymphome, le contrôle de la croissance tumorale au niveau de la MO a été observé comme étant modulé par l'IL-2, l'IFN γ et le TNF- α qui sont sécrétés par les LT CD8⁺ mémoires et les macrophages (Shankaran *et al.* 2001; Street, Cretney, et Smyth 2001; Street *et al.* 2002).

L'IFN γ illustre donc le lien étroit entre la quiescence et la dormance immunologique puisque c'est une cytokine pouvant induire la quiescence des cellules tumorales mais aussi capable de contribuer à leur résistance adaptative en augmentant l'expression du ligand inhibiteur PD-L1 pour épuiser les LT et réaliser l'immuno-échappement (Berthon *et al.* 2010; Krönig *et al.* 2014).

Les cellules tumorales peuvent donc persister lorsqu'un équilibre est établi entre la croissance tumorale et la réponse immunitaire médiée par les LT. Néanmoins, les mécanismes régissant le contrôle de la croissance et l'induction de la quiescence des cellules tumorales demeurent encore inexplorés. Ces observations montrent toutefois clairement l'implication du SI adaptatif dans (i) le contrôle de la croissance des cellules tumorales en les maintenant en dormance et (ii) la sortie de leur état de dormance dans un contexte d'immunosuppression (Payne *et al.* 2016; Yoyen-Ermis *et al.* 2019; Rettig *et al.* 2017).

2. Activation des LT CD8⁺

2.1 La cascade de signalisation induite par la reconnaissance antigénique via la voie du TCR est dépendante du Ca²⁺

i. La liaison du TCR au CMH

Un système immunitaire fonctionnel reconnaît et élimine les cellules tumorales grâce aux cellules immunitaires adaptatives et majoritairement les LT CD8⁺ cytotoxiques. Les LT CD8⁺ sont activés et peuvent proliférer grâce à la voie de signalisation du TCR après reconnaissance d'un peptide antigénique spécifique.

Contrairement à la plupart des récepteurs de surface qui reconnaissent un seul ligand, les TCR sont capables de reconnaître avec une affinité spécifique différents ligands comme des peptides du soi et des peptides étrangers. Ces peptides antigéniques sont présentés au LT *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de la cellule présentatrice d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques. Les peptides antigéniques présentés par le CMH se lient aux molécules TCR et CD3 du LT, ce qui déclenche un signal par les voies dépendantes des kinases qui peuvent différer selon l'affinité de l'interaction TCR-

CMH. C'est l'étape initiale de l'activation de la cascade de signalisation du TCR qui permet ainsi au LT d'adapter sa réponse biologique au ligand rencontré (Birnbaum *et al.* 2014).

La réticulation du complexe TCR-CD3 et du co-récepteur CD8 entraîne la phosphorylation de la tyrosine des domaines intracellulaires du complexe TCR-CD3 par les kinases LCK et FYN. La LCK phosphoryle la kinase *zeta-chain-associated protein kinase 70* (ZAP70) qui est ensuite recrutée par le CD3. ZAP70 phosphoryle à son tour LAT et permet l'association de CRB2 et PLC γ 1. Cette association favorise l'activation des MAPK ERK et JNK ce qui, à terme, entraîne la prolifération, différenciation, apoptose ou survie du LT (Oh-hora 2009; Smith-Garvin, Koretzky, et Jordan 2009).

ii. *La voie de signalisation du TCR active les canaux calciques SOCs*

La PLC γ 1 hydrolyse la phosphatidylinositol-3,4-biphosphate (PIP $_2$) en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP $_3$). L'IP $_3$ se lie à son récepteur l'IP $_3$ R situé sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), entraînant alors la libération du stock de calcium réticulaire dans le cytoplasme. La déplétion des stocks calciques du RE est détectée par les protéines *stromal interaction molecule* (STIM) localisées à la membrane du RE qui s'oligomérisent près de la membrane plasmique. L'oligomérisation des STIM induit alors l'ouverture des canaux calciques qui sont activés suite à la libération du Ca $^{2+}$ (*Ca $^{2+}$ release-activated Ca $^{2+}$* , CRAC). L'ouverture de ces canaux calciques entraîne un influx de Ca $^{2+}$ extracellulaire dans le cytoplasme de la cellule (Quintana *et al.* 2005).

iii. *L'entrée du Ca $^{2+}$ extracellulaire par les canaux SOCs entraîne l'activation de facteurs de transcription du LT CD8 $^+$*

L'augmentation de la concentration de Ca $^{2+}$ libre cytoplasmique peut ainsi activer plusieurs voies de signalisation dépendantes du Ca $^{2+}$. Le Ca $^{2+}$ joue le rôle de second messager et permet d'activer les facteurs de transcription cibles. Par exemple, le Ca $^{2+}$ active le complexe CaM/Calcineurine qui déphosphoryle le facteur de transcription NFAT situé dans le cytoplasme pour qu'il puisse être transloqué au noyau. Les NFAT, à l'exception de NFAT3, sont exprimés par les LT. Cependant, NFAT4 est exprimé de manière préférentielle dans les thymocytes, faisant de NFAT1 et NFAT2 les plus proéminents dans les LT. Néanmoins, alors que l'expression de NFAT1 est constitutive, NFAT2 est exprimé à de faibles niveaux dans les LT au repos et est donc induit lors de la stimulation de la voie du TCR (Peng *et al.* 2001; Macian 2005 ; Hogan *et al.* 2003).

En parallèle, ZAP70 phosphoryle également p38 qui a été activée par la cascade des MAPK et qui contribue à la prolifération et production de cytokines en contrôlant la phosphorylation de NFAT1 et NFAT2 (Oh-hora et Rao 2009; Round *et al.* 2007).

Une fois dans le noyau, NFAT coopère avec de multiples facteurs de transcription comme AP-1 et NF- κ B. Leur coopération contrôle la transcription spécifique de l'activation, la prolifération et la différenciation des LT comme la production et expression de l'IL-2, l'IFN γ et PD-1 (Stinchcombe *et al.* 2006; Pores-Fernando et Zweifach 2009 ; Hogan, Lewis, et Rao 2010).

2.2 Voie de signalisation secondaire de co-stimulation du LT CD8⁺

i. La voie de co-stimulation participe à l'activation du LT CD8⁺

Les LT CD8⁺ ont besoin d'un second signal qui est le signal de co-stimulation avec la CPA afin d'échapper à l'anergie ou l'apoptose. Ce second signal déterminera le niveau de stimulation ou d'inhibition du LT. L'interaction de co-stimulation la plus fréquente est la liaison du CD80 de la CPA avec le CD28 du LT. LCK phosphoryle le domaine intracellulaire de CD28, ce qui permet la genèse de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃) qui active des kinases comme l'AKT et la PKC θ nécessaires pour acquérir les activités prolifératives et effectrices (Curtsinger, Johnson, et Mescher 2003).

L'AKT est impliquée dans la voie mTOR qui favorise la survie et la prolifération, tandis que la PKC θ active NF- κ B nécessaire à la production d'IL-2. D'autres interactions ont lieu entre le LT et la CPA qui modulent l'intensité et la durée des signaux stimulants ainsi que la sécrétion de cytokines qui rétro-contrôlent l'activité et la différenciation des LT les ayant sécrétées (Fathi *et al.* 2020; Curtsinger, Lins, et Mescher 2003; Baine, Abe, et Macian 2009; Müller et Rao 2010).

ii. La voie de co-stimulation participe également à l'inhibition de l'activité du LT CD8⁺

Lorsque le TCR est engagé sans co-stimulation, ou lorsque l'affinité n'est pas suffisante pour déclencher les voies d'activation du LT, ce dernier peut devenir anergique. L'anergie est un phénomène physiologique permettant la tolérance du SI vis-à-vis de ses propres cellules présentant les molécules dites « du soi ». La reconnaissance d'une cellule présentant un CMH-peptide du soi entraîne alors sa désactivation par le SI.

L'anergie des LT peut être induite par la voie de signalisation Ca^{2+} /calcineurine/NFAT lorsque celle-ci n'est pas co-activée avec la voie de signalisation RAS/ERK qui active le facteur de transcription AP-1 (Chappert et Schwartz 2010).

iii. *Rôle de NFAT et du Ca^{2+} dans l'inactivation du LT CD8⁺*

Les facteurs de transcription NFAT localisés dans le cytoplasme sous leur forme hyperphosphorylée sont principalement déphosphorylés par la voie de signalisation Ca^{2+} /calcineurine/CaM dépendante du TCR. Leur déphosphorylation déclenche leur translocation au noyau leur permettant de jouer un rôle dans l'activation et les fonctions du LT. Des études *in vivo* ont montré que la déficience en NFAT1 et NFAT2 dans les LT était associée à une production altérée de cytokines dont l'IL-2 et l'IFN γ (Feske *et al.* 2000).

Les LT anergiques ont montré une diminution du flux calcique lors de stimulations *in vitro*, bloquant ainsi la translocation de NFAT1 au noyau, contrairement à NFAT2. Ceci montre une différence de sensibilité à la concentration calcique cytosolique de la part des différents membres de la famille NFAT et, bien que NFAT1 soit le membre principalement impliqué dans la réponse immunitaire, NFAT2 semble jouer un rôle dans le contrôle des gènes régulant la tolérance du LT (Feske *et al.* 2000; Hogan *et al.* 2003; Heissmeyer et Rao 2004; Serfling *et al.* 2000; Im et Rao, 2004).

Les LT CD8⁺ épuisés montrent une diminution de leurs fonctions effectrices comme la prolifération et la sécrétion de cytokines et ils surexpriment également des récepteurs de surface cellulaires inhibiteurs dont PD-1, LAG3, TIM-3, TIGIT et CTLA-4. Des études ont montré que NFAT contrôle l'épuisement des LT CD8⁺ en se liant aux régions régulatrices de gènes associés à l'épuisement comme les gènes *PD-1* et *TIM-3*. NFAT2 est nucléaire dans les LT CD8⁺ tolérants et il a été démontré que l'expression de PD-1 est régulée par NFAT2 (Srinivasan et Frauwirth 2007; Oestreich *et al.* 2008).

Également, une étude a mis en évidence le fait que les LT épuisés exprimaient les facteurs de transcription facteur 4 régulateur de l'interferon (*Interferon regulatory factor 4, IRF4*) et *Basic leucine zipper ATF-like transcription factor (BATF)* dépendants d'une co-activation avec NFAT, et notamment NFATc1 (NFAT2). Cette co-activation favorise l'expression de récepteurs inhibiteurs, dont PD-1. Cette étude semble confirmer que NFATc1 est le membre dominant de la famille NFAT impliqué dans l'épuisement du LT, notamment *via* l'induction de l'expression de PD-1 (Oestreich *et al.* 2008; Man *et al.* 2017; Klein-Hessling *et al.* 2017).

Les facteurs de transcription NFAT sont donc liés à des états d'activation, d'anergie (ou tolérance) mais également d'hypoactivation lorsque les LT sont exposés à des signaux de

co-stimulation négatifs ou en l'absence de signaux de co-stimulation positifs (Nurieva, Liu, et Dong 2011).

3. L'environnement immunosuppresseur de la LAM inhibe l'activité des LT CD8⁺

Il existe également un état d'épuisement des LT CD8⁺ induit suite à une stimulation antigénique persistante comme dans le cas d'infections virales chroniques ou de cancers (Schieter et Greenberg 2014; Wherry 2011).

Au sein de la MO de patients atteints de LAM, des déficits quantitatifs représentés par un nombre réduit de LT selon les patients (Li *et al.* 2009), et qualitatifs de la réponse lymphocytaire T associée à une diminution de sécrétion de cytokines ont été observés. Dans ce sens, la présence de LT dits « épuisés » pouvant représenter jusqu'à 60% des LT totaux a été mise en évidence (Kong *et al.* 2015; 2016). Cet état d'épuisement a été décrit comme provenant d'une stimulation antigénique continue de ces LT par les antigènes leucémiques, suggérant ainsi leur importance dans la réponse anti-leucémique dans un premier temps, puis leur inefficacité dans un second temps (Williams *et al.* 2019; Muller *et al.* 2015).

3.1 Implication de l'axe PD-1/PD-L1 dans la régulation des LT CD8⁺

Les récepteurs inhibiteurs du LT CD8⁺ jouent un rôle dans son inactivation et régulent le système immunitaire afin d'éviter une pathologie due à la stimulation chronique des LT (Wherry et Kurachi 2015). La liaison de PD-1 à son ligand PD-L1 ou PD-L2 entraîne l'inhibition de la transduction du signal dépendant du TCR (Keir *et al.* 2008).

PD-1, ou CD279, est une glycoprotéine transmembranaire composée de 288 acides aminés et appartenant à la superfamille des immunoglobulines B7/CD28. Elle est codée dans le gène *PDCD1* et NFAT favorise son expression afin de rétro-contrôler l'activation des LT (Oestreich *et al.* 2008).

PD-1 est composé d'un domaine extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique. Ce dernier possède deux tyrosines, l'une sur le motif inhibiteur à base tyrosine de l'immunorécepteur (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM) et l'autre sur le motif activateur de tyrosine de l'immunorécepteur (*immunoreceptor tyrosine switch motif*, ITSM). Ces deux motifs sont essentiels au rôle inhibiteur de PD-1 qui est exprimé à la surface des cellules de l'immunité comprenant les LT CD4⁺, LT CD8⁺, NK, LB, LT périphériques, cellules dendritiques et monocytes.

Le récepteur PD-1 se lie à deux ligands : PD-L1 et PD-L2 exprimés par des cellules présentatrices d'antigènes, un sous ensemble de LB ainsi que d'autres cellules de divers tissus comme le cœur et le poumon (Fife *et al.* 2009).

En condition normale, les points de contrôle du SI, qui peuvent être co-activateurs ou co-inhibiteurs, sont des récepteurs modulant l'activation des cellules immunitaires pour contrôler la durée et l'intensité de la réaction immune. L'activation de la cellule immunitaire dépend donc de l'équilibre entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs. Concernant le LT, lors de la reconnaissance d'un antigène spécifique grâce à son récepteur antigénique TCR, son activation dépendra de l'équilibre entre les différents signaux envoyés par ses points de contrôle (Rodig *et al.* 2003).

Lors de la liaison de PD-1 à son ligand, la phosphorylation d'un résidu tyrosine dans son domaine ITSM conduit au recrutement de la tyrosine phosphatase 2 qui contient un domaine SHP-2 responsable de la déphosphorylation des molécules de signalisation impliquées dans la voie d'activation du LT *via* le TCR comme la ZAP-70. L'activité de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) induite par la molécule de costimulation du TCR-CD28 se retrouve alors diminuée, ce qui conduit à une activation altérée du LT, lui conférant un état d'épuisement (Yokosuka *et al.* 2012; Chemnitz *et al.* 2004).

Une exposition continue à l'antigène et une stimulation cellulaire répétitive sont nécessaires pour maintenir le phénotype épuisé et l'expression de PD-1. Ces mêmes stimuli conduisent à une translocation nucléaire de NFAT et donc à une transcription génique de PD-1. Même un faible niveau de PD-1 peut assurer le rôle inhibiteur de l'activation des LT et cette activité altérée du LT par PD-1 conduit à une diminution de sécrétion des cytokines et chimiokines, une diminution de la cytotoxicité et de la prolifération. Cependant, des études ont montré qu'en cas d'absence d'expression de PD-1, le ligand PD-L1 est incapable d'inhiber l'activité des LT (Zinselmeyer *et al.* 2013; Lin *et al.* 2008).

3.2 Rôle de l'axe PD-1/PD-L1 dans les LAM

Il a été observé sur des lignées cellulaires humaines de LAM et des cellules leucémiques de patients LAM que l'expression de PD-L1 pouvait être augmentée après un traitement à l'IFN γ (Berthon *et al.* 2010) et que cette augmentation de l'expression de PD-L1 était également un mécanisme de résistance adaptative suite à un traitement immunothérapeutique visant les LT.

Comme expliqué précédemment, les LT épuisés sont caractérisés par l'expression à leur surface de PD-1 ainsi que d'autres molécules inhibitrices telles que TIM-3, CTLA-4 et LAG-3 qui induisent une stimulation continue du LT. Des études ont montré que l'expression de

PD-1 par les LT épuisés conduit à une réduction de leurs capacités fonctionnelles comme la production de cytokines (IL-2, IFN γ , TNF- α), la prolifération et leur activité cytotoxique. Par ailleurs, l'expression de PD-1 augmenterait même leur sensibilité à l'apoptose (Pauken et Wherry 2015; Han *et al.* 2010; Mueller et Ahmed 2009).

Plusieurs études ont montré que la fréquence des LT CD8⁺ exprimant les récepteurs inhibiteurs, dont PD-1, était supérieure chez les patients atteints de LAM comparés aux donneurs sains et que cette fréquence pouvait être augmentée de manière proportionnelle avec la progression de la maladie (Knaus *et al.* 2018; Williams *et al.* 2019).

D'autres études mettent en avant le fait que les LT CD8⁺ de patients LAM exprimant les récepteurs inhibiteurs comme PD-1 sont fonctionnellement épuisés et prédictifs de la rechute de la LAM. De même, des LT CD8⁺ PD-1⁺ exprimant TIM-3 ont été identifiés comme épuisés et présents en fréquence plus élevée chez les patients en rechute que chez des patients en rémission (Kong *et al.* 2015; Jia *et al.* 2018; Dama *et al.* 2019; Tan *et al.* 2017).

L'expression plus ou moins importante de PD-1 à la surface de ces LT CD8⁺ permet de définir un état d'épuisement plus ou moins avancé et qui peut être renforcé sur certains LT par l'expression des autres molécules inhibitrices. Ainsi, il a été montré dans des expériences *in vitro* sur la modulation de PD-1 qu'en présence de son ligand, la molécule PD-L1, une faible expression de PD-1 (PD-1^{low}) à la surface des LT CD8⁺ suffisait pour inhiber leur prolifération et leur production d'IL-2 à hauteur de 69%. Une expression intermédiaire de PD-1 (PD-1^{int}) est cependant nécessaire pour inhiber les productions de TNF- α et d'IFN γ à hauteur de 60%. Enfin, une expression élevée de PD-1 (PD-1^{high}) permet d'inhiber toutes les fonctions décrites précédemment ainsi que l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ (Wei *et al.* 2013). Ces expressions différentielles de PD-1 chez les LT épuisés ont été décrites en détail chez les patients atteints de LAM au diagnostic ainsi qu'en rechute et il a été montré que leur production de cytokines variait en fonction de l'expression de PD-1 (Kong *et al.* 2015).

Ainsi, la signalisation PD-1/PD-L1 contribuerait à moduler les fonctions effectrices des LT CD8⁺ cytotoxiques à différents degrés. La voie de signalisation PD-1/PD-L1 joue donc un rôle majeur dans l'induction de la dormance et l'échappement tumoral et c'est pourquoi il est important de mieux comprendre les événements moléculaires se produisant à l'échelle de la synapse immunologique (Schéma 5).

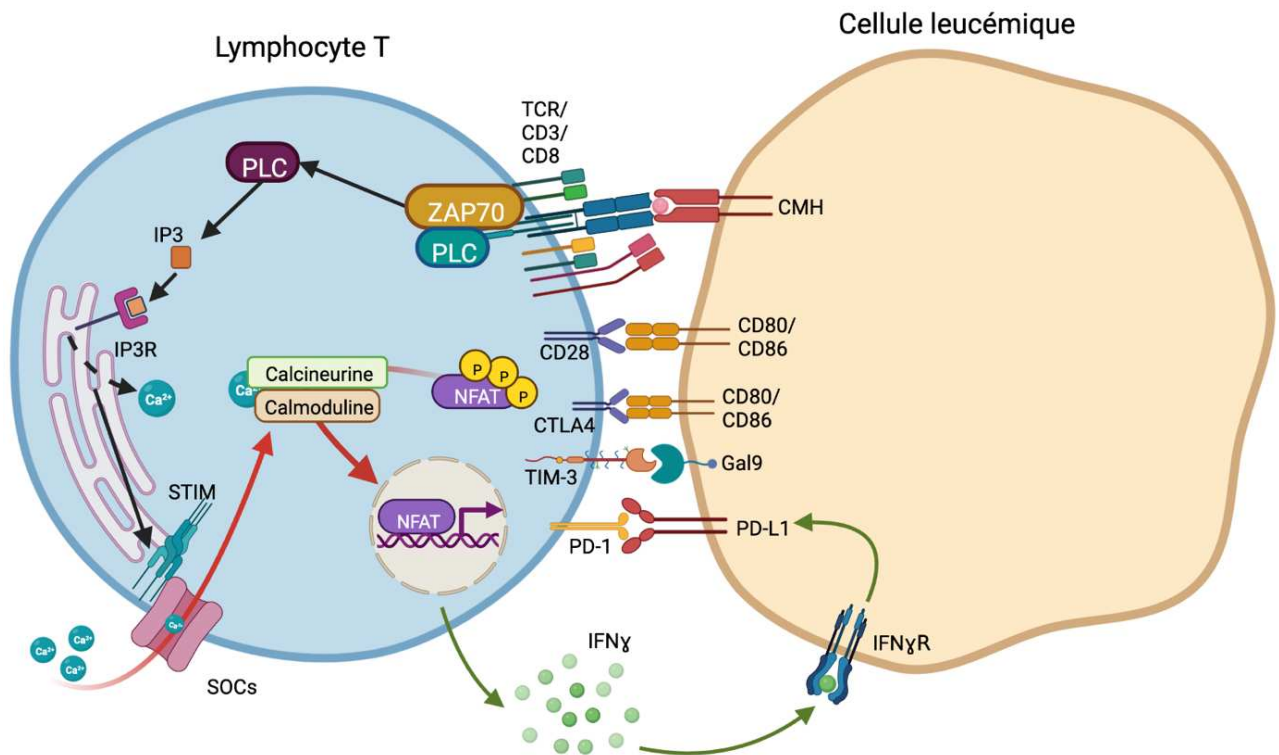


Schéma 5 : Activation du LT CD8⁺ suite à la rencontre avec une cellule leucémique. L'engagement du TCR et de ses co-récepteurs CD3 et CD8 avec le CMH/HLA de la cellule leucémique induit l'activation du LT. Le LT reçoit des signaux de costimulation positifs (CD28) ou négatifs (PD-1, TIM-3, CTLA-4) par les interactions ligand-récepteur. Ces signaux délivrent un signal secondaire régulant l'activation du LT. La liaison des domaines CD3 et CD28 au CMH entraîne la phosphorylation de ZAP70 qui, à son tour entraîne l'activation de la PLC. La PLC hydrolyse le PIP₂ en DAG et IP₃. L'IP₃ va se lier à son récepteur IP₃R situé sur la membrane du RE, ce qui provoque la libération des stocks calciques dans le cytoplasme. La déplétion des stocks calciques est détectée par les senseurs STIM situés à la membrane du RE qui s'oligomérisent et provoquent l'ouverture des canaux ORAI situés à la membrane plasmique. L'ouverture des canaux calciques SOCs entraîne un influx de Ca²⁺ extracellulaire dans le cytoplasme de la cellule. L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire permet d'activer les voies dépendantes du Ca²⁺ comme la voie Ca²⁺/CaM/NFAT. Cette voie permet la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT qui est alors transloqué au noyau pour transcrire les gènes responsables de l'activation ou l'inactivation du LT (expression de PD-1, sécrétion d'IFN γ). La liaison de l'IFN γ à son récepteur IFN γ R exprimé par les cellules leucémiques induit l'expression de PD-L1, permettant alors un rétrocontrôle de l'activation du LT.

3.3 Ciblage thérapeutique de l'axe PD-1/PD-L1

Ces études soulignent le potentiel thérapeutique de bloquer les points de contrôle immunitaires. En effet, le blocage de l'axe inhibiteur PD-1/PD-L1 conduit à la régression de la tumeur grâce à la réactivation de l'immunité anti-tumorale comme le montre une étude où, après un knock-out (KO) de *PD-L1*, la capacité proliférative des LT CD8⁺ a été améliorée (Hobo *et al.* 2010).

Des essais cliniques développent actuellement des immunothérapies ciblant les points de contrôles inhibiteurs comme CTLA-4 avec l'ipilimumab et PD-1 avec le nivolumab. Ces

médicaments ont été approuvés comme traitements anticancéreux dans certains cancers grâce à la réponse significative de certains patients dans des essais cliniques. De même, une co-expression des récepteurs inhibiteurs PD-1 et TIM-3 coïncide avec la progression de la maladie et les inhiber permet de rétablir la fonction cytotoxique des cellules de l'immunité. L'équipe de Daver *et al.* a également démontré qu'un plus haut pourcentage de LT CD3⁺ CD8⁺ dans la MO permettait de prédire une réponse à l'inhibiteur de PD-1, le nivolumab, et l'azacitidine (Daver *et al.* 2019; Sharma et Allison 2015; Sunshine et Taube 2015; Zhou *et al.* 2010; 2011).

Malgré le fait que des inhibiteurs de ces points de contrôle aient été approuvés dans diverses tumeurs solides, l'activité de ces inhibiteurs dans les LAM semble moins efficace selon les essais cliniques récents. Durant la phase Ib d'une étude sur l'ipilimumab, un anti *cytotoxic T-lymphocyte antigen* (CTLA)-4, le taux de rémission complète était de 23% (Davids *et al.* 2016). De plus, des effets indésirables liés au système immunitaire et une maladie du greffon contre l'hôte ont été signalés. Dans une autre étude en phase II, des patients LAM en rechute ont été traités avec le nivolumab, un anti-PD-1, en combinaison avec de l'azacitidine, un traitement anti cancéreux, et la rémission complète ou incomplète a été obtenue dans 22 à 33% des cas avec une survie médiane d'environ 6 mois (Daver *et al.* 2019). Une augmentation de cellules CD3⁺ et CD8⁺ dans la MO a également été observée et cette augmentation était prédictive d'une meilleure survie. À *contrario*, après traitement il est possible d'observer une augmentation de l'expression de CTLA-4 à la surface des LT effecteurs CD4⁺ chez les patients ne répondant pas au traitement, ce qui indique un mécanisme de résistance. De ce fait, l'azacitidine et le nivolumab (anti-PD-1) ont été combinés à l'ipilimumab (anti-CTLA-4) pour obtenir une rémission complète de 44% et une survie médiane d'environ 10 mois (Yuxin Liu *et al.* 2019).

D'autres équipes de recherche ont mis en évidence qu'associer un anticorps anti-PD-1 comme le pembrolizumab avec la décitabine ou l'azacitidine induit des réponses et une survie médiane similaires à celles observées avec la combinaison de l'azacitidine et du nivolumab chez les patients LAM (Gojo *et al.* 2019; Goswami *et al.* 2022). Bien que ces combinaisons de traitements suggèrent une amélioration du taux de réponse et de survie, une autre étude clinique en phase II étudiant l'effet de l'association de l'azacitidine avec le durvalumab (un anti-PD-L1) ou de l'azacitidine seule chez 214 patients atteints de LAM semble montrer que la combinaison des deux n'apporte pas d'efficacité supplémentaire (Herbrich *et al.* 2019; Daver *et al.* 2016; Zeidan *et al.* 2019).

Une première étude a montré qu'une exposition des cellules leucémiques à l'Ara-C, même à de faibles doses permet de diminuer l'expression de PD-L1 (A. Pinto *et al.* 1984).

Une autre étude a combiné le nivolumab avec la cytarabine et l'idarubicine ce qui a conduit à une rémission de 80% et une survie médiane d'environ 18 mois. Une plus forte expression de PD-1 et TIM-3 chez des LT CD4 effecteurs au sein de la MO a été observée chez les patients n'ayant pas répondu au traitement (Ravandi *et al.* 2019).

Il est donc important de continuer de développer les immunothérapies car malgré les effets hétérogènes chez les patients, les patients qui répondent à ces traitements répondent de manière prolongée ce qui indique une adaptation du SI à l'émergence de nouveaux clones tumoraux. Une meilleure compréhension de la régulation de l'expression de PD-L1 pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs ou conduire à de nouvelles stratégies combinées pour améliorer l'efficacité des thérapies de blocage de PD-1/PD-L1 (Pardoll 2012; Gotwals *et al.* 2017).

4. La formation de la synapse immunologique suite à la rencontre entre le LT CD8⁺ et la cellule leucémique

4.1 La formation de la synapse immunologique est dépendante du Ca²⁺

La dissémination de néoantigènes cancéreux dans le microenvironnement tumoral permet leur capture et leur présentation aux LT CD8⁺ par les CPA *via* leur CMH. Après l'activation du LT, ce dernier migre vers le site de la tumeur pour infiltrer le microenvironnement tumoral. Les LT activés reconnaissent les néoantigènes du cancer présentés par le CMH en se liant aux cellules cancéreuses. Les interactions entre les LT et les cellules cibles se déroulent alors en 3 étapes distinctes : (i) les LT forment d'abord des interfaces cellulaires transitoires appelées kinapses ou synapses en mouvement durant lesquelles la voie d'activation du TCR est engagée *via* la signalisation calcique suite à la présentation d'un peptide antigénique lié au CMH. Cette phase de contact peut durer de quelques secondes à plusieurs minutes (Delon *et al.* 1998; Mempel, Henrickson, et von Andrian 2004).

Si la détection d'antigènes atteint un certain seuil, les kinapses peuvent ensuite devenir (ii) des synapses immunologiques qui se stabilisent pour établir une reconnaissance pouvant durer plusieurs minutes et qui est couplée à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire suite à la reconnaissance de l'antigène (Huppa et Davis 2003). L'engagement du TCR et la formation efficace de la synapse immunologique s'accompagnent également, et ce en l'espace de quelques minutes, de la réorganisation de

la membrane plasmique induite par les réarrangements du cytosquelette d'actine et la réorientation du centre d'organisation des microtubules (*microtubule organising centre*, MTOC). Les protrusions et rétractations dynamiques de l'actine produisent des oscillations contractiles qui engagent le LT à parcourir la surface de la cellule cible à la recherche d'antigènes lors de la formation de kinapses (Joseph, Reicher, et Barda-Saad 2014; Faure *et al.* 2004).

La morphologie de la cellule passe de sphérique à allongée lors de la formation de kinapses, voire aplatie pendant un contact stable représenté par la formation de la synapse immunologique (Lafouresse *et al.* 2012; Depoil *et al.* 2005).

Les filaments d'actine (F-actine) de la cellule se polymérisent au niveau de la zone de liaison du CMH-TCR et permettent alors la contraction du cytosquelette, ce qui entraîne la migration rapide des organites vers ce site qui deviendra le complexe d'activation supramoléculaire central (*central supramolecular activation complex*, c-SMAC). Dans les 2 à 3 minutes qui suivent la liaison du TCR au CMH, les molécules nécessaires à la formation de la synapse immunologique migrent ainsi le long de l'actine polymérisée de la périphérie vers le centre de la synapse immunologique (Morlino *et al.* 2014).

Le c-SMAC de la synapse immunologique est composé par le complexe TCR/CD3-CMH et les molécules de co-stimulation, tandis que les molécules d'adhésion du LT, le *leukocyte function-associated antigen 1* (LFA-1, CD18/CD11a ou L2) et son récepteur exprimé par la cellule cible, le *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1, CD54) forment un SMAC périphérique (p-SMAC) entourant le c-SMAC. Ces complexes se forment dans les secondes qui suivent l'engagement du TCR et cette organisation de la synapse immunologique va permettre l'activation du LT qui pourra alors (iii) sécréter ses cytokines après contact avec la cellule cible, et ce, durant plusieurs heures (Gunzer, Borgmann, et Grabbe, 2000; Mempel, Henrickson, et von Andrian 2004; Brossard *et al.* 2005; Lin *et al.* 2015; Krummel et Cahalan 2010).

Les signaux de co-stimulation peuvent modifier la formation de la synapse immunologique et renforcer ou altérer l'activation du LT, comme l'engagement de LFA-1 qui confère une stabilité telle qu'elle permet de multiplier par 100 la sensibilité des LT à l'antigène présenté par rapport à la même situation en l'absence de LFA-1. Par ailleurs, des études ont montré que le blocage des molécules de co-stimulation LFA-1 ou CD28 modifiait la morphologie de la synapse pour réduire de manière significative la quantité d'accumulation de complexes TCR-CMH nécessaires à l'activation du LT. En effet, les réponses à long terme et la prolifération des LT dépendent de l'intensité et du nombre de complexes présentant les antigènes. Les signaux de co-stimulation engendrés par

CD80/CD28 et ICAM-1/LFA-1 permettent une formation normale de la synapse immunologique, or la taille et apparence normales sont corrélées avec la prolifération des LT (Le Floch et Huse 2015; Yokosuka et Saito 2009; Wetzel, McKeithan, et Parker 2002).

Quelques secondes après la stimulation du TCR, le MTOC se polarise vers la synapse immunologique grâce à sa liaison aux filaments d'actine pour se positionner près du c-SMAC. Cela concentre le trafic vésiculaire intracellulaire au niveau de la synapse immunologique, ce qui permet de coordonner l'arrivée de récepteurs et molécules de signalisation vers et depuis la synapse. C'est la signalisation du TCR, et plus particulièrement les kinases LCK et FYN, qui contribuent à la polarisation du MTOC. Ce dernier est responsable de la polarisation des LT et guide également d'autres organites comme l'appareil de Golgi et les mitochondries impliqués dans la formation de la synapse immunologique et l'exécution des fonctions effectrices comme la sécrétion des granules cytolytiques et cytokines (Stinchcombe et Griffiths 2014).

La distance entre les deux cellules formant la synapse immunologique varie de 15nm à 100nm et forme la fente synaptique. Un vide d'actine s'ouvre alors juste en-dessous du c-SMAC dans lequel le MTOC permet de diriger la sécrétion de granules cytotoxiques comme les granzymes et perforines, ainsi que le médiateur de mort cellulaire alternative FasL vers la cellule cible (Stinchcombe *et al.* 2001; Brossard *et al.* 2005; Griffiths, Tsun, et Stinchcombe 2010).

Pour la formation d'une synapse immunologique fonctionnelle et l'élimination de la cellule cible, la polymérisation correcte du cytosquelette d'actine et du MTOC est donc essentielle pour permettre la migration et sécrétion de granules cytolytiques par les LT dans la fente synaptique (Dustin et Cooper 2000; Ramsay *et al.* 2008).

Des études *in vivo*, ont mis en avant le fait que la réorganisation du cytosquelette d'actine du LT semble être altérée dans les hémopathies, ce qui pourrait expliquer ce défaut de formation de la synapse immunologique et l'échappement tumoral associé (Le Dieu *et al.* 2009; Ramsay *et al.* 2008).

4.2 La lyse cytotoxique

Les granules cytolytiques contiennent principalement des perforines et des granzymes. Une fois libérées dans la fente synaptique, les perforines forment des pores à la surface de la membrane plasmique de la cellule cible pour permettre aux granzymes de pénétrer la membrane plasmique et accéder au cytoplasme. Les granzymes B sont les granzymes pro-apoptotiques les plus puissantes grâce à leur capacité à activer les membres pro-apoptotiques tels que l'agoniste de mort du domaine BH3, le *BH3-interacting domain death*

agonist (Bid) et les protéines pro-apoptiques *Bcl-2 associated X protein* (Bax) et *Bcl-2 homologous antagonist killer* (Bak). Ces dernières entraînent la fuite du cytochrome c dans le cytosol qui active la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome et ainsi activer la caspase 3. Les granzymes B induisent donc une mort rapide et efficace car les cellules exposées aux granzymes et perforines meurent en moins de 10 minutes par apoptose (Halle *et al.* 2016; Lopez *et al.* 2013; Ritter, Angus, et Griffiths 2013).

Toutefois, pour parvenir à éliminer les cellules cibles, il est nécessaire d'atteindre un seuil de sécrétion spécifique de granzymes pour initier l'apoptose. Les cellules cancéreuses surexpriment souvent *B cell lymphoma* (Bcl)-2 ou des molécules de pro-survie apparentées qui bloquent la voie de mort mitochondriale activée par la granzyme B (Heibein *et al.* 2000; Sutton *et al.* 2003; 2000) (Schéma 6).

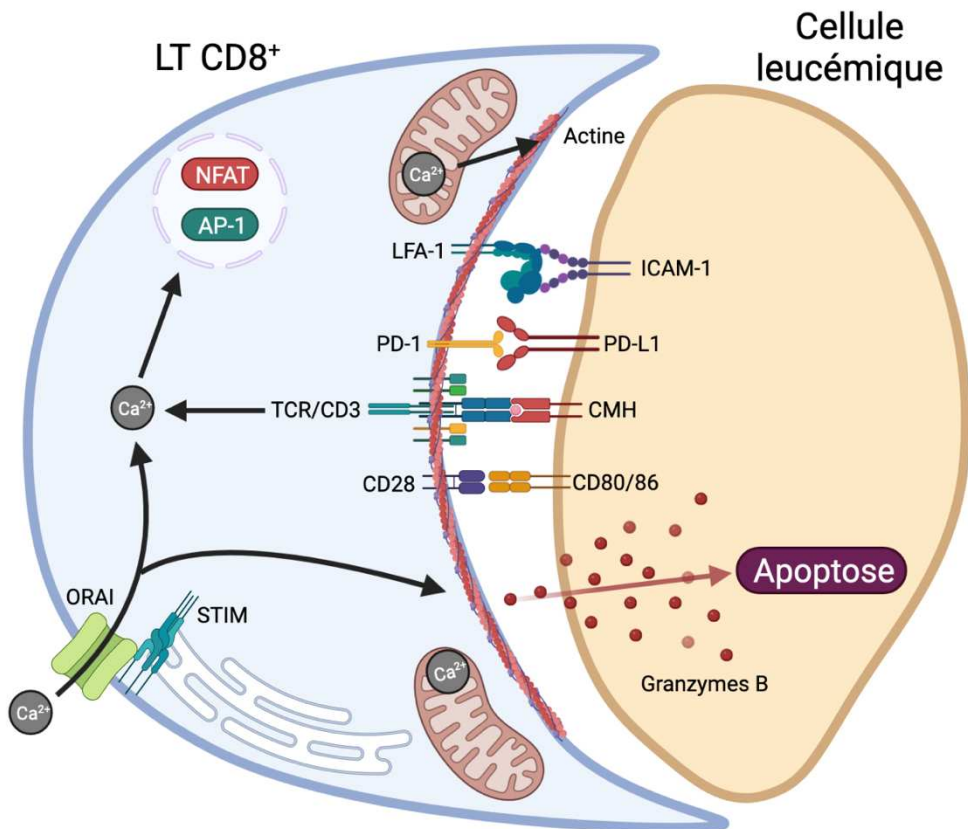


Schéma 6 : Formation de la synapse immunologique entre le LT CD8⁺ et la cellule leucémique. Suite à la liaison du TCR au CMH de la cellule cible, l'influx de Ca²⁺ provoqué par la voie de signalisation du TCR permet la réorganisation du cytosquelette d'actine du LT afin de former une surface plane pour la synapse immunologique. Le c-SMAC est formé par les molécules de signalisation (TCR/CMH, CD28/CD80-86, PD-1/PD-L1) et le p-SMAC est formé par les molécules d'adhésion LFA-1/ICAM-1. Les mitochondries sont transloquées à proximité de la synapse immunologique afin de faciliter l'influx de Ca²⁺ et l'activation des facteurs de transcription comme NFAT et AP-1 *via* l'ouverture des canaux SOCs. La signalisation calcique permet également la sécrétion de perforines et granzymes B afin de provoquer l'apoptose de la cellule cible.

En temps normal, la cytotoxicité médiée par les LT CD8⁺ cytotoxiques avec la formation de la synapse immunologique, la libération des granules lytiques et les premiers signes de mort cellulaire dans la cellule cible se font rapidement et se produisent généralement dans les 5 premières minutes suite à la reconnaissance de la cellule cible et l'activation de la voie du TCR. Cependant, des durées plus longues de synapses immunologiques allant de 20 à 60 minutes ont été observées pour l'élimination de cellules cibles (Pores-Fernando et Zweifach 2009; Stinchcombe *et al.* 2006). Une étude sur la synapse immunologique a observé un défaut de recrutement des complexes TCR et donc une diminution marquée de la formation de la synapse immunologique entre des LT et cellules leucémiques issus de patients LAM au diagnostic comparés à des cellules de donneurs sains. Néanmoins, ni le statut de différenciation (activé, effecteur, mémoire, naïf) des LT, ni le statut prolifératif des cellules leucémiques n'ont été étudiés dans ces travaux (Le Dieu *et al.* 2009).

De plus, dans une étude réalisée par Wei *et al.*, il a été montré que la formation de la synapse immunologique mature nécessitait la liaison et l'activation d'environ 10 complexes TCR afin d'observer des signaux calciques. En revanche, en présence de la molécule PD-1 à la surface des LT, cette signalisation calcique n'était obtenue qu'après liaison et activation d'environ 30 complexes TCR dans la synapse immunologique, mettant ainsi en évidence l'effet inhibiteur de PD-1 (Wei *et al.* 2013). Dans le même sens, l'équipe de Yokosuka a montré que la présence de PD-1 à la surface des LT interférait avec la formation de la synapse immunologique et avec la signalisation du TCR *via* la formation de microclusters et le recrutement de la phosphatase SHP-2 (Yokosuka *et al.* 2012).

Ainsi, les niveaux d'expression de PD-1 sur les LT CD8⁺ et de son ligand PD-L1 sur les cellules leucémiques semblent jouer un rôle important dans le phénomène de dormance immunologique ou d'échappement tumoral. Les cellules leucémiques modulent l'activation des LT par des signaux inhibiteurs et empêchent ainsi la formation de la synapse immunologique et la lyse cytotoxique associée (Fathi *et al.* 2020).

D. Implication du calcium dans les fonctions cellulaires des cellules leucémiques et LT CD8⁺

1. Le calcium

Le calcium est un signal intracellulaire ubiquitaire agissant comme un second messager qui régule de nombreux processus biologiques dans la cellule et qui est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires. L'homéostasie calcique est un état d'équilibre entre les efflux, les influx et le stockage du calcium par les différents organites de la cellule.

L'importance de cet ion dans la physiologie cellulaire est illustrée par son rôle dans la prolifération, la migration, la différenciation, la quiescence et l'apoptose.

Une modification de l'homéostasie calcique peut être causée par une variation de l'expression et/ou de l'activité des acteurs de cette homéostasie calcique, ce qui mène alors à des pathologies. Par exemple, il a été décrit que dans des pathologies cancéreuses, des altérations de l'homéostasie calcique augmentaient la prolifération ou, à l'inverse, induisaient l'apoptose des cellules cancéreuses (Roderick et Cook 2008). Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes induisant la modification de l'homéostasie calcique afin de développer une approche thérapeutique ciblée.

En temps normal, les cellules au repos ont une concentration calcique cytoplasmique de 50 à 100nM, une concentration calcique du RE de 800 à 1000 μ M et la concentration calcique du milieu extracellulaire est de l'ordre de 2mM. Le Ca^{2+} est capable d'activer des voies de signalisation dans le noyau et dans le cytoplasme dans le but de stimuler ou inhiber l'expression génique. Or, le Ca^{2+} peut être régulé à trois niveaux distincts, à savoir l'espace, le temps et l'amplitude. Ces niveaux impactent tous les trois la régulation de l'expression génique qui induira différentes fonctions physiologiques spécifiques du signal calcique. Les augmentations prolongées de Ca^{2+} intracellulaire peuvent être létales et c'est pourquoi les cellules utilisent des signaux calciques de faible amplitude ou transitoires appelés oscillations calciques (Berridge, Lipp, et Bootman 2000; S Kawano *et al.* 2002; Seiko Kawano *et al.* 2003; Li *et al.* 2005).

2. Rôle du Ca^{2+} dans l'activation du LT

2.1 Le Ca^{2+} permet d'activer le LT

Comme expliqué précédemment, l'activation des LT requiert l'engagement du TCR avec le CMH d'une cellule cible. Cela entraîne, en l'espace d'une centaine de secondes, à la fois la libération des réserves intracellulaires de Ca^{2+} mais également un afflux de Ca^{2+} extracellulaire par les canaux calciques situés au niveau de la membrane plasmique qui ont été activés suite à la déplétion des réserves calciques.

Le signal calcique des LT dépend majoritairement de l'entrée capacitive de calcium réalisée par les canaux CRAC qui s'inactivent avant le pic de ce signal calcique. L'influx calcique est favorisé et soutenu par un potentiel membranaire négatif induit par la sortie du potassium (K^+) par les canaux potassiques Kv, et en particulier Kv1.3. Ces derniers sont dépendants du voltage et leur activation permet l'augmentation du gradient électrochimique du Ca^{2+} . Les canaux KCa, et notamment KCa3.1, sont dépendants du calcium intracellulaire

et s'ouvrent dès que sa concentration augmente pour atteindre environ 200nM. La cellule se trouve alors hyperpolarisée et l'ouverture des canaux KCa permet le maintien du potentiel négatif de la membrane induisant ainsi une entrée soutenue de Ca^{2+} par les canaux CRAC (Cahalan, Wulff et Chandy 2001; Cahalan et Chandy 2009).

Lors de l'engagement du TCR, la concentration calcique cytoplasmique du LT se retrouve multipliée par 10 pour atteindre 1 μM . L'entrée de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique est la source de Ca^{2+} la plus importante pour l'activation des LT et les seuls canaux sélectifs du Ca^{2+} exprimés par les LT sont les canaux ORAI. Des études ont montré une augmentation de l'expression de ORAI1 et STIM1 et de l'influx calcique dans les LT activés, pouvant ainsi expliquer une plus grande efficacité de la signalisation et réponse immunitaire des LT humains activés. Cette augmentation d'expression de STIM et ORAI amplifie l'influx calcique et assure la signalisation calcique médiée par les canaux CRAC qui entraîne l'expansion clonale, la différenciation et la régulation dépendante du calcium de l'expression de gènes des LT activés, garantissant ainsi une réponse accrue lors de rencontres ultérieures avec l'antigène (Lioudyno *et al.* 2008).

Une étude a mis en évidence qu'une absence d'expression de ORAI1 par des LT de souris empêche ces derniers d'avoir une réponse immunitaire normale par le biais de la production des cytokines $\text{IFN}\gamma$ et $\text{TNF-}\alpha$. De même, il a été démontré que lors de l'activation du TCR du LT CD8^+ , la transcription des gènes de la perforine pouvait être régulée par le facteur de transcription NFATc1, lui-même régulé par la voie de signalisation $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{calcineurine}$ (Oestreich *et al.* 2008; Klein-Hessling *et al.* 2017; McCarl *et al.* 2010; Samelson 2002; Zhang *et al.* 2005; Liou *et al.* 2005; Roos *et al.* 2005).

Une faible quantité de Ca^{2+} intracellulaire de l'ordre de 40 à 220nM est nécessaire afin d'activer les LT et permettre leur prolifération. À *contrario*, une augmentation plus importante de Ca^{2+} peut entraîner l'apoptose du LT. De très faibles changements dans la concentration calcique du LT peuvent donc avoir un impact majeur sur la balance entre la prolifération et l'apoptose (Schwarz *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2018).

Le calcium intervient dans de nombreuses voies de signalisation, notamment par sa fixation à la calmoduline qui active la phosphatase calcineurine. Cette dernière permet la déphosphorylation de NFAT et sa translocation au noyau. La transcription génique dépendante de NFAT peut durer plusieurs heures et nécessite des influx soutenus et de longue durée de Ca^{2+} intracellulaire suite à l'entrée capacitive de Ca^{2+} extracellulaire modulée par les canaux SOCs et l'activité de la calcineurine. Lorsque les niveaux de Ca^{2+} intracellulaire chutent ou que les cellules sont traitées à la cyclosporine A (CsA), un inhibiteur de la calcineurine, NFAT est immédiatement rephosphorylé et sa séquence de

localisation nucléaire est masquée. Cela entraîne une exportation rapide de NFAT hors du noyau et l'arrêt de la transcription de gènes dépendants de NFAT (Feske 2007).

À l'inverse, une augmentation transitoire est suffisante pour l'activation de NF- κ B et la transcription génique ultérieure. Ainsi, après l'engagement du TCR avec le CMH, la force et la durée du signal calcique déterminent la prolifération, la production de cytokines et la libération de granules cytotoxiques pour les LT CD8⁺. La concentration calcique peut donc moduler les voies d'activation de la cellule, faisant du Ca²⁺ un messager très polyvalent (Hogan *et al.* 2003; Lewis 2001).

2.2 *Le Ca²⁺ permet d'inactiver le LT en modulant NFAT et l'axe PD-1/PD-L1*

Il a été démontré dans la littérature que NFATc1 (NFAT2) est capable de réguler l'expression de PD-1 et, de manière moins renseignée, celle de PD-L1 (Oestreich *et al.* 2008; Ritprajak et Azuma 2015). La signalisation calcique aurait donc un impact sur le dialogue entre les cellules du SI et les cellules cancéreuses (Payne *et al.* 2016; Caetano *et al.* 2002; Baksh *et al.* 2002). Une étude intéressante a montré *in vitro* et *in vivo* qu'un inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendants, la Nifédipine, réduit l'expression de NFAT2 ainsi que sa translocation nucléaire dans des cellules du cancer colorectal. Elle montre également que NFAT2 favorise l'expression de PD-L1 dans les cellules tumorales et de PD-1 dans les LT, ce qui laisse suggérer une implication de la signalisation calcique dans l'immuno-échappement des cellules tumorales *via* l'axe PD-1/PD-L1. La Nifédipine inhibe l'expression de PD-L1 et de PD-1, reproduisant ainsi l'action des inhibiteurs de l'axe PD-1/PD-L1 et favorise alors la reconnaissance immunitaire des cellules tumorales par les LT (Wu *et al.* 2020).

2.3 *Le Ca²⁺ intervient dans la formation de la synapse immunologique et la lyse cytotoxique*

La synapse immunologique doit se former puis se dissocier pour se reformer tout au long de la durée de vie du LT. La formation initiale de la synapse immunologique requiert une augmentation de Ca²⁺ par la voie d'activation du TCR. En plus de l'activation du LT, cette augmentation de concentration calcique permet le détachement du cytosquelette d'actine, des protéines membranaires et/ou la perte de tension de la membrane. Ceci permet aux synapses immunologiques de rester constamment en mouvement. Une étude a d'ailleurs montré que l'aplatissement de la membrane plasmique du LT, qui est régulé par l'actine lors

de la formation de la synapse immunologique, est dépendant de l'augmentation de la signalisation calcique (Quintana *et al.* 2009; Burkhardt, Carrizosa, et Shaffer 2008).

Hartzell *et al.* et d'autres chercheurs ont découvert que les filaments d'actine permettent de concentrer les canaux SOCs, et notamment les responsables majeurs du SOCE, ORAI1 et STIM1, au centre de la synapse immunologique et plus précisément au niveau du c-SMAC. Cette réorganisation favorise l'influx calcique au niveau de la synapse immunologique (Hartzell *et al.* 2016).

Ainsi, les ions Ca^{2+} permettent le mouvement du cytosquelette qui, en retour, favorise l'organisation spatiale des canaux calciques au niveau de la synapse immunologique. Cela garantit un positionnement optimal pour initier les fonctions de la réponse immunitaire dépendantes du Ca^{2+} comme la sécrétion de cytokines. D'autres études pionnières sur la compréhension de la formation de la synapse immunologique ont confirmé l'implication du Ca^{2+} intracellulaire dans l'accumulation d'actine, l'arrêt de la motilité, la forme des cellules et la stabilisation durant la formation de la synapse immunologique (Bhakta et Lewis 2005; Krummel *et al.* 2000; Delon *et al.* 1998; Bunnell *et al.* 2001).

La réorientation des MTOC vers la synapse immunologique est également Ca^{2+} -dépendante suite à la découverte de l'implication de la $PLC\gamma$ et du Ca^{2+} extracellulaire dans son organisation spatiale.

L'activité cytotoxique des LT $CD8^+$ dans la synapse immunologique est aussi très dépendante des concentrations de Ca^{2+} extracellulaire. En effet, il a récemment été montré par des tests de cytotoxicité en temps réel que l'accumulation et la libération des granules cytolytiques contenant les perforines et granzymes par les LT $CD8^+$ nécessitent des concentrations intracellulaires et extracellulaires de Ca^{2+} allant de 122 à 334nM et de 23 à 625 μ M respectivement. Des concentrations supérieures ou inférieures inhibent partiellement l'activité cytotoxique des LT $CD8^+$. Ce mécanisme est notamment finement modulé par l'expression de ORAI1 à la surface des LT. En effet, l'extinction complète de l'expression de ORAI1 inhibe l'activité cytotoxique comme attendu, mais l'extinction partielle de l'expression de ORAI1 dans les LT cytotoxiques augmente l'efficacité de la lyse. Il existerait donc un niveau optimal d'influx de Ca^{2+} pour induire les effets cytotoxiques efficaces des LT (Zhou *et al.* 2018).

La chercheuse Contento et son équipe ont également constaté que la translocation nucléaire de NFATc2 est significativement plus élevée parmi les LT dans lesquels les mitochondries sont recrutées au niveau de la synapse immunologique que parmi les LT où les mitochondries ne sont pas recrutées. Ceci indique que l'influx de Ca^{2+} soutenu par les

mitochondries recrutées à la synapse immunologique aide à maintenir la translocation nucléaire de NFATc2 qui induit l'activité des LT (Contento *et al.* 2010).

Concernant les cellules cibles de la synapse immunologique, il a été montré que la perte de l'intégrité de la membrane plasmique induite par les perforines sécrétées par le LT conduit à une réponse de réparation de la membrane. La formation des pores entraîne un influx de Ca^{2+} extracellulaire dans la cellule cible conduisant à la mobilisation de protéines pouvant refermer les lésions. Les protéines *Endosomal sorting complexes required for transport* (ESCRT) peuvent, en effet, réparer la formation de pores au niveau de la membrane plasmique. Elles sont recrutées de manière transitoire sur les sites de dommages membranaires, et ce, de manière dépendante du Ca^{2+} (Weigelin *et al.* 2021; Andrews, Almeida, et Corrotte 2014; Lopez *et al.* 2013).

Aussi, l'induction de l'expression de PD-L1 par les cellules cibles *via* l' $\text{IFN}\gamma$ sécrété par les LT pourrait être médiée par la signalisation calcique des cellules tumorales. En effet, le récepteur à l' $\text{IFN}\gamma$ exprimé par les cellules leucémiques peut activer la voie $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{calcineurine}$ par la production d' IP_3 (Nair *et al.* 2002). La signalisation calcique pourrait donc également moduler l'axe PD-1/PD-L1 à travers la synapse immunologique.

3. Les canaux ORAI sont dépendants du stock calcique et des senseurs STIM

3.1 Structure et fonctions des canaux ORAI

Les canaux ioniques situés au niveau de la membrane plasmique sont des protéines transmembranaires qui facilitent sélectivement la perméation d'ions spécifiques entre les milieux intra et extracellulaires. En contrôlant le flux d'ions, les canaux ioniques déterminent les signaux cellulaires, l'apoptose, la prolifération, la migration et l'adhésion cellulaire. Les canaux ioniques jouent donc un rôle de modulateur du destin cellulaire et peuvent participer à la cancérogenèse (Litan et Langhans 2015; Kondratskyi *et al.* 2015; Bortner et Cidlowski 2014).

Parmi les acteurs majeurs de l'homéostasie calcique, il existe les canaux dépendants du stock calcique (*store-operated channels*, SOCs) : les canaux ORAI (*Hores* ou Heures, divinités grecques, filles de Zeus et gardiennes des portes du ciel). ORAI est une glycoprotéine ancrée à la membrane plasmique où elle forme la sous-unité du pore du canal activé par la libération des réserves intracellulaires de Ca^{2+} (*calcium-released activated channel*, CRAC) grâce à ses quatre domaines transmembranaires. Le premier domaine transmembranaire tapisse le pore du canal et contient un résidu glutamate qui constitue un

site de liaison à haute affinité au calcium, conférant ainsi une forte sélectivité. Les canaux CRAC sont des complexes hexamériques composés de six monomères de ORAI disposés autour d'un axe central et modulent ainsi l'influx de calcium dans les cellules (Hou *et al.* 2012; Penna *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2013; Prakriya *et al.* 2006; Yeromin *et al.* 2006).

ORAI1 a d'abord été identifié suite à la mise en évidence de la mutation R91W chez des patients atteints du syndrome du déficit immunitaire combiné sévère (*severe combined immunodeficiency*, SCID). Cette mutation de *ORAI1* entraîne la perte de fonction du canal CRAC et une inhibition presque totale de l'entrée de Ca^{2+} opérée par la vidange du stock calcique du réticulum endoplasmique de la cellule. Cette diminution de l'influx calcique provoque une immunodéficience combinée sévère caractérisée par une altération de la prolifération des LT, un défaut d'activation de gènes dépendants de NFAT, une réduction de la production de cytokines comme l'IL-2 et l'IFN γ , une faible réponse immunitaire et une augmentation des infections virales et bactériennes. Le canal calcique ORAI1 joue donc un rôle majeur dans les fonctions principales des cellules et notamment l'activation des LT et la réponse immunitaire (Feske *et al.* 2001; Vaeth *et al.* 2017).

La déplétion de *ORAI1* chez la drosophile (dORAI1, CRACM) par ARN interférent (ARNi) a permis d'étudier les régulateurs de l'entrée de calcium dans la cellule et la translocation au noyau de NFAT en diminuant l'influx de Ca^{2+} . Ces études montrent donc le rôle critique de ORAI1 dans la fonction des LT et la réponse immunitaire ainsi que son implication dans la formation du canal calcique CRAC (Feske, Gwack, Prakriya *et al.* 2006). Le gène dORAI identifié chez la drosophile a 3 homologues chez l'homme : *ORAI1*, *ORAI2* et *ORAI3*. Les domaines transmembranaires sont très conservés entre les 3 homologues mais leurs différences résident dans la vitesse d'activation et inactivation ainsi que la sensibilité aux inhibiteurs pharmacologiques tels que le synta66 (Vaeth *et al.* 2017).

Les courants CRAC ont été observés dans de nombreux types cellulaires, ce qui correspond à l'expression ubiquitaire des ORAI. Le canal calcique ORAI1 est le plus étudié des 3 ORAI et semble être le membre des ORAI majoritairement exprimé par les cellules non excitables, y compris les cellules immunitaires et notamment les LT pour lesquels les CRAC et le courant SOC sont essentiels, comme le montrent des études réalisées chez l'homme et la souris. De plus, un *knockdown* de STIM1 et ORAI1 dans les lignées cellulaires humaines de LT et des LT primaires de patients montre une inhibition presque complète de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule suite à l'ajout de la thapsigargine ou à la stimulation du TCR (Cahalan et Chandy 2009).

Bien que ORAI1 soit crucial pour la fonction du canal CRAC, ORAI2 et ORAI3 semblent pouvoir former des complexes de canaux avec des propriétés pharmacologiques et une

sensibilité au Ca^{2+} distinctes. ORAI2 montre une expression plus élevée dans les plaquettes, les mélanocytes, les LB, les cellules dendritiques, les macrophages, les mastocytes, le cerveau, les poumons et la rate et ORAI3 est, quant à lui, abondant dans de nombreux organes solides (Vaeth *et al.* 2017).

ORAI2 est néanmoins également fortement exprimé dans les LT naïfs et de manière moins prononcée dans les LT effecteurs, ce qui entraîne une augmentation du ratio ORAI1 :ORAI2 et une plus forte expression de ORAI1 dans les cellules effectrices. Une délétion de ORAI1 réduit le courant SOC tandis qu'une délétion de ORAI2 l'augmente et la suppression combinée de ORAI1 et ORAI2 abolit complètement le SOCE et entraîne la dysfonction du LT. Ces effets opposés s'expliquent par la capacité des 3 ORAI à former des hétéromultimères. Ainsi, ORAI2 forme des CRAC avec ORAI1 et atténue l'entrée du Ca^{2+} à travers les canaux formés. ORAI1 et ORAI2 sont donc des modulateurs du SOCE et de la fonction des LT en contrôlant la réponse immunitaire (Lis *et al.* 2007; Vaeth *et al.* 2017).

3.2 L'activation des canaux ORAI dépend des senseurs STIM

Le criblage par ARNi a permis d'identifier les gènes responsables de l'influx de Ca^{2+} induit par l'épuisement des réserves de Ca^{2+} du RE déclenché par l' IP_3 . La thapsigargine bloque de manière irréversible la pompe SERCA située à la membrane du RE, empêchant un recaptage actif du Ca^{2+} et entraînant alors l'épuisement des réserves de calcium par une fuite passive de Ca^{2+} du RE vers le cytoplasme. La thapsigargine active alors le courant CRAC tout en s'affranchissant de la cascade de transduction du signal résultant de l'engagement du récepteur à l' IP_3 . Le criblage des cellules de drosophile possédant des mécanismes moléculaires partagés avec les cellules immunitaires humaines a permis d'identifier le senseur du stock calcique : la molécule d'interaction stromale (*stromal interaction molecule*, STIM) comme étant le seul gène parmi 170 gènes testés essentiel à l'influx de Ca^{2+} provoqué par la thapsigargine. Les canaux SOCs étant sensibles au stock calcique réticulaire de la cellule, l'association des ORAI avec le STIM de la drosophile et ses homologues humains STIM1 et STIM2 est donc essentielle pour établir le courant CRAC à la suite de l'épuisement des réserves de Ca^{2+} du RE (Cahalan et Chandy 2009).

STIM est une protéine transmembranaire située dans le RE et sensible aux stocks calciques du RE. L'une de ses extrémités, l'extrémité N-terminale, réside dans la lumière du RE et contient deux domaines de main EF de faible affinité pour le Ca^{2+} lorsque les stocks sont remplis. Un seul de ces domaines de main EF suffit à STIM pour lier le Ca^{2+} et ainsi détecter la concentration calcique du RE. Ces protéines fonctionnent comme des

capteurs de Ca^{2+} du RE et, lorsque les stocks réticulaires sont importants, STIM chélate fortement le calcium et les canaux SOCs situés à la membrane plasmique restent fermés.

La concentration des stocks calciques du RE est d'environ 100 à 800 μM . Lors de la vidange des réserves de Ca^{2+} du RE, le Ca^{2+} se dissocie des domaines EF des STIM, entraînant alors un changement de conformation et une oligomérisation des protéines STIM permettant leur translocation vers les jonctions RE-membrane plasmique. Les multimères de STIM forment ensuite des amas appelés « *puncta* » à une distance de 10 à 25nm de la membrane plasmique. ORAI est alors recruté dans ces *puncta* et la proximité entre les STIM et ORAI va permettre leur association grâce à l'extrémité de la protéine STIM qui réside dans le cytosol et qui permet une interaction directe avec les protéines ORAI afin de leur transmettre les signaux calciques. Cette association va ensuite déclencher la formation et l'activation du canal CRAC formé par les sous-unités ORAI, ce qui permet une augmentation de la concentration calcique intracellulaire par entrée de Ca^{2+} extracellulaire de manière sélective. Une activité optimale des courants CRAC est réalisée grâce à un ratio de deux monomères de STIM par sous-unité d'ORAI (Joseph, Reicher, et Barda-Saad 2014; Soboloff, Spassova, Hewavitharana, *et al.* 2006, Cahalan et Chandy 2009). Cette action, appelée entrée de Ca^{2+} dépendante des stocks calciques (*store-operated calcium entry*, SOCE) est réversible car le calcium accumulé dans le cytoplasme peut à nouveau être capté par le RE *via* les pompes *sarco/endoplasmic reticulum* Ca^{2+} ATPase (SERCA) et les canaux peuvent ensuite s'inactiver et empêcher l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule une fois les réserves remplies (Schéma 7) (Liou *et al.* 2005; Choi *et al.* 2014; Luik *et al.* 2006; Amcheslavsky *et al.* 2015).

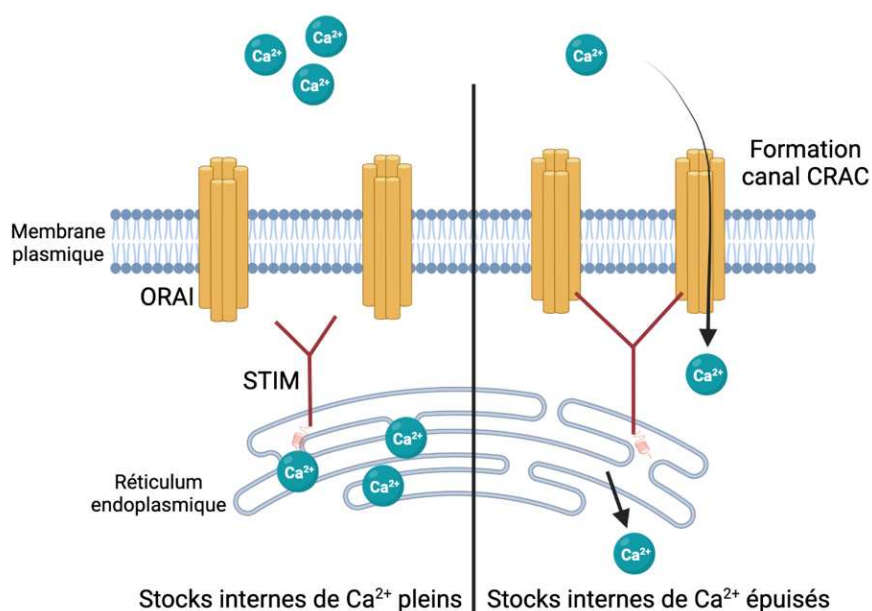


Schéma 7 : Association de ORAI et STIM pour former le canal CRAC et induire l'entrée capacitive de Ca^{2+} dans la cellule. Lorsque les réserves calciques du RE de la cellule sont

pleines, STIM est lié au calcium et les canaux CRAC sont fermés. Lors de la vidange des stocks calciques, STIM n'est plus lié au calcium et s'associe aux monomères de ORAI pour former le canal CRAC et permettre l'influx de Ca^{2+} dans la cellule.

L'interaction entre les canaux ORAI avec STIM1 et STIM2 conduit à des amplitudes d'entrée capacitive de Ca^{2+} différentes, STIM2 étant un activateur plus faible que STIM1 (Soboloff, Spassova, Tang, *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2009). Oh-Hora et son équipe ont découvert qu'une délétion de *STIM1* entraînait une réduction de l'activité des canaux SOCs qui pouvait être restaurée par STIM1 mais pas suffisamment par STIM2. Les auteurs ont également démontré qu'une déficience en STIM1 mais pas en STIM2 entraînait une localisation nucléaire uniquement transitoire de NFAT. Par ailleurs, une déficience de STIM2 permet tout de même une entrée capacitive de calcium et une production normale de cytokines. STIM1 semble donc être le principal acteur du SOCE avec les canaux CRAC (Oh-hora *et al.* 2008).

Ces résultats sont corroborés par une autre étude montrant que l'affinité de STIM2 pour le Ca^{2+} est deux fois plus faible que celle de STIM1, ce qui permet toutefois à STIM2 de contrôler l'influx basal de Ca^{2+} . Parvez *et al.* et Bema-Erro *et al.* ont rapporté qu'une surexpression de STIM2 dans la lignée cellulaire humaine embryonnaire rénale HEK293 augmente les niveaux de Ca^{2+} intracellulaire au repos alors qu'une absence d'expression de STIM2 dans des neurones corticaux les diminue (Parvez *et al.* 2008; Bema-Erro *et al.* 2009).

Aussi, les protéines STIM peuvent former des homotétramères mais également des hétérotétramères de STIM1 et STIM2 qui ont une affinité au Ca^{2+} différente étant donné la plus faible affinité de STIM2. Cette différence d'affinité a également des répercussions sur la vitesse d'oligomérisation et de réversion qui est plus rapide pour STIM1 que pour STIM2, ce qui pourrait expliquer la variabilité des réponses physiologiques suite à une entrée calcique (Liou *et al.* 2005; Stathopoulos *et al.* 2008; Brandman *et al.* 2007).

3.3 Le SOCE est induit par l'interaction des canaux ORAI avec les senseurs STIM

Les augmentations de Ca^{2+} intracellulaire peuvent être dues soit à l'afflux de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique, soit à sa libération à partir des réserves intracellulaires ou les deux. Le SOCE est une voie ubiquitaire d'influx calcique des cellules non excitables modulée par les canaux ORAI et les senseurs STIM. Cette voie est déclenchée par la liaison d'un agoniste à un récepteur couplé à une protéine G ou tyrosine kinase qui active la PLC qui va cliver le PIP_2 en IP_3 et DAG. L' IP_3 se fixe à son récepteur situé à la membrane du RE

et cela conduit à la déplétion des stocks calciques réticulaires (Tumelty *et al.* 2007; Prakriya et Lewis 2015).

Comme expliqué précédemment, cette déplétion est détectée par les STIM situés à la membrane du RE mais la libération de Ca^{2+} par le RE ne peut générer que des signaux transitoires étant donné la capacité limitée des réserves calciques. C'est une déplétion prolongée qui peut provoquer une entrée de Ca^{2+} par les SOCs, ce qui entraîne alors différents processus biologiques comme la sécrétion de cytokines, la transcription de gènes et la motilité des cellules. (Aulestia *et al.* 2018; Che *et al.* 2015; El Boustany *et al.* 2010; Li *et al.* 2013).

3.4 Implication du SOCE dans les pathologies cancéreuses

Les cellules cancéreuses subissent un certain nombre de changements comme une prolifération accrue et une atténuation des voies menant à la mort cellulaire où le remodelage de l'homéostasie calcique a été signalé comme ayant un impact significatif. Il est de plus en plus démontré que le SOCE et ses acteurs principaux jouent un rôle dans le développement de caractéristiques cancéreuses, notamment la prolifération, la migration, l'invasion ou encore l'échappement à l'apoptose. La voie SOCE fait intervenir les canaux SOCs ORAI et les senseurs STIM, qui s'avèrent primordiaux pour l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule et qui font de cette voie une cible dans les thérapies anti-cancéreuses (Xie *et al.* 2016; Zhan *et al.* 2015).

i. Rôle de ORAI1 et STIM1 dans les pathologies cancéreuses

Des études ont montré que dans certaines pathologies comme le cancer de l'œsophage et de l'utérus, une forte expression de ORAI1 et STIM1 est associée à une faible survie et à la rechute à cause de leur implication dans la prolifération, la migration, la régulation de l'apoptose et l'invasion des cellules cancéreuses (Kim *et al.* 2014).

Les protéines STIM et ORAI joueraient un rôle important dans le développement du cancer comme par exemple en modulant la migration et la métastase des cellules du cancer du sein, du colon ou encore de l'estomac. En effet, une étude sur des cellules du cancer du sein a montré que des inhibiteurs du SOCE et des siARN dirigés contre ORAI1 et STIM1 réduisaient la migration, l'invasion et les métastases tumorales *in vivo*. Les canaux ORAI contribueraient donc à la prolifération des cellules cancéreuses (Lioudyno *et al.* 2008; Fiorio Pla, Kondratska, et Prevarskaya 2016).

Dans des lignées cellulaires du cancer de l'œsophage ainsi que dans un modèle murin du cancer de l'utérus, les inhibiteurs du SOCE, 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) et

SKF96365 non spécifiques de ORAI1, ainsi qu'un siARN dirigé contre *ORAI1* ont montré une même efficacité de réduction de masse tumorale de 50%, révélant l'implication de ORAI1 dans le développement des cellules cancéreuses. De la même manière, l'expression de STIM1 semble également être plus élevée au sein des cellules cancéreuses et serait corrélée à la masse tumorale. Une surexpression ou inhibition de STIM1 exacerbe ou atténue la croissance tumorale respectivement et le recours à l'inhibiteur du SOCE SKF96365 abolit la croissance tumorale.

Une autre étude a démontré sur des lignées cellulaires d'adénocarcinome pancréatique que ORAI1 et STIM1 modulent le SOCE et jouent un rôle pro-survie et anti-apoptotique. En effet, l'inhibition de leur expression à l'aide de siARN dirigés contre eux a permis d'améliorer l'apoptose induite par des médicaments chimiothérapeutiques comme le 5-fluorouracil (5-FU) ou gemcitabine (Kondratska *et al.* 2014).

Enfin, Umemura *et al.* ainsi que d'autres chercheurs ont montré qu'une inhibition pharmacologique du SOCE et/ou de STIM1 et ORAI1 diminue la migration *in vitro* de cellules de mélanome et la formation de métastases pulmonaires *in vivo* (Zhu *et al.* 2014; Umemura *et al.* 2014; Chen *et al.* 2011).

Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de ORAI1 et STIM1 a été observée dans plusieurs cancers comme le cancer colorectal, du poumon, de l'œsophage et du rein mais pas dans le cancer de la prostate. Une diminution de l'expression de ORAI1 ou STIM1 cause une diminution du SOCE et une réduction de l'absorption du Ca^{2+} par le RE. Les cellules cancéreuses seraient donc capables d'acquérir une résistance à l'apoptose en modulant leur signalisation calcique de manière à diminuer la surcharge calcique cytosolique et augmenter la tolérance à la déplétion prolongée des réserves calciques du RE (Flourakis *et al.* 2010; Vanoverberghe *et al.* 2004; Zhu *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015).

ii. *Rôle de ORAI2, ORAI3 et des canaux TRP dans les pathologies cancéreuses*

Dans le même sens, dans le cancer de la prostate, la tumorigénèse s'accompagne d'une diminution de l'expression de ORAI1 en faveur de l'expression de ORAI3 qui fonctionne indépendamment des réserves de Ca^{2+} (Dubois *et al.* 2014). D'autre part, une étude montre que la progression du cancer du sein est associée à une surexpression de ORAI3 (Motiani, Abdullaev, et Trebak 2010). Cette surexpression favorise la formation d'hétéromultimères entre ORAI1 et ORAI3 pour former des canaux indépendants des réserves calciques, et ceci aux dépens de la formation de SOCs homomultimériques formés par des canaux ORAI1. Ce changement dans la voie préférentielle d'entrée de Ca^{2+} favorise le

développement des cellules tumorales (Benzerdjeb *et al.* 2016; Daya *et al.* 2021). D'autres études montrent aussi que l'altération de l'expression de ORAI2 contribue à la tumorigénèse et que l'inhibition de ORAI3 induit une réduction de la prolifération cellulaire et est corrélée à une diminution de l'activité transcriptionnelle de NFAT (Motiani *et al.* 2013; Liu *et al.* 2011; Faouzi *et al.* 2011, 2013; Ay *et al.* 2013).

Dans la lignée cellulaire humaine de LAM promyélocytaire HL60, une étude a montré que ORAI2 est fortement exprimé dans ces cellules et joue donc un rôle essentiel dans le SOCE et la migration cellulaire. Il est à noter que l'inhibition de ORAI3 ne montre pas d'effet significatif sur le SOCE et que les canaux TRPC1, TRPC3 et TRPC6 sont peu exprimés dans ces cellules (Diez-Bello *et al.* 2017).

Il est important de préciser qu'un certain nombre d'études démontrent l'association entre les canaux *transient receptor potential* (TRP) et CRAC. ORAI1 et STIM1 interagissent avec les TRP canoniques (TRPC), leur conférant une sensibilité à la déplétion des réserves de Ca^{2+} . Les canaux TRPC1, TRPC4, TRPC5 et TRPC6 seraient impliqués dans le SOCE et sont considérés par une partie de la communauté scientifique comme des SOCs (Fenninger et Jefferies 2019; Alicia *et al.* 2008; Ong *et al.* 2007; Kim *et al.* 2009).

Les canaux TRPC sont activés par des voies couplées à la PLC et peuvent favoriser l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. TRPC1 et TRPC4 peuvent également contribuer au SOCE par des courants cationiques non sélectifs (Leanza *et al.* 2016).

De même, il a également été montré que la surexpression des STIM et ORAI ou encore des canaux sélectifs du Ca^{2+} comme TRP vanilloïde (TRPV) 5 ou TRPV6 dans les cellules de la lignée cellulaire humaine embryonnaire de rein HEK293T modifie l'homéostasie calcique de manière à augmenter ou diminuer la concentration intracellulaire afin d'induire les processus oncogènes (Miederer *et al.* 2015; Rana *et al.* 2015; Desai *et al.* 2015).

STIM1, ORAI1, ORAI2 et TRPC1 régulent la migration des cellules du cancer du sein, du colon et de l'estomac. Leur inhibition diminue non seulement l'influx de Ca^{2+} mais également la migration cellulaire *in vivo* (Chakraborty *et al.* 2016; Guéguinou *et al.* 2016; Xu *et al.* 2016; Jardin et Rosado 2016; Kim *et al.* 2014).

Les canaux SOCs ORAI ont été identifiés comme les principaux canaux calciques connus et le rôle de ORAI1 est de plus en plus documenté dans les pathologies cancéreuses (Prevarskaya, Skryma, et Shuba 2018). L'expression des différents ORAI diffère en fonction des pathologies car ORAI1 semble être surexprimé dans les cellules du cancers du poumon tandis que ORAI3 semble être surexprimé dans les cellules du cancer de la prostate et du sein. Toutefois, le rôle des ORAI semble différer en fonction des pathologies en augmentant ou diminuant la capacité de prolifération (Diez-Bello *et al.* 2017).

Peu d'études ont montré l'implication des canaux ORAI dans le contexte des CSL et dans le cadre de mon projet de thèse, nous avons montré l'implication du canal calcique ORAI1 et de la voie SOCE dans la régulation des CSL au sein d'échantillons de patients atteints de LAM et de lignées cellulaires leucémiques humaines (Lewuillon *et al.* 2022). D'autres études *in vitro* ont montré une augmentation de l'expression de ORAI2 dans les lignées cellulaires de LAM. Ces études suggèrent un potentiel rôle de la signalisation calcique dans la persistance des CSL (Diez-Bello *et al.* 2017).

Le rôle du Ca^{2+} et des acteurs associés étant peu renseigné dans les processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la quiescence des CSH et CSL, pour qui ces fonctions sont pourtant essentielles, notre revue « Put in a « Ca^{2+} II » to Myeloid Leukemia » nous aide à mettre en lumière ce qui est connu à ce jour.

3.5 Pharmacologie des canaux SOCs

Des études ont montré que moduler la signalisation calcique et notamment l'influx calcique généré par les canaux CRAC inhibe la progression des cellules cancéreuses. L'inhibition du SOCE pourrait donc représenter une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement des cancers, et les canaux ORAI pourraient être des cibles potentielles pour le développement de médicaments. Il est donc question d'évaluer l'efficacité d'inhibiteurs spécifiques de ces canaux SOC (Prakriya et Lewis 2015; Waldherr *et al.* 2020).

L'inhibition de l'activité du canal CRAC peut être réalisée à l'aide du bis(trifluorométhyl)pyrazoles (BTP). Cette famille d'agents pharmacologiques inhibe la prolifération ainsi que la libération de cytokines par les LT humains. Le membre le plus étudié de ce groupe est le BTP2, ou YM-58483, qui inhibe l'influx de Ca^{2+} provoqué par la thapsigargine et le canal CRAC. Des résultats montrant cependant qu'une forte concentration de BTP2 diminue son efficacité d'inhibition et induit l'activation du canal TRPM4 perméable au sodium remettent en question la spécificité et efficacité de cet inhibiteur. Le mécanisme d'inhibition de l'influx calcique et de la sécrétion de cytokines par le BTP2 serait dû à une dépolarisation de la membrane plasmique *via* l'activation de TRPM4, réduisant ainsi la force motrice d'influx calcique. D'autres résultats montrent une spécificité pour les canaux CRAC, TRPC3 et TRPC5 contrairement aux canaux K^+ , CaV et TRPV6, suggérant ainsi une inhibition de ces canaux par le biais d'un mécanisme commun. De ce fait, bien que les effets du BTP2 aient été validés dans plusieurs modèles cellulaires immunitaires, les mécanismes d'inhibition de l'influx calcique restent encore incompris (Takezawa *et al.* 2006; Zitt *et al.* 2004; He *et al.* 2005).

Le 2-Aminoéthyl diphénylborinate (2-APB) est un antagoniste non compétitif des récepteurs à l'IP₃ permettant ainsi d'étudier l'implication des IP₃R dans le déclenchement des SOCs. Il a été mis en évidence un effet bimodal dose-dépendant de l'agent inhibiteur sur le SOCE en permettant de potentialiser le courant CRAC à de faibles concentrations (<5µM) et de l'inhiber à des concentrations plus élevées (>20µM). Cet inhibiteur est cependant non sélectif en inhibant ou activant également d'autres classes de canaux ioniques tels que les TRPC, TRPM, TRPV et en modulant l'efflux mitochondrial de Ca²⁺ (Zhang *et al.* 2008; Prakriya et Lewis 2001; Hu *et al.* 2004).

L'inhibiteur synta66 est structurellement similaire au BTP2 mais contient un groupe biphényle contrairement à l'anneau pyrazole du BTP2. Cet agent aux effets peu réversibles n'interagit pas avec les canaux K⁺ ou les pompes Ca²⁺, ce qui en fait un inhibiteur sélectif du SOCE. Sa vitesse d'inhibition est cependant lente et exige une préincubation supérieure à 1h. Synta66 n'impacte pas l'activation et translocation de STIM vers les sites jonctionnels du RE et de la membrane plasmique ni la formation des *puncta*. Cet agent inhibiteur est utilisé dans de nombreuses études afin d'étudier physiologiquement l'impact des canaux CRAC dans la fonction effectrice des LT. Des études ont montré que le synta66 était hautement sélectif du pore ORAI1 sans impacter la viabilité des cellules. En effet, il semblerait que l'effet du synta66 dépende de l'homologue ORAI et 10µM de synta66 inhibent les courants ORAI1, tandis que les courants ORAI2 se trouvent stimulés et les courants ORAI3 ne semblent pas être affectés (Li *et al.* 2011; Prakriya et Lewis 2015; Waldherr *et al.* 2020).

Revue

Put in a “Ca²⁺II” to Acute Myeloid Leukemia

AVANT-PROPOS

La LAM est une hémopathie maligne et hétérogène au niveau biologique, moléculaire et clinique touchant l'adulte âgé de plus de 65 ans dans 50% des cas. Cette maladie provient des cellules souches hématopoïétiques de la MO et est caractérisée par une amplification clonale et une perte de différenciation des précurseurs myéloïdes appelés cellules leucémiques. Malgré les avancées dans la détection précoce de la maladie et les traitements, le taux de survie des patients atteints de LAM reste faible et dépend de l'âge des patients.

La signalisation calcique est la première voie à être modifiée par les régulateurs épigénétiques dans les CSC et renforce l'hypothèse d'un rôle crucial de l'homéostasie calcique dans le destin et la survie des cellules en gouvernant les processus physiologiques dépendants du Ca^{2+} . De nombreuses études ont maintenant établi que la signalisation calcique est fréquemment modifiée par les cellules cancéreuses en remodelant l'activité et l'expression des canaux et pompes calciques spécifiques, ainsi qu'en altérant les échanges et signaux calciques intracellulaires qui contribuent au phénotype néoplasique. Les changements d'activité et/ou d'expression de ces protéines spécialisées sont impliqués dans l'induction de la migration, la prolifération soutenue et incontrôlée, la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme, la transcription de gènes et la résistance à l'apoptose. Ces altérations permettent aux cellules cancéreuses de développer une résistance aux immunothérapies et l'inhibition de certaines de ces protéines empêche la prolifération et/ou les métastases des cellules cancéreuses (Prevarskaya, Skryma, et Shuba 2018; Déliot et Constantin 2015; Wee *et al.* 2014).

Un enrichissement en gènes de signalisation du Ca^{2+} dans les CSC est corrélé à une sensibilité élevée aux agents thérapeutiques ciblant le Ca^{2+} , ce qui souligne l'importance de mieux comprendre les voies de signalisation calcique impliquées dans la tumorigénèse pour ainsi les cibler plus spécifiquement. Il y a donc un réel intérêt à étudier le rôle précis de la signalisation calcique et il est nécessaire de mieux définir le rôle du Ca^{2+} dans le cancer et notamment les LAM qui restent encore peu étudiées à ce sujet. Il est également important d'identifier des agents ciblant spécifiquement les canaux et pompes calciques afin de parvenir à une meilleure éradication des cellules cancéreuses.

C'est pourquoi, l'objectif de cette revue est de relater le rôle encore peu connu du Ca^{2+} et de la signalisation calcique dans les hémopathies malignes, et plus particulièrement la LAM notamment concernant (i) la prolifération, différenciation ainsi que la quiescence des CSH normales et leucémiques, (ii) le lien entre le calcium, la mitochondrie, le métabolisme

et le stress oxydatif, (iii) l'effet du microenvironnement de la MO sur le destin des cellules de LAM et enfin (iv) le mécanisme par lequel les traitements chimiothérapeutiques peuvent modifier l'homéostasie du calcium dans les cellules de la LAM.

Cette revue « Put in a « Ca^{2+} » to Myeloid Leukemia » publiée en février 2022 dans le journal *Cells* permet de confronter ce qui est connu à ce jour concernant les mécanismes dans les cancers d'une manière générale et ce qui a été observé dans les LAM. Ce travail montre que les connaissances dans les LAM sont encore limitées et, même si des résultats d'équipes travaillant sur des pathologies différentes convergent, certains résultats contradictoires sont tout de même observés, soulignant l'importance d'un approfondissement de nos connaissances des LAM.

Put in a “Ca²⁺” to Acute Myeloid Leukemia

Clara Lewuillon ^{1,†}, Marie-Océane Laguillaumie ^{1,†}, Bruno Quesnel ¹, Thierry Idziorek ^{1,‡}, Yasmine Touil ^{1,‡} and Loïc Lemonnier ^{2,3,*}

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277—CANTHER—Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France; clara.lewuillon@inserm.fr (C.L.); marie-oceane.laguillaumie@inserm.fr (M.-O.L.); bruno.quesnel@chru-lille.fr (B.Q.); thierry.idziorek@inserm.fr (T.I.); yasmine.touil@inserm.fr (Y.T.)

² Univ. Lille, Inserm, U1003—PHYCEL—Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, France

³ Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, 59655 Villeneuve d’Ascq, France

* Correspondence: loic.lemonnier@inserm.fr

† These authors contributed equally to this work.

‡ Co-Senior authors.

Abstract: Acute myeloid leukemia (AML) is a clonal disorder characterized by genetic aberrations in myeloid primitive cells (blasts) which lead to their defective maturation/function and their proliferation in the bone marrow (BM) and blood of affected individuals. Current intensive chemotherapy protocols result in complete remission in 50% to 80% of AML patients depending on their age and the AML type involved. While alterations in calcium signaling have been extensively studied in solid tumors, little is known about the role of calcium in most hematologic malignancies, including AML. Our purpose with this review is to raise awareness about this issue and to present (i) the role of calcium signaling in AML cell proliferation and differentiation and in the quiescence of hematopoietic stem cells; (ii) the interplay between mitochondria, metabolism, and oxidative stress; (iii) the effect of the BM microenvironment on AML cell fate; and finally (iv) the mechanism by which chemotherapeutic treatments modify calcium homeostasis in AML cells.

Keywords: acute myeloid leukemia; calcium signaling; leukemic stem cells; cell metabolism; microenvironment; chemotherapies

Citation: Lewuillon, C.;

Laguillaumie, M.-O.; Quesnel, B.; Idziorek, T.; Touil, Y.; Lemonnier, L. Put in a “Ca²⁺” to Acute Myeloid Leukemia. *Cells* **2022**, *11*, 543.

<https://doi.org/10.3390/cells11030543>

Academic Editors: Bruno Constantin and Valérie Coronas

Received: 30 November 2021

Accepted: 1 February 2022

Published: 4 February 2022

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



Copyright: © 2022 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

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous hematologic malignancy at the biological, molecular, and clinical levels. AML is characterized by clonal amplification and the loss of differentiation of myeloid precursors (blasts) in the bone marrow (BM) and peripheral blood. AML is a pathology of aged adults, with more than 50% of patients identified at age >65 years. Despite a tremendous effort to decipher genetic aberrations such as leukemia-associated chromosomal translocations and inversions, as well as multiple somatically acquired mutations that affect genes of different functions that improve prognosis, the AML patient survival rate remains poor and is largely age-dependent [1]. AML originates from BM hematopoietic stem cells (HSCs). Primary commonly acquired mutations arise in genes involved in the epigenomic process, such as DNMT3A, ASXL1, TET2, IDH1, and IDH2, and already exist in the founding clone. In contrast, secondary mutations involving NPM1 or signaling molecules (e.g., FLT3, RAS gene family) typically occur later during leukemogenesis. In addition, AML can be subdivided into distinct classes, including acute promyelocytic leukemia (APL) and myelodysplastic-syndrome-related AML, which involve different genetic aberrations (Myc, etc.) [2].

Calcium ions are the main second messengers in cells and are crucial for cell fate and survival. Intracellular Ca²⁺ homeostasis relies on the organized activity of various Ca²⁺

channels, pumps, and exchangers, which maintain a precise Ca^{2+} concentration in the cytoplasm and organelles such as the endoplasmic reticulum (ER), mitochondria, lysosomes, and nucleus [3–5]. Transient or sustained activation of this machinery regulates changes in the duration and levels of intracellular calcium, thereby governing calcium-dependent physiological processes.

Alterations in calcium signaling and homeostasis affect numerous cellular functions and are involved in various pathological states, including cancer. Dysregulated calcium signaling cascades have been shown to result in processes crucial for uncontrolled proliferation and tumorigenesis. These processes include gene transcription, regulation of the cell cycle, proliferation, metabolism, apoptosis, autophagy, and cell migration and may affect the development of resistance to cancer therapies [6].

Alterations in calcium signaling have been extensively studied in solid cancers. There is much less knowledge of hematologic malignancies such as myeloid leukemia, except for chronic myeloid leukemia (CML), for which the tyrosine kinase activity of Bcr–Abl seems to regulate calcium homeostasis [7].

Two recent publications highlight the important role of calcium in the maintenance of normal stem cells, both active and dormant. Luchsinger et al. show that a low-calcium medium increases the viability of HSCs in vitro [8]. These have a low cytoplasmic calcium concentration that is maintained by glycolytic activity. Fukushima et al. developed another strategy by which a non-phosphorylatable fluorescent marker allows in vivo discrimination between dormant and active stem cells [9]. It shows the implication of calcium concentration in dormancy and that marrow reconstitution by HSC is favored by a high concentration of cytoplasmic calcium. The bone matrix allows the localization of hematopoietic stem cells in niches that are critical for their regulation [10]. In bone, these niches are mainly located in vascularized areas and more rarely in trabecular areas. The latter, however, have a strong potential for self-renewal and reconstruction of hematopoiesis that emphasizes their importance, especially for the development of leukemic cells [11]. There is a real interest in studying the precise role of calcium signaling in AML, which remains mostly unclear.

Taking into account the current knowledge of calcium signaling in cancer cells as well as in normal hematopoiesis, our purpose is to shed light on four peculiar topics: (i) the quiescence of these hematopoietic stem cells and AML cell proliferation and differentiation; (ii) the role of mitochondria, metabolism, and oxidative stress; (iii) the effect of the BM microenvironment on AML cells; and finally (iv) therapeutic approaches.

2. The Role of Calcium Homeostasis in AML Cell Proliferation and Differentiation

The dysregulation of calcium signaling and homeostasis impacts numerous cellular functions. Several Ca^{2+} -dependent signaling pathways are therefore involved in cancer initiation and development. The precise control of intracellular calcium concentration is crucial for the modulation of many signaling pathways and Ca^{2+} -regulated proteins involved in specific cellular processes, including the regulation of key cellular functions such as the cell cycle, proliferation, and differentiation.

Our review focuses on the role of Ca^{2+} channels and downstream intracellular signaling pathways in regulating proliferation and differentiation in acute myeloid cell lines or primary AML samples. Numerous reviews have presented the remodeling of intracellular Ca^{2+} homeostasis in cancer cells from solid tumors but very few in hematologic malignancies and none in acute myeloid leukemia. We here focus on studies that highlight a functional role for Ca^{2+} channels and downstream intracellular signaling pathways that lead to changes in proliferation and differentiation in acute myeloid leukemia. Our review also focuses on the regulation of quiescence by calcium signaling in normal hematopoietic stem cells and leukemic stem cells.

2.1. Calcium and Cell Cycle Regulation in AML

Cell division and proliferation are ruled by the cell cycle, which is a four-stage process: the first gap phase G1; the S phase, in which DNA replication occurs; the second gap phase G2; and the M phase, or mitosis, in which the DNA and cytoplasmic material are shared between two new daughter cells. The progression between these different phases is tightly regulated, and variations in intracellular Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i play a key role throughout the cell cycle, namely during the early G1 phase and at the G1/S and G2/M transitions.

The initiation of centrosomal duplication at the G1/S phase is also dependent on Ca^{2+} and calmodulin (CaM) [12,13]. CaM appears to be mobilized early after mitogenic stimulation and late in the G1 phase near the G1/S transition [14,15]. In late G1, Ca^{2+} /CaM is required before the restriction point and pRb phosphorylation [16]. In AML, it has been shown that Ca^{2+} and CaM are involved in regulating cell proliferation in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Indeed, cytosolic calmodulin levels were increased according to the cell cycle phase and more generally during cell cycle progression. Additionally, it has been shown that calmodulin antagonists slow cell growth in a concentration-dependent manner [17], thus underlying the critical role of the Ca^{2+} /CaM pathway in leukemia cells.

CaM kinase II (CaMKII) is necessary for cell cycle progression [18]. Inhibition of CaMK activity was shown to inhibit cell proliferation and is correlated with growth arrest in AML. Monaco et al. reported that inhibition of CaMKII activity results in an upregulation of CaMKIV mRNA and protein expression in leukemia cell lines. Interestingly, AML cells (primary cells and cell lines) expressing CaMKIV show elevated levels of Cdk inhibitors p27 (kip1) and p16 (ink4a) and reduced levels of cyclins A, B1, and D1. These findings indicated potential cross-talk between CaMKII and CaMKIV and suggest that CaMKII could suppress the expression of CaMKIV to promote leukemia cell proliferation [19]. Nevertheless, another study showed contradictory results regarding the effect of CaMKs on AML proliferation. It has been shown that the suppression of CaMKs (CaMKIV) coupled with human leukocyte immunoglobulin-like receptor B2 (LILRB2) signaling is associated with decreased human acute leukemia proliferation *in vitro* and *in vivo* [20].

Calcineurin, a calcium-dependent phosphatase, also plays a crucial role in the transition through the G1 and S phases and was shown to regulate the expression of cyclins A and E [21] and the accumulation of cyclin D1 [18]. Calcineurin is also very well known to activate NFAT and to mobilize MYC [22,23] in regulating cyclins E and E2F, which brings an additional link between calcium-dependent pathways and proliferation. However, the role of calcineurin in AML and its precise function in the regulation of cell cycle checkpoints in these malignant hemopathies are unknown. Nonetheless, one study showed that the activity of calcineurin was decreased by 85% in the sera of patients diagnosed with AML, while no significant changes in calmodulin or calcineurin levels were observed [24].

2.2. Calcium Channels and Proliferation in AML

The calcium/calcineurin/NFAT pathway is one of the main mechanisms that can be activated by calcium influx through membrane calcium channels. The use of calcium channel inhibitors has strengthened the notion that calcium influx plays a critical role in cell proliferation. The antiproliferative effects of the inhibition of calcium channels have been shown in numerous tissues. In AML cells, the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) ion channel displayed high expression compared to CD34⁺ healthy precursor cells, and its suppression inhibited the proliferation of leukemia cells. These findings show that TRPM2 has an important role in AML proliferation mediated by the regulation of key transcription factors, such as ATF4 and CREB [25]. It was also shown that the dextroisomer *r*-verapamil, which inhibits Cav1.2, an L-type calcium channel, by binding to a specific area of its α -1 subunit, causes dose-dependent inhibition of leukemic cell proliferation. These results were observed in blast cells derived from patients with AML [26].

Calcium transport could be achieved by the activation of upstream partners such as inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 (ITPR2), which is located in the endoplasmic reticulum membrane and regulates the mobilization of intracellular Ca^{2+} stores through SERCA pumps and/or exchangers. Thus, ITPR2 plays a pivotal role in intracellular Ca^{2+} signaling and subsequently in the cell cycle and proliferation. ITPR2 expression is increased in AML patients with a normal karyotype compared to healthy patients. In a cohort of 157 AML patients, high ITPR2 expression was associated with dramatically shorter overall survival and event-free survival [27]. Further investigations are needed to determine the precise calcium-dependent mechanism underlying the aggressive phenotype of leukemic cells with high ITPR2 expression in AML.

2.3. Implication of Notch and Ca^{2+} Signaling in AML Proliferation

It has been recently shown that Notch increases Ca^{2+} entry by activating calcium-sensing receptors and inhibiting voltage-gated K^+ channels [26] and that it could also enhance store-operated Ca^{2+} entry [28]. The new human leukemia cell line TMD7, established from blast cells of a patient with de novo acute myeloblastic leukemia, expressed Notch-1 and Notch-2 mRNA. Exposure to recombinant Delta-1 protein, a Notch ligand, significantly increased the proliferation of TMD7 cells [29]. It has also been shown that Notch signaling can maintain the proliferation and survival of the HL60 human promyelocytic leukemia cell line and promotes the phosphorylation of the Rb protein [30]. Other studies have shown, however, that Notch activation can inhibit AML growth and also alter AML-initiating cell compartments [31,32]. The nature of the Notch ligands seems to be crucial in the resulting effect of Notch activation. Indeed, when the ligand used is Jagged1 instead of Delta1, inhibition of proliferation and survival are observed in AML cells. Interestingly, opposite effects of the Notch ligands Jagged1 and Delta1 have been reported on the growth of primary AML cells [33]. While their associated roles in calcium signaling are still under investigation, it would be interesting to clarify the calcium mobilization pattern associated with Notch ligands in AML.

2.4. Calcium Involvement in AML Differentiation

Any dysregulation in myeloblast differentiation represents a key cellular and molecular event that could be studied for a better understanding of AML. Complete remission in patients with APL has been achieved using targeted therapies such as all-trans retinoic acid (ATRA) and/or arsenic trioxide [34]. However, the response of non-APL AML patients to treatment remains poor, indicating the need for a better understanding of the differentiation processes in this disease.

Myeloid differentiation involves the activation of new signaling pathways and the acquisition of new effector functions. Cellular calcium homeostasis and calcium-dependent signaling are intimately involved in these processes. Thus, intracellular calcium transport may be significantly remodeled during differentiation [34]. Some studies have shown the link between differentiation and calcium signaling in AML. It has been shown that the modulation of calcium pump expression, specifically of the sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) pumps, is an integral component of the differentiation program of myeloid precursors and indicates that lineage-specific remodeling of the ER occurs during cell maturation. In addition, it was shown that SERCA isoforms may serve as useful markers for the study of myeloid differentiation [34]. In vitro studies have shown the mechanisms implicated in leukemic cell differentiation. The binding of S100A9 to Toll-like receptor 4 (TLR4), which promotes the activation of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and Jun N-terminal kinase signaling pathways, could lead to myelomonocytic and monocytic AML cell differentiation [35]. Few studies have been published regarding the implication of calcium in the induction of AML cell differentiation through direct or indirect mechanisms. Calcium ionophores can, by themselves, induce the differentiation of primary human AML cells into dendritic cells [36]. It has also been shown that Ca^{2+} signaling, through the receptor IP3R1,

sensitizes cells to the effect of retinoic acid. Differentiation induced by retinoic acid was associated with a significant reduction in c-Myc expression and an increase in membrane tyrosine kinase activity in AML cell lines [37].

2.5. Calcium and Cell Cycle Regulation in Normal and Cancer Stem Cells (CSCs)

In recent years, research has started to highlight that calcium channels play a key role in CSC function. Calcium channels are indeed involved in the mechanisms required for their function, leading to cancer progression and treatment resistance. Cancers are most commonly treated with a combination of surgery, chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy. However, several studies have demonstrated that these treatments fail to target or actively select a specific subset of resistant cells termed CSCs [38]. CSCs are characterized by their capacity to remain quiescent and to resist apoptosis, properties generally associated with treatment resistance and tumor relapse [38]. Therefore, deciphering the mechanisms underlying the quiescence of cancer cells or CSCs appears to be crucial in cancer research.

Quiescent cells are found in G₀, a resting phase outside of the cell cycle distinct from the G₁ phase observed in cycling cells. Regulation of several key players, including cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs), CDK inhibitors, and retinoblastoma protein (Rb), dictate cell fate (G₀ entry, cell cycle engagement). Decrease in the expression and activity of cyclin D–CDK4/6 and cyclin E–CDK2 complexes could induce quiescence [39].

The role of calcium in the regulation of stem cell quiescence is still poorly understood. It was shown that the NFATc1 isoform can control hair follicle normal stem cell quiescence by suppressing cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and cell cycle progression [40]. It was also shown that glioblastoma stem-like cells (GSLCs) can be maintained in a quiescent state by decreasing the extracellular pH. Interestingly, in this study, the authors observed that the changes in Ca²⁺ homeostasis appearing during the switch from proliferation to quiescence are determined by store-operated channels (SOCs) since the inhibition of SOCs promotes the quiescence of proliferating GSLCs and induces a dramatic and reversible change in mitochondrial morphology [41].

Regarding the regulation of quiescent HSCs, an increasing number of studies have shown a crucial impact of cytoplasmic calcium concentration [42]. There is a remodeling of intracellular Ca²⁺ homeostasis in HSCs exiting the quiescent state and undergoing commitment. Therefore, Ca²⁺ signaling seems to be highly implicated in hematopoiesis. Nevertheless, studies are currently incomplete and sometimes contradictory. Some studies have shown that Ca²⁺ signals oscillate between keeping HSCs in the quiescent state or activating them when commitment is needed [43]. Toward a differentiation cell fate, it was shown that Ca²⁺ signaling could favor nuclear translocation of the commitment promoter NFAT and degradation of the self-renewal promoter Tet2 [44]. In contrast, an elegant study has shown that quiescent cells display higher intracellular Ca²⁺ concentrations and that niche factors favor [Ca²⁺]_c elevation to induce quiescence (possibly via the calmodulin/CaMKs pathway) [9]. Single-cell RNA-seq analyses showed that the gene expression profiles of dormant/quiescent and active HSCs were nearly identical, except for Cdk4/6 activity. Moreover, high-throughput small-molecule screening revealed that high concentrations of cytoplasmic calcium ([Ca²⁺]_c) were linked to HSC quiescence. These findings indicate that quiescent and active adult HSCs could be distinguished from one another according to the regulation of Cdk4/6 and [Ca²⁺]_c [9].

The apparent contradiction of these observations highlights the crucial need to more precisely decipher the mechanisms underlying the implication of Ca²⁺ signaling in the balance between the quiescent and active states of HSCs (Figure 1).

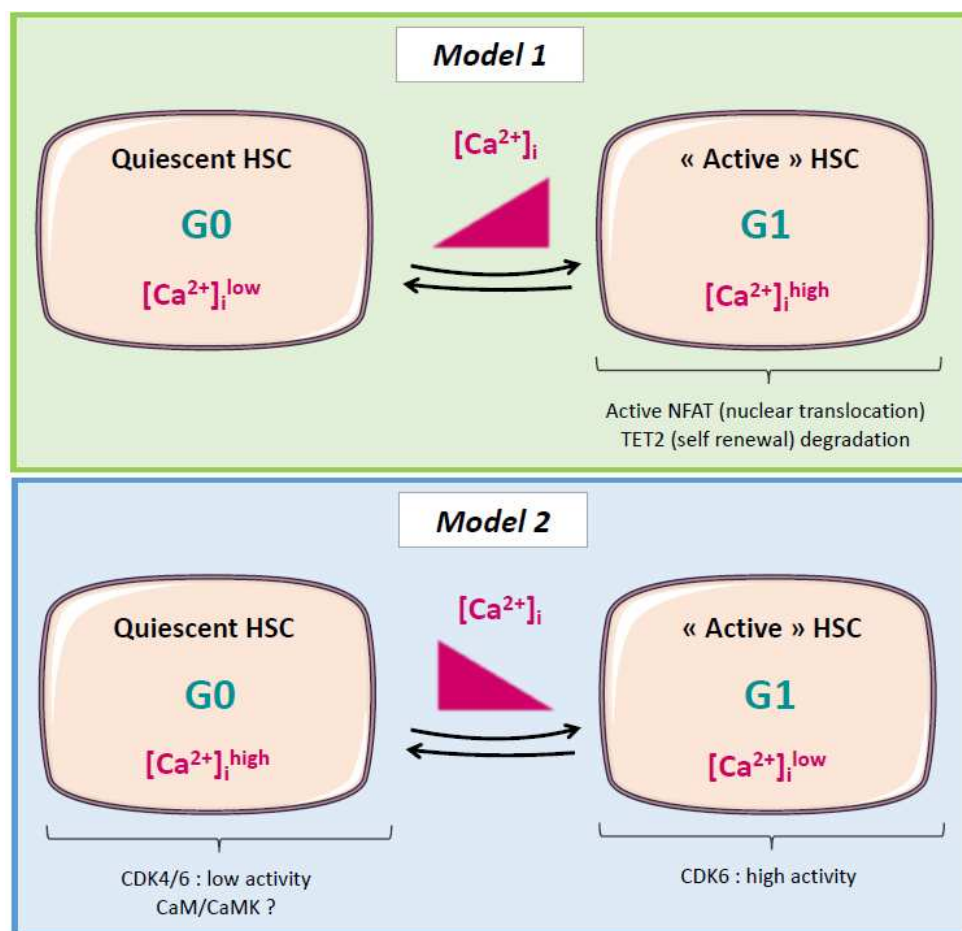


Figure 1. Schematic diagram illustrating the two proposed models of calcium-dependent mechanisms controlling the switch between quiescence and cycling state in HSC. In model 1 [42] and model 2 [9], quiescent hematopoietic stem cells (HSC) display distinct features compared to the cycling/active HSC. In model 1, intracellular Ca^{2+} concentration increases during the switch from G0 to G1 state. Active HSC display active NFAT and TET2 degradation. In model 2, it is proposed that intracellular Ca^{2+} concentration decreases during G0 to G1 transition, leading to an increase in CDK4/6 activities, and that the calmodulin (CaM)/CaM kinase (CaMK) pathway is involved in HSC quiescence.

2.6. Leukemic Stem Cells (LSCs), Relapse, and Calcium: A Possible Link?

Relapses in AML are a result of the persistence of chemoresistant leukemic cells, also termed minimal residual disease (MRD). Several studies have demonstrated subclonal heterogeneity and a hierarchy of human leukemia-initiating cells (LICs), including LSCs [45], and Bachas et al. showed that a minor subpopulation of LICs responsible for relapse was present at diagnosis in patients [46]. Therefore, a better understanding of the mechanisms of LSC regulation would help to prevent relapse in AML. As described above, some studies have shown that Ca^{2+} signaling is involved in HSCs and in CSC regulation. However, to our knowledge, no study has described the calcium signaling pathways involved in LSC/LIC regulation. Interestingly, RNA-seq analysis of AML patient samples revealed that some NFAT isoforms (NFATc2/3) were overexpressed in AML blasts at relapse compared to blasts at diagnosis [47]. Although the mechanisms were not described in this study, these observations could link calcium-dependent pathways to the properties of leukemic cells causing relapse in AML. Further investigations are needed to better understand the calcium-associated mechanisms underlying relapse in AML, particularly those related to LSCs.

2.7. Future Directions

In the above sections, we have highlighted several targets/pathways of interest and hypothetical mechanisms associated with calcium signaling (summarized in Table 1 and in Figure 1) and related to AML proliferation and differentiation or to CSC/HSC quiescence. Nevertheless, few studies have investigated the link between calcium signaling and AML cell differentiation or cell cycle regulation so far, and none were performed on leukemic stem cells. In addition, some observations are contradictory. This may be explained by (i) the different origins of the biological material used, i.e., cells lines vs. primary leukemic cells cultured in different laboratories; (ii) the difficulty in studying rare cells such as HSC or LSC; and (iii) the high heterogeneity of AML disease. Regarding the last point, and as was already mentioned, AML is a complex and highly heterogenous hematologic malignancy which displays a plethora of genetic/epigenetic modifications, possibly impacting calcium signaling and therefore leukemic cell fate toward differentiation and/or proliferation. Interestingly, it was shown in normal myeloid cells that NFAT negatively regulates genes that dictate entry in the cell cycle, such as Cdk4 and Cdk6. This effect was associated with the FLT3 ligand-associated signaling and the phospholipase PLC γ 1-dependent calcium influx [48]. This study suggests that NFAT proteins can inhibit proliferative signaling in myeloid cells and interact with the FLT3 receptor, a protein commonly mutated in AML. It could therefore be interesting to focus future efforts to study the impact of Ca²⁺ signaling on key actors of cell division and proliferation in AML cells, depending on the genetic background and/or the differentiation stage of the disease.

Compared to normal myeloid cells, contradictory results regarding the role of NFAT in proliferation have been shown in AML. Indeed, the NFAT isoform c1 was shown to be frequently overexpressed in AML cells bearing the FLT3 mutation and displaying an excessive proliferation [49]. Despite the discordant observations made between normal and leukemic cells, this study underlines the possible link between calcium signaling and cell cycle regulation in AML cells with a specific genetic anomaly background. Further studies are thus still required to better understand the precise role of calcium signaling in AML proliferation and differentiation.

Table 1. Summary of the main targets/pathways of interest associated with calcium signaling and related to AML proliferation and differentiation.

Sub-Sections	Targets	Mechanisms	Biological Effect	Biological Sources	References
Ca²⁺ Signaling and Cell Cycle Regulation	CaM	-Increased cytosolic CaM -Transition G1 to S	Increased proliferation	HL60 promyelocytic AML cell line	[17]
	CaMKII	-Decreased Cdk inhibitors p27 (kip1) and p16 (ink4a) -Increased cyclin A, B1, D1	-Increased proliferation -Cell cycle progression	AML cell lines	[19]
	CaMKIV	-Increased p27, p16 -Decreased cyclin A, B1, D1	-Decreased proliferation	AML cell lines	[19]
	CaMKIV	-Phosphorylation Rb -Transition G1 to S	Increased proliferation Proliferation?	Primary AML cells	[18]
	Calcineurin	-Cyclin A, D1? -Cyclin E, E2?	Decreased calcineurin activity (~85%)	Sera from AML patient	[24]
Ca²⁺ Channels and Proliferation in AML	TRPM2	ATF4, CREB	Increased proliferation	Primary AML cells	[25]
	Cav.1.2, L-type calcium channel	-Ca ²⁺ entry	Increased proliferation	Primary AML cells	[26]
	ITPR2	SERCA pumps	Cell cycle progression	Primary AML cells	[27]
Notch and Ca²⁺ Signaling in AML Proliferation	Notch/Delta ligand	-Calcium sensor receptor -SOCE	Increased proliferation	TMD7 AML cell line	[29]
	Notch/Delta1 ligand	-Calcium sensor receptor -SOCE	Increased proliferation	HL60 promyelocytic cell line	[30]

Calcium Involvement in AML Differentiation	Notch/Jagged1 ligand	-Calcium sensor receptor -SOCE	Decreased proliferation	Primary AML cells, AML cell lines	[28,33]
	SERCA pumps	-Ca ²⁺	Increased differentiation	Primary AML cells	[34]
	S100A9/TLR4	-p38, ERK1/2, JNK	Increased differentiation	Primary AML cells	[35]
	Ca ²⁺ concentration		Increased differentiation	Primary AML cells	[36]
	IP3R1	-Decreased c-myc expression	Increased AML cells	AML cell lines	[37]

3. Mitochondria, Calcium, and AML

One hundred years ago, Warburg proposed that cancer may originate from dysregulated metabolism. Mitochondria are essential organelles that facilitate cell metabolism and energy supply through oxidative phosphorylation (OXPHOS) and acid-driven and/or fatty acid oxidation (FAO) [50,51]; they are also involved in calcium homeostasis and reactive oxygen species production, which play a role in apoptosis (cell death).

The citric acid cycle, also known as the TCA cycle or the Krebs cycle, is a metabolic pathway in all aerobic organisms whose primary function is to oxidize acetyl groups, notably from degraded carbohydrates, fats, and proteins, to restore energy production. The process yields one GTP or ATP and several electrons that circulate through the respiratory chain to allow the formation of additional ATP molecules through OXPHOS. Mitochondrial Ca²⁺ uptake engages aerobic metabolism by triggering the activity of three TCA cycle dehydrogenases: pyruvate dehydrogenase (PDH) via pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1) and isocitrate and α -ketoglutarate dehydrogenases (IDH and OGDH, respectively) (for review see [52]).

3.1. Normal Hematopoiesis

Hematopoiesis takes place in the bone, and HSCs share a specialized microenvironment called a niche with a variety of other cells, such as osteoblasts, osteoclasts, macrophages, adipocytes, and perivascular mesenchymal and endothelial cells, to maintain their pluripotent status. The niche provides hypoxic conditions for the maintenance of HSC quiescence. Quiescent HSCs display low intracellular Ca²⁺ levels in both the cytosol and mitochondria in vivo, which is partly fulfilled via low plasma membrane Ca²⁺ influx activity [43]. Low-calcium environments maintain HSCs' stem cell features in vitro. In turn, high Ca²⁺ levels increase mitochondrial OXPHOS and compromise stem cell functions while promoting the gene expression of a series of differentiation markers [8], indicating that disturbing mitochondrial Ca²⁺ signaling may reshape the future of HSCs. Fukushima et al. developed a strategy to discriminate quiescent (dormant) from active stem cells using a nonphosphorylatable p27 G0 marker fused to a yellow fluorescent protein, and this strategy bypassed the ER/mitochondrial pathways. Their data show the implication of the calcium concentration in dormancy. Reconstitution of the BM by HSCs in vivo is promoted by a high concentration of cytoplasmic calcium [9], somewhat opposing the results obtained by Luchsinger et al. in their in vitro model.

Under some conditions, such as interferon treatment or 5-fluorouracil-induced BM suppression, HSCs exit the quiescent state and actively enter the cell cycle [43,53]. Umemoto et al. provided evidence that the initiation of cell division starts with increased intracellular Ca²⁺ levels. The resulting enhancement of mitochondrial membrane potential is accompanied by increases in mitochondrial Ca²⁺ levels, mitochondrial superoxide levels, and intracellular ATP content. Inhibiting the increase in intracellular Ca²⁺ via treatment with nifedipine, an antagonist of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels (LTCCs), drastically affected mitochondrial Ca²⁺ levels and preserved HSC stem cell features.

One potential mechanism by which mitochondrial Ca²⁺ controls the HSC cell cycle and gene expression is epigenetic regulation. Aside from increased ATP synthesis and ROS production, Ca²⁺ affects the epigenome by allowing the formation of acetyl-CoA and α -ketoglutarate (α -KG). While acetyl-CoA is known to be an essential substrate for histone

acetylation, α -KG could also play a role. Lombardi et al. recently provided evidence that the loss of mitochondrial Ca^{2+} uptake stimulates myofibroblast differentiation and fibrosis. They identified that MICU1-mediated MCU triggering elicits a metabolic switch; in this process, α -KG regulates the activity of histone demethylases, including histone lysine demethylases (KDMs) and ten-eleven-translocated (TET) enzymes, and epigenetic remodeling ultimately regulates cell fate [54].

3.2. LSCs and AML

Acute myeloid leukemia arises either *de novo*, in which the earliest mutation triggers the development of the disease, or may expand from other hematological malignancies following the stepwise increase of chromosomal and/or genetic/epigenetic abnormalities [55–59]. Until now, the mechanisms supporting the regulation and clinical significance of the Ca^{2+} /mitochondria pathways have remained mostly unidentified in LSCs. LSC metabolism is distinct from that involved in normal HSCs [60–62]. While HSCs exploit both OXPHOS and glycolysis, LSCs are defective in glycolysis and mostly rely on amino acid-driven OXPHOS for their basal energy needs but may also oxidize fatty acids to sustain OXPHOS [63].

Fatty acid metabolism has gained substantial interest in hematological malignancies, including AML. LSCs primarily reside in the BM niche in a scarce but adipocyte-rich environment. Tabe et al. and Maher et al. extensively and carefully describe the “ins and outs” of FAO involvement in leukemia [64,65]. In mitochondria, metabolized fatty acids generate NADH and FADH through β -oxidation. These molecules operate as cofactors in the electron transport chain to produce ATP and acetyl-CoA, the latter of which enters the TCA cycle. FAO is essential in AML cells with overexpression of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) [66] and in AML stem cells that are resistant to the venetoclax/azacitidine regimen [67]. Genetic reduction and pharmacological inhibition of VLCAD impaired mitochondrial respiration and the FAO contribution to the TCA cycle, while pharmacological inhibition of FAO restored sensitivity to venetoclax/azacitidine AML stem cells.

Several proteins involved in mitochondrial calcium signaling present abnormal expression at the plasma membrane (PM) of LSCs and AML cells, such as oxysterol-binding proteins (ORPs), TRPM2, and neurokinin-1 receptor (NK-1R).

ORPs govern phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) and cholesterol trafficking to the PM. Zhong et al. reported that abnormally increased expression of ORP4L is crucial for leukemia stem cell survival. It allows inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) formation by removing PIP2 from the plasma membrane and presenting it to phospholipase C β 3 (PLC β 3) for hydrolysis. IP3 generation activates IP3Rs, leading to ER Ca^{2+} release to enhance mitochondrial respiration. They described the synthesis of LYZ-81, a molecule that binds ORP4L competitively with PIP2 and inhibits PIP2 hydrolysis, generating a defective Ca^{2+} signaling [68]. The TRPM2 ion channel is activated by free intracellular ADP-ribose in synergy with free intracellular calcium [69].

NK-1R is the high-affinity receptor for substance P (SP). Dysregulation of the SP/NK-1R complex plays a part in multiple pathologies, including pain, chronic inflammation, affective and addictive disorders, and cancer [70,71]. Here, Ge et al. demonstrated *in vitro* and *in vivo* the ability of NK-1R antagonists (SR140333 and aprepitant) to induce AML cell apoptosis through IP3R-mediated calcium ER–mitochondrial efflux. Subsequent VDAC-elicited calcium overload induces ROS mitochondrial dysfunction, activating a DNA damage program through ATM and CHK2 activation and resulting in apoptosis [72]. Taken together, these data suggest that blocking Ca^{2+} signaling at the plasma membrane level may combat LSCs and AML cells by targeting their mitochondrial bioenergetic processes.

In addition, several components of the calcium signaling family at the plasma membrane have been described in AML. At the level of purinergic P2 receptors, decreased expression of P2XR3 genes involved in apoptosis mechanisms was observed in EVI-1 AMLs

[73]. Conversely, P2X7R upregulates Pbx3, therefore promoting the progression of MLL-AF9 AML [74].

3.3. Mitochondrial Calcium and Its Implication in Cancer Mechanisms

Calcium plays a role in many mitochondrial mechanisms in cancer cells. mTORC2–AKT induces direct phosphorylation of IP3R, which induces an escape from cell death by stopping the flow of calcium between the ER and the mitochondria. In liver, lung, breast, and colorectal cancers, GTPase mitofusin-2 (Mfn2) located at the outer membrane of the mitochondria is able to restore cell death by inhibiting the mTORC2–AKT axis [75]. Other proteins can modulate the death pathway of cancer cells, such as Bcl-2, which exerts calcium-dependent oncogenic activity by inhibiting apoptosis stimuli through direct interaction with IP3R and Bax [76]. During apoptosis, the oncosuppressive protein p53 induces the release of calcium from the reticulum to the mitochondria by increasing the activity of the SERCA pump. Likewise, the PML protein can interact with IP3R3 to induce calcium flux from the ER to the mitochondria, thereby affecting apoptosis and autophagy [6].

As mentioned previously, the IP3R receptor located on the ER promotes mitochondrial oxidative phosphorylation by allowing the supply of calcium to the mitochondria. Calcium-dependent apoptosis is predominantly mediated by the IP3R3 variant in mammals. Kuchay et al. argued that the F-box protein FBXL2 is able to bind to IP3R3 to degrade ubiquitin and thus reduce mitochondrial calcium influx. Interestingly, a mutation of PTEN (homologous gene of phosphatase and tensin) is often observed in cancers, in which PTEN is able to compete with FBXL2 by binding to IP3R3, inhibiting cell death by hindering mitochondrial calcium overload [77].

Autophagy is also a mechanism used by cancer cells. The increased expression of VGCC reduces autophagy. Conversely, the decrease in ORAI1 activates autophagy. Additionally, an increase in cytosolic calcium allows the activation of CAMKII, which in turn activates autophagy by regulating the AMPK–mTOR axis [78].

3.4. Isocitrate Dehydrogenase in AML

Isocitrate dehydrogenase (IDH) is a crucial cellular enzyme in the TCA cycle. Its main role is to promote the oxidative decarboxylation of isocitrate into α -ketoglutarate. Among the five IDHs identified, three were located in the mitochondrial matrix and were NAD-dependent. The other two are NADP-dependent isocitrate dehydrogenases, one of which is predominantly cytosolic (IDH1) and the other mitochondrial (IDH2). The two NADP-dependent isozymes act as homodimers, and NADP and Ca^{2+} bind in the active site to generate different structures. Xu et al. revealed a new self-regulatory mechanism of activity in which NADP is already binding to the open, inactive form, while the competitive binding of isocitrate and calcium allows conformational changes, resulting in the closed, active form (Figure 2) [79].

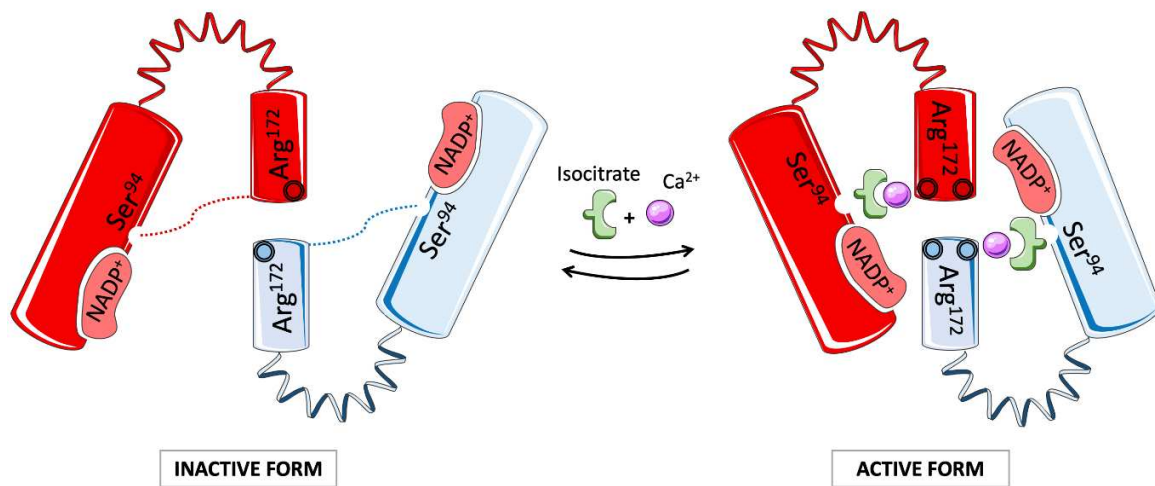


Figure 2. Structure and activation of wild-type IDH2. IDH2 functions as a homodimer, each containing a large NADP⁺-binding/catalytic domain linked to the small domain by a clasp structure. The open form is maintained by hydrogen bonds between Ser⁹⁴ and Arg¹⁷², which obstruct the active site. IDH2 becomes activated by switching its conformation. The substrate binding site is made of binding sites for NADP⁺ and isocitrate bound to divalent cations such as Ca²⁺, Mg²⁺, and Mn²⁺. The oxidative catalysis and decarboxylation of isocitrate induce the production of α -KG and NADPH. Mutations in the IDH2 active site provide a gain-of-function activity that converts α -KG to the D2HG oncometabolite (adapted from [79,80]).

Mutations in the IDH1/2 family were reported in metastatic colon cancer in 2006 and then in primary and secondary gliomas two years later following large-scale sequencing [81–83]. IDH1/2 mutations were later identified in approximately 20% of patients with AML through whole genome sequencing for IDH1 and by the identification of somatic IDH2 mutations [84–87]. The frequencies of IDH1 and IDH2 mutations are similar in AML patients and are reciprocally exclusive [88]. The protein structure of mutated IDH1 and IDH2 proteins showed that these enzymes were not inactive but acquired a new active site and the capacity to convert isocitrate to 2-hydroxyglutarate (2-HG) [87,89]. 2-HG was later shown to inhibit hypoxia-inducible factor (HIF1)- α degradation and alter the epigenetic landscape, suggesting that it may function as an oncometabolite. The precise roles of calcium and NADP in the activity of mutated IDH1/2 in AML cells are not known. Computational studies using an allosteric inhibitor suggest that it binds tightly with the divalent calcium cation at the homodimer interface. It then inhibits the formation of the IDH2/R140Q homodimer to a closed conformation that is required for catalysis, resulting in a decrease in NADPH binding [90]. Interestingly, ivosidenib and enasidenib, which are inhibitors of mutated IDH1 and IDH2, respectively, have recently entered phase 1 trial and displayed promising one-year survival effects [91].

In conclusion, there is a striking difference between HSCs and LSCs regarding mitochondrial metabolism, the former relying on both OXPHOS and glycolysis while glycolysis-defective LSCs exploit amino acids, and to a lesser extent fatty acids, to sustain OXPHOS. In addition, LSCs present an abnormal expression of plasma membrane and cytoplasmic proteins that transport calcium to the mitochondria via the endoplasmic reticulum. Finally, mitochondrial enzymes such as IDH are mutated, perturb the Krebs cycle, and produce potential oncometabolites. Thus, the precise role of mitochondrial calcium signaling should deserve closer consideration in order to discover new therapeutic molecules (Figure 3).

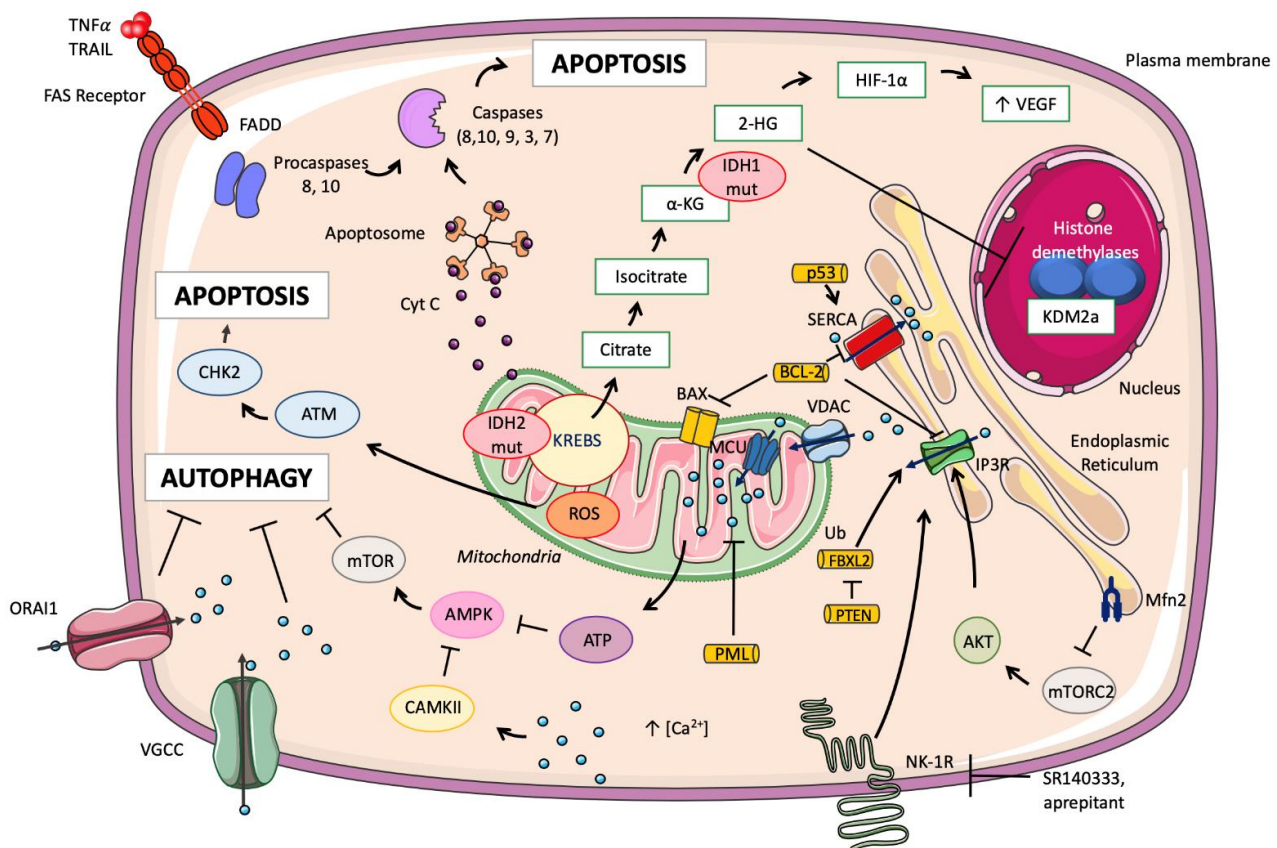


Figure 3. Mitochondrial calcium and its implication in cancer mechanisms. Calcium plays a role in many mitochondrial mechanisms in cancer cells. mTORC2–AKT induces the direct phosphorylation of IP3R, which induces escape from cell death by stopping the flow of calcium between the ER and the mitochondria. In liver, lung, breast, and colorectal cancers, Mfn2 is able to restore cell death by inhibiting the mTORC2–AKT axis [75]. Bcl-2 exerts calcium-dependent oncogenic activity by inhibiting apoptosis stimuli through direct interaction with IP3R and Bax [76]. During apoptosis, the oncosuppressive protein p53 induces the release of calcium from the reticulum to the mitochondria by increasing the activity of the SERCA pump. Likewise, the PML protein can interact with IP3R3 to induce calcium flux from the ER to the mitochondria, thereby affecting apoptosis and autophagy. PTEN is able to block the proteasomal degradation of IP3R3 induced by FBXL2 (F-box protein) [6,77]. Apoptosis can be induced by extra or intracellular pathways. In the extracellular pathway, an extracellular ligand induces the formation of cell death complexes that activate the caspase cascade. In the intrinsic pathway, mitochondrial permeabilization induces the release of cytochrome c, which allows the formation of the apoptosome and then the activation of caspases [6]. In human leukemia cells, apoptosis can occur using inhibitors of NK-1R, which induces calcium efflux from the reticulum to the mitochondria by the IP3R receptor. Because of a lack of space, NK-1R is the only membrane receptor represented in the figure. Mitochondrial dysfunction is induced by the entry of calcium into the mitochondria via VDAC. ROS production and cellular damage induction are induced by the apoptotic axis ATM–CHK2 [72]. Autophagy is also a mechanism adopted by cancer cells; the increased expression of VGCC reduces autophagy, while a decrease in ORAI1 expression activates autophagy. Additionally, an increase in cytosolic calcium allows the activation of CAMKII, which in turn activates autophagy by regulating the AMPK–mTOR axis [78]. In cancer cells, IDH1 is mutated in the cytoplasm, and IDH2 is mutated in the mitochondria. These enzymes allow the production of oncometabolite 2-HG from α -KG, which induces a modification of the methylation of histones [92].

4. Calcium, Microenvironment, and AML Cells

HSCs reside in close proximity and interact with various cellular components in the BM, such as mesenchymal stem cells, endothelial cells, osteoblasts, osteoclasts, macrophages, and immune cells, including T lymphocytes and natural killers. The term niche is

used when nonhematopoietic cells interact with HSCs to influence their functions such as adhesion, quiescence, differentiation, and proliferation by producing cytokines, chemokines, and other soluble factors [93].

Cancer cell behavior still represents a wide research field with many unknowns, such as, for instance, cancer cell dormancy. This is a stage where the tumor microenvironment sends extrinsic signals to suppress cancer cell growth and proliferation before more favorable conditions appear. As conventional therapies target dividing cells, dormant cancer cells that may disperse early during the disease become resistant and thrive as MRD. These cancer cells can then awaken from their dormant state to trigger disease relapse, even long after the treatment ends [46].

AML is characterized by the presence of LSCs, a subpopulation residing in the BM microenvironment and more specifically within niches, where they interact with other types of cells to resist chemotherapy and survive as MRD. As LSCs are dependent on their microenvironments, it is assumed that a better understanding of these microenvironments and how to target them could help reduce MRD and increase patients' life expectancy [94]. The role of calcium in CSC signaling is still poorly understood, especially in AML, despite its long-known roles in numerous signaling pathways and in the interaction between LSCs and the microenvironment. Here, we describe some of the most important implications of calcium in terms of interactions between LSCs and their microenvironment.

4.1. Role of the Endosteal Niche

Bone is the major calcium stock in the body and a key regulatory organ for calcium homeostasis. Bone marrow (BM) consists of a complex hypoxic microenvironment that includes mainly osteoblasts and osteoclasts. Together, they secrete calcium and synthesize the bone matrix, thus forming an interface between calcified bone and marrow cells: the endosteal niche. It has been established that HSCs live in niches within the BM microenvironment that control HSC dormancy, self-renewal, and mobilization through the production of several factors [95,96].

Among those factors, only a few have yet been linked to calcium in the context of AML cancer cell–microenvironment interaction. CXC chemokine 12 ligand (CXCL12, also known as stromal cell-derived factor (SDF-1)) is highly expressed in bone by both mesenchymal stromal cells and osteoblasts. Leukemic stem cells expressing CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4) detect chemokine gradients, and, by activating CXCR4, CXCL12 generates an increase in intracellular calcium ion levels. Consequently, the rise in intracellular calcium concentration triggers a chemotactic response, facilitating the entrance of LSCs expressing CXCR4 into the bone microenvironment and thus the niche [97–99]. The binding of CXCL12 and CXCR4 activates prosurvival and proliferative signaling pathways, including the PI3K/Akt and MEK/ERK pathways. In contrast, interesting studies have shown that CXCR4 inhibition abolishes the interactions with CXCL12, thus inducing prosurvival signaling. CXCR4 inhibition also prevents LSC anchorage to the BM microenvironment and promotes mobilization of LSCs out of the endosteal niche, thereby rendering them vulnerable to chemotherapy and apoptosis [100–102]. These observations led to clinical studies such as the one on the drug Plexirafor, a CXCR4 antagonist, combined with chemotherapy in patients with relapsed or refractory AML [103]. Another feature of the endosteal niche is that physiological bone remodeling through the release of different molecules is also responsible for the high extracellular Ca^{2+} concentration. It can reach 40 mM and appears to be the major cause of normal HSC localization and adhesion in the endosteal niche [104,105].

Some studies have shown that extracellular Ca^{2+} is able to bind to calcium-sensing receptors (CaRs), G-protein-coupled receptors responsible for the regulation of extracellular calcium homeostasis in HSCs residing in the BM [95]. As LSCs also express CaRs, they are sensitive to calcemia, which is controlled by calciotropic hormones such as the parathyroid hormone (PTH) and vitamin D [106]. The binding of extracellular calcium to

LSC CaRs stimulates the secretion of PTH-related peptide (PTHrP) through L-type voltage-sensitive calcium channel activation and promotes tumor cell proliferation and survival. CaR deficiency reduces the marrow cellularity and disrupts the localization of LSCs, demonstrating the role of CaRs and PTH as key regulators of the endosteal niche and making them potential targets to reduce LSCs [96,107,108]. Although it has been studied in normal HSCs and CML, for now, we can only assume that this mechanism is common to all leukemic stem cell types, including the AML stem cells residing in the BM for which no data currently exist. Moreover, the precise calcium signaling pathway associated with CaR activation remains elusive, as no calcium channel has explicitly been identified in this context.

4.2. Modulation by Retinoic Acid (RA)

As mentioned above, osteoblasts and osteoclasts play a major role in calcium concentration and therefore in AML cancer cells. RA, present in the BM stroma, is also involved in cell growth, proliferation, differentiation, apoptosis, and immune response. RA interacts with its receptors, retinoic acid receptors (RARs) and retinoic acid X receptors (RXRs). They regulate target gene expression in multiple cell types, including AML cells, since RA is abundant in the BM and regulates hematopoietic stem cell renewal [107–109]. It has been acknowledged that the action of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs) is generated by the binding of Ca^{2+} to calmodulin (CaM) and that Ca^{2+} /CaM levels are controlled by the variation of intracellular Ca^{2+} concentration. CaMKs regulate the development and activity of numerous cell types, e.g., cytokine expression in T lymphocytes [110,111].

An interesting study showed a direct interaction between $\text{CaMKII}\gamma$ and RARs mediated through a CaMKII LxxLL signature pattern in myeloid cells. $\text{CaMKII}\gamma$ binds RAR target sites within myeloid gene promoters and phosphorylates RAR to inhibit its transcriptional activity, thus regulating myelopoiesis. Inhibition of CaMKII considerably enhances the granulocytic differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, meaning that RA prevents LSC differentiation through calcium signaling [112]. Another study proposed that RA-treated leukemic cells display an increase in the expression of the adhesion molecules VLA4, LFA1, VCAM-1, and ICAM1, resulting in an important rise in leukemic cell adhesion to the niche [113]. Similarly, ATRA, a vitamin A derivative, has been shown to have a high affinity for RAR and to induce cell differentiation by increasing the expression of the Ca^{2+} signaling pathway effectors PKC, MAPK, and PI3K, which are required for the activation of transduction pathways leading to cell differentiation [114–117]. Moreover, ATRA also seems to enhance the production of $\text{TGF}\beta 2$, which is abundant in the BM and induces cell dormancy through a p38-dependent signaling pathway leading to the activation of the dormancy-associated proteins DEC2/Sharp1 and p27kip1 [107,118].

In summary, these studies show that RA and ATRA regulate LSCs in a calcium-dependent manner, supporting their adhesion to the niche and acquisition of the dormant state, therefore leading to their increased resistance to the immune system and chemotherapy. Even though the Ca^{2+} signaling pathway is still incompletely characterized, these studies have helped develop new chemotherapeutic treatments currently undergoing phase III clinical trials using ATRA to target AML cells [119,120].

4.3. The Vascular Niche

Leukemic stem cells interact not only with the endosteal niche but also with the vascular niche. Indeed, HSC activity seems to be linked to vascular development, and this niche contains a large amount of soluble factors and cellular elements that may contribute to leukemia homeostasis [94,121]. Although the vascular niche is being studied in murine models, there are still many gaps in our knowledge of the human vascular niche. What has been shown until now is that mesenchymal stem cells (MSCs) are essential for the well-being of the HSC niche, as they facilitate stem cell engraftment to the vascular niche. MSCs go to the peripheral blood in higher numbers under hypoxic conditions, suggesting

that several cell types in the BM niche are also sensitive to hypoxia. LSCs, characterized by a low division rate, come from one of the most hypoxic regions, where they are “hidden” from immune cells and avoid exposure to chemotherapeutic drugs, therefore increasing their survival rate [122].

While it has been documented that a hypoxic microenvironment can have prosurvival effects on AML cells [123,124], studies on the link between hypoxia and calcium remain scarce. Indeed, hypoxia activates the translation of HIF-1 α and 2 α through an influx of extracellular calcium, the stimulation of PKC, and the activation of mTOR. HIF-1 α also directly upregulates the expression of TGF β 1, increasing the expression of CXCR4 on blasts and allowing them to adhere to the niche. As hypoxia limits the recruitment of immune cells and allows leukemic cells protection, drugs such as TH-302 have been developed and used in clinical trials to sensitize formerly resistant leukemic cells to cytarabine, thus inducing apoptosis. The use of TH-302 also appears to decrease, among other things, the expression of HIF-1 α [125,126]. In addition, some studies have shown that the inhibition of HIF-2 α in primary AML cells seems to inhibit their proliferation [100,124,127,128]. Furthermore, several interesting studies showed that the endothelium and cells located near endothelial cells in the vascular niche called CXCL12-abundant reticular cells (CARs) secrete CXCL12, allowing HSCs, and thus LSCs, to adhere to the vascular niche via the CXCR4 receptor.

The secretion of adhesion factors by a variety of cell types and via different Ca²⁺-dependent mechanisms in microenvironment niches shows the interconnection between those niches and their importance for AML stem cell proliferation and survival. What remains to be identified are the calcium channels and the associated calcium signaling pathways involved in all the mechanisms described above (Figure 4) [97,129].

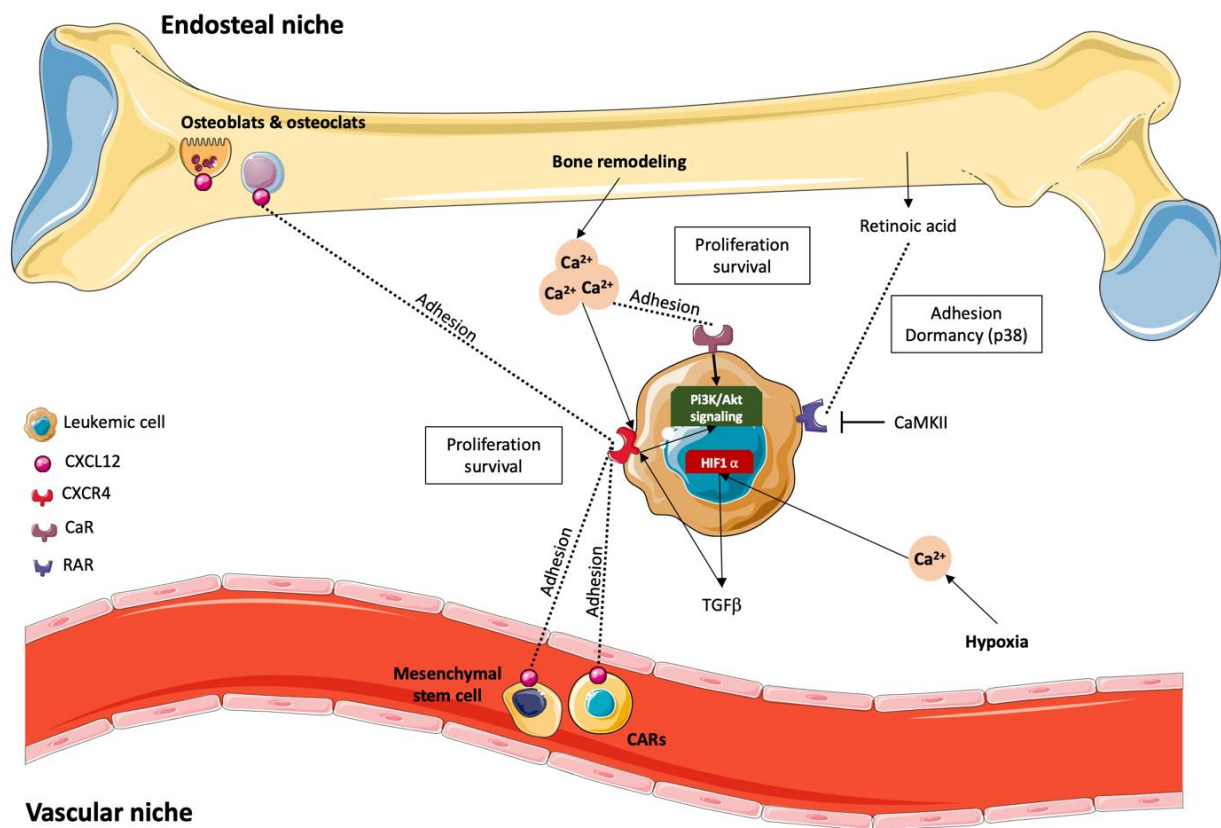


Figure 4. Mechanisms of adhesion to the niche. The binding of CXCL12 expressed by mesenchymal stromal cells, CARs, osteoclasts, and osteoblasts to CXCR4 expressed by leukemic stem cells induces an increase in intracellular calcium ion levels, leading to the entrance of LSCs into the vascular or

endosteal niche, which in turn induces prosurvival and proliferative signaling pathway mobilization. Bone remodeling is responsible for the high extracellular calcium level, which enables the binding of calcium to the CaRs expressed by LSCs, thus helping the cells adhere to the niche. RA present in the BM microenvironment can bind to its RARs expressed on LSCs, inducing the regulation of LSC growth, proliferation, differentiation, apoptosis, and immune response; however, RAR activity can be modulated by CaMKII. The hypoxic environment of the BM seems to have proliferation-inducing and prosurvival effects on AML cells and upregulates CXCR4 expression on blasts, allowing them to adhere to the niche.

4.4. Immune Escape

Finally, the BM microenvironment also includes immune system cells that are able to control cancer growth through the secretion of soluble factors (e.g., cytokines) or by identifying and killing cancer cells through cytotoxic mechanisms. Tumor dormancy and cancer cell escape from the immune response represent the major causes of relapse in AML, although the underlying mechanisms are still poorly understood [130].

The binding of the target cell major histocompatibility complex (MHC) or antigen to the T lymphocyte T cell receptor (TCR) complex induces the release of ER calcium stores. In turn, ER Ca^{2+} store depletion leads to the oligomerization of the calcium-sensing stromal interaction molecule 1 (Stim1) protein. Then, Stim1 oligomers translocate to regions near the plasma membrane, where they directly bind to calcium-release-activated channels (CRACs) via their STIM1 Orai-activating region (SOAR) domains. This interaction leads to the CRACs opening and subsequent capacitative Ca^{2+} entry, inducing the formation of the Ca^{2+} /CaM/calcineurin complex. This calcium influx enables the mobilization of various signaling pathways involving the activation of transcription factors such as NFAT and AP-1 and leads to T cell activation (proliferation, cytokine secretion) or exhaustion. T lymphocyte activation or exhaustion depends on which transcription factors are activated or paired together. For instance, the Ca^{2+} /CaM/calcineurin complex can dephosphorylate NFAT, which, within minutes, translocates to the nucleus, where it binds to regulatory sequences and modulates the expression of several genes, including PD-1 and the cytokine IFN γ [127,128,131,132]. An interesting study showed that when activated alone or paired with AP-1, the transcription factor NFAT allows the activation of T lymphocytes. However, another study showed that when paired with the transcription factors BATF or IRF4, NFAT leads to an exhausted phenotype, where T lymphocytes lose their ability to fight cancer cells, synthesize cytokines, and proliferate [133,134].

The mechanisms by which NFAT can lead to either an activated or exhausted phenotype in T lymphocytes are still not entirely known. Nonetheless, interesting studies have helped to establish the link between NFAT and calcium signaling in the expression of PD-1, a molecule expressed on the T lymphocyte surface, and have shown that NFAT could also be associated with PD-L1 expression in targeted cancer cells [135,136].

When a link between PD-1 and its ligand PD-L1, expressed by regulatory cells such as dendritic cells, is established, PD-1/PD-L1 signaling contributes to the modulation of the effector functions of cytotoxic CD8 T cells. Cancer cells can express regulatory ligands such as PD-L1, CD80/CD86, or Galectin-9 to provide a negative regulatory signal to T lymphocytes expressing their respective receptors PD-1, CTLA-4, and TIM-3, resulting in T cell exhaustion [137–139].

PD-L1 is expressed in approximately 30% to 60% of leukemic blasts, depending on the patient. An increase in PD-L1 expression in AML patients after MRD has already been shown; it has also been shown that PD-L1 expression is the reason why LSC can resist CD8 T lymphocyte attack after chemotherapy treatment [137,140]. Other important studies also linked the induction of PD-L1 expression by the cytokine IFN- γ secreted by T lymphocytes with AML blast calcium signaling. Indeed, the IFN receptor expressed by tumor cells can activate the Ca^{2+} /calmodulin/calcineurin pathway through the production of IP3, leading to the activation of NFAT, which can in turn activate the PD-L1 gene. As a result, AML cells expressing PD-L1 can inhibit T cells presenting the surface molecule PD-

1 and prevent them from proliferating and secreting cytotoxic cytokines [141,142]. Additionally, calcium influx activates NFAT, which in turn activates the $\text{IFN}\gamma$ gene promoter, therefore inducing $\text{IFN}\gamma$ production. CD8 T lymphocytes represent an early source of NFAT-dependent $\text{IFN}\gamma$ production during the adaptive response [143]. Studies have shown that in AML, anthracyclines are likely to activate immunogenic cell death (ICD) through cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and the secretion of $\text{IFN}\gamma$. As said before, this secretion of $\text{IFN}\gamma$ allows T cell proliferation as well as an increased expression of PD-L1 on AML cells, and for now, a possible approach to preventing this adaptive resistance and diminishing the risk of relapse could be to associate immune checkpoint inhibition with chemotherapy [144,145].

Thus, the NFAT/ Ca^{2+} /CDK4 pathway and, more generally, calcium signaling have an impact on the interaction between immune cells and AML cancer cells, especially through the modulation of PD-1/PD-L1 signaling, consequently regulating cytotoxic lysis and CSC survival (Figure 5) [146,147]. Even though a link between calcium, NFAT, and AML-cell-related T lymphocyte exhaustion has been discovered, further studies are required to understand why cancer cells express PD-L1 at different levels and to better characterize the other T lymphocyte inhibitory pathways mentioned above, such as the CTLA-4/CD80/CD86 and TIM-3/Galectin-9 pathways, whose actions in antitumor activity could also be enhanced by finding an upstream target to inhibit [148].

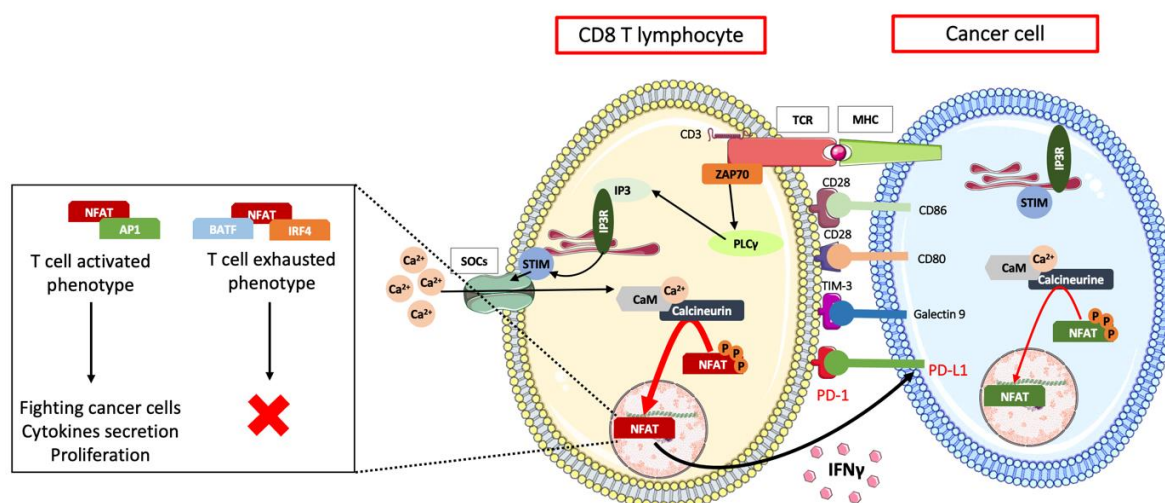


Figure 5. Cancer cell immune escape. The binding of the target cell's MHC or antigen to the T lymphocyte TCR complex induces the release of ER calcium stores, leading to Stim1 oligomerization and allowing calcium entry through plasma membrane CRAC channels. Capacitive Ca^{2+} entry induces the formation of the Ca^{2+} -CaM-calcineurin complex, which in turn dephosphorylates the transcription factor NFAT, which, within minutes, translocates to the nucleus. When activated alone or with the other transcription factor AP1, NFAT allows T lymphocyte activation, and when paired with BATF or IRF4, NFAT can induce an exhausted phenotype. When bound to regulatory sequences, NFAT can modulate PD-1 expression and $\text{IFN}\gamma$ cytokine secretion. When the link between PD-1 expressed by T lymphocytes and its ligand PD-L1 expressed by cancer cells is established, PD-1/PD-L1 signaling contributes to the modulation of effector functions of cytotoxic CD8 T cells. Cancer cells can also express other regulatory ligands, such as CD80/CD86 or Galectin-9, to provide a negative regulatory signal to T lymphocytes expressing their respective receptors CTLA-4 and TIM-3, resulting in T cell exhaustion. $\text{IFN}\gamma$ secreted by T lymphocytes can bind to its receptor expressed by tumor cells and can thus activate the Ca^{2+} /CaM/calcineurin pathway through the production of IP3, leading to the activation of NFAT, which can in turn activate the PD-L1 gene, inducing the inhibition of T cells presenting the surface molecule PD-1 and therefore preventing them from proliferating and secreting cytotoxic cytokines. Additionally, calcium influx activates NFAT1, which in turn activates the $\text{IFN}\gamma$ gene promoter, inducing $\text{IFN}\gamma$ production and thus regulating cytotoxic lysis and CSC survival.

In summary, the BM microenvironment is a regulator of AML cells that influences their functions and changes the course of the disease. Study of the direct interaction between the microenvironment and AML cells has provided growing evidence that i) calcium signals from the BM microenvironment can release or activate AML cells and ii) calcium signals from leukemic cells can remodel existing niches to maintain their proliferation and resistance. These findings and the enhanced sensitivity to cytotoxic chemotherapy with related targeting agents suggest that such signals may represent candidate targets for novel therapeutic strategies [121,149–152].

5. Calcium Signaling in AML Treatment: A New Hope?

Despite remarkable research progress, AML remains a hard-to-cure disease. Indeed, in a recent publication summarizing 13 years of clinical trials, Oliva et al. showed that AML treatments still result in relapse for a substantial proportion of patients. Specifically, 46.8% of patients treated with induction chemotherapy exhibited relapse, and the rate decreased to 29.4% when patients were treated by stem cell transplants. While calcium signaling is a well-known contributor to the hallmarks of cancer [153], few clinical trials have focused on pertinent calcium targets. Indeed, most studies have described the impact of drugs already used for other diseases, e.g., VGCC inhibitors for heart-related diseases or hypertension, on AML outcome. This is perfectly illustrated by Chae et al., who presented a 12-year retrospective study on the effect of calcium channel inhibitors [154], where the only reported effect is worse overall survival for patients treated with amlodipine or diltiazem (L-type calcium channel inhibitors). These observations show that dedicated studies are still required to identify the specific calcium channels and associated signaling pathways involved in AML prior to the development of any efficient treatment specifically targeting these pathways.

5.1. Chemotherapies, Calcium, and Mitochondria

In the last few years, some studies have started providing this initial background by focusing on the impact of calcium homeostasis on AML progression. Such an example is provided by Chen et al. [25], who showed that the calcium-permeable TRPM2 channel is overexpressed in AML patient cells and in AML cell lines compared to normal precursors. In U937 cells with TRPM2 knockout (KO), they observed a decrease in proliferation associated with a significant decrease in mitochondrial function, namely a decrease in the oxygen consumption rates and ATP production and an increase in reactive oxygen species (ROS) levels. These effects were accompanied by decreases in mitochondrial membrane potential and mitochondrial calcium uptake, thus indicating a profound modification of calcium homeostasis depending on the TRPM2 expression level. Interestingly, the authors observed that TRPM2 KO cells were more sensitive to the chemotherapeutic agent doxorubicin, which induced a strong increase in ROS production. In this model, this effect of TRPM2 KO was linked to the impairment of autophagy through the modulation of the expression of CREB and ATF4 transcription factors. Overall, this study shows that TRPM2 could be an interesting target for AML treatment. However, the main issue is the current absence of specific inhibitors for TRPM2, although a recent publication proposed the A23 compound as a promising new lead for the development of future clinically relevant TRPM2 inhibitors [155].

Several studies have shown that even without specifically targeting TRPM2, mitochondrial activity is altered by potential therapeutic drugs used for the treatment of AML patients. Such an example was recently provided by Wang et al. [156], who developed a new drug, AKI604, that specifically inhibits Aurora kinase A (AURKA). Aurora kinases are known to be overexpressed in several cancers, including AML, where they participate in mitosis and cytokinesis. Aurora kinase inhibitors were thus developed, and one of them (AZD1152) was used in clinical studies as a potential treatment for AML patients after it was shown to decrease AML cell viability and proliferation and to induce apoptosis [157,158]. In their study, Wang et al. showed that AKI604 can revert the effect of signal

transducer and activator of transcription 5 (STAT5) on leukemia cells, namely increased proliferation. This result is particularly relevant since STAT5 is known to be aberrantly activated in the blasts of AML patients [159], to lead to decreased sensitivity to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) [160], and to control AURKA expression [161]. AKI604 treatment was associated with mitochondrial activity impairment, disruption of mitochondrial membrane potential, and an increase in ROS production. These effects were also associated with an increase in cytoplasmic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$), but the study unfortunately did not provide further clues as to the origin and consequences of this modification of calcium homeostasis. However, treatment with AKI604 decreased tumor growth in a xenograft model, thus proving its potential as a therapeutic drug. Another recent study proposed a combination of three drugs to improve AML patient survival, one of which (pimozide) is known as an inhibitor of voltage-gated calcium channels. While it was shown that the combination of the BH3 mimetic ABT-263, mTOR inhibitor AZD 8055, and pimozide was efficient in inducing cell death in resistant AML cell lines and that this effect involved ROS production and the disruption of mitochondrial activity, no evidence was provided regarding the precise impact of calcium homeostasis on this synergistic effect [162].

5.2. Modulation of ER Calcium Stores

As presented in this review, several reports have shown a link between potential chemotherapeutic drugs and mitochondrial activity. Drugs can, however, target other key players of the calcium signaling pathway, including inositol 1,4,5 trisphosphate receptors (IP3Rs), whose activation will result in the release of calcium by the ER, an increase in $[Ca^{2+}]_c$, and the stimulation of numerous calcium signaling pathways. One of those drugs is wogonoside, a flavonoid of natural origin, which was shown to have antiproliferative effects on AML cells via the upregulation of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) [163]. This initial study showed that wogonoside promotes PLSCR1 translocation into the nucleus, where it binds the promoter region of IP3R1 and increases its expression. In a subsequent work, this team tried to better understand the role of calcium homeostasis in the observed effects of wogonoside. Using primary AML cells, they identified several targets modulated by wogonoside and related to its effects on cell proliferation and differentiation; specifically, they found that cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21Cip1) and 1B (p27Kip1) were upregulated and c-Myc was downregulated. Moreover, they closely monitored the impact of wogonoside on the cytosolic calcium concentration and showed that the drug increased $[Ca^{2+}]_c$ over time, reaching a peak at 72 h of treatment. Using 2-APB, a broad-spectrum calcium channel inhibitor also targeting IP3Rs, in combination with extracellular calcium removal, they concluded that this increase in $[Ca^{2+}]_c$ leading to AML cell differentiation was mostly due to calcium release from the ER via IP3R1 and not to calcium influx through the plasma membrane [37]. Interestingly, IP3R2 was also reported by another team to be overexpressed in cytogenetically normal AML and to represent a predictive biomarker associated with a worse prognosis and decreased overall survival [27]. These apparently contradictory observations illustrate the need to further investigate the roles of all IP3R isoforms in AML and of the associated calcium signaling pathways to better understand disease progression and the resistance of this cancer to current chemotherapies.

5.3. Chemotherapies Impacting Calcium Influx

Some drugs proposed for the treatment of AML were described as being able to increase $[Ca^{2+}]_c$ via their direct effect on plasma membrane receptors or calcium channels. Such an example is 4-aminopyridine (4-AP), a commonly used voltage-gated potassium channel inhibitor. The application of 4-AP to AML cell lines was shown to inhibit these channels and to induce apoptosis. However, upon further investigation, Wang et al. demonstrated that the proapoptotic effect of 4-AP was mostly mediated by the activation of the ATP-gated P₂X₇ receptor. Indeed, 4-AP application induces calcium entry through

this ionotropic receptor located in the plasma membrane, leading to a $[Ca^{2+}]_c$ increase and to the induction of apoptosis, an effect completely abrogated in AML cells silenced for the P_2X_7 receptor [164]. A similar work led to the identification of nutraceutical glucopsychosine, a lipid derived from bovine milk, as a potential antileukemia compound. Glucopsychosine was shown to selectively induce apoptosis in a caspase-independent manner in AML cells, but not in normal hematopoietic cells, as a result of calpain activation. Calpain was activated here by an increase in $[Ca^{2+}]_c$ resulting from calcium entry through unidentified plasma membrane calcium channels [165]. Another study showed that the farnesyl-transferase inhibitor tipifarnib can also induce apoptosis when applied to AML cells by increasing $[Ca^{2+}]_c$ without directly disrupting ER- or mitochondria-associated calcium signaling. This increase in $[Ca^{2+}]_c$ was directly linked to the activation of specific plasma membrane calcium channels, namely SOCs, which represent the main calcium entry pathway in non-excitable cells [166]. The pharmacological tools and mRNA screenings used in this study led the authors to propose Orai3 as the main channel involved in the effects of tipifarnib. However, a later study proposed Orai2 and Orai1 as the main components of SOC channels in AML cells, again illustrating the need to better characterize the main calcium entry pathways in this model [167].

In some instances, calcium modulation can result from the ectopic expression of proteins in AML. Such an example is the expression of the olfactory receptor OR51B5 in AML cells, resulting in an increase in $[Ca^{2+}]_c$ and an inhibition of cell proliferation potentially involving T-type and L-type calcium channels [168]. If confirmed, these results could suggest new targets for innovative therapies targeting either this receptor or the associated signaling pathways.

5.4. Future Directions

One of the main signaling pathways activated by extracellular calcium entry or increased intracellular calcium concentrations is the calmodulin/calcineurin/NFAT pathway (for review, see [169]). As shown above, many drugs proposed to treat AML patients induce major variations in $[Ca^{2+}]_c$, which in turn should dramatically impact the calmodulin/calcineurin/NFAT pathway (Table 2). A recent study by He et al. showed that chemotherapeutic drugs can also directly impact this signaling pathway. Indeed, lenalidomide, a drug used to treat multiple myeloma but with poor reported efficacy in AML, exhibits increased cytotoxic activity in AML when combined with cyclosporine, a well-known inhibitor of calcineurin [170]. This result could therefore suggest that a combination of treatments including modulators of the calmodulin/calcineurin/NFAT pathway could represent a potential way to improve the efficacy of the chemotherapies currently used to treat AML patients. While appealing, this hypothesis remains to be confirmed with the other drugs already known to modulate AML calcium signaling.

Table 2. Summary of the main molecules with chemotherapeutic potential targeting the calcium signaling pathway in AML.

Molecules	Targets	Clinical Use	Clinical Impact	Mechanism	Ref
Amlodipine/ Diltiazem	L-type calcium channels	Yes (heart disease, hypertension)	Decreased AML patient survival	L-type calcium channels inhibitors	[154]
A23	TRPM2 channel	No	-	TRPM2 inhibitor makes AML cells more sensitive to chemotherapies in vitro (increases ROS production)	[25]
AKI604	Aurora kinase A (AURKA)	No	-	AURKA inhibitor impairs mitochondrial activity, increases ROS production and cytoplasmic calcium concentration, and decreases tumor growth in xenograft models	[156]

Pimozide	Voltage-gated calcium channels	No	-	In combination with ABT-263 and AZD 8055, pimozide impairs mitochondrial functions and induce resistant AML cell lines apoptosis Inhibits proliferation through PLSCR1 activation, IP3R1 upregulation, and the resulting increase in cytoplasmic calcium concentration leading to AML cell differentiation	[162]
Wogonoside	IP3R1	No	-	Inhibition of voltage-gated potassium channels by 4-AP leads to plasma membrane depolarization, calcium entry into AML cells via ionotropic P ₂ X ₇ receptor, and induction of apoptosis Induces apoptosis in AML cells, but not in normal hematopoietic cells, via a calcium entry through unknown calcium channels	[37,163]
4-AP	Voltage-gated potassium channel	No	-	Tipifarnib inhibits farnesyltransferase and increases intracellular calcium concentration through SOC channels activation, leading to AML cell apoptosis	[164]
Glucopsychosine	Unknown	No	-		[165]
Tipifarnib	Farnesyltransferase	No	-		[166]

Another possible direction for future research is the use of drugs targeting calcium channels expressed by both AML and the tumor microenvironment cells. Indeed, as presented earlier, cells from the different niches directly modulate AML cells' fate and can promote its progression toward more aggressive stages and survival of chemotherapeutic treatments. In a recently published work, Borella et al. have shown that lercanidipine, a CaV1.2 calcium channel inhibitor, can decrease both AML cell and mesenchymal stromal cell proliferation. Interestingly, they also present evidence that the combination of this dual targeting agent with the chemotherapeutic agent Ara-C significantly decreases tumor growth in a preclinical model, as well as that this effect is far more robust than when each molecule is applied separately [171].

Altogether, these studies highlight the critical role of calcium signaling in AML and the tremendous potential of a better understanding of these pathways when designing the next generation of therapeutic drugs targeting not only AML cells but also their microenvironment.

Author Contributions: Writing—Original draft preparation, C.L., M.-O.L., T.I., Y.T., and L.L.; Writing—Review and editing, B.Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Inserm, the CNRS, the Contrat de Plan Etat-Région (CPER) 2015-2020, the Ligue contre le cancer (Septentrion), the Ligue nationale contre le cancer, the Fondation ARC, and the Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL). C.L. and M.-O.L. are financed by Lille Hospital and by Hauts de France Region.

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

References

1. Medinger, M.; Passweg, J.R. Acute Myeloid Leukaemia Genomics. *Br. J. Haematol.* **2017**, *179*, 530–542, doi:10.1111/bjh.14823.
2. Pollyea, D.A.; Bixby, D.; Perl, A.; Bhatt, V.R.; Altman, J.K.; Appelbaum, F.R.; de Lima, M.; Fathi, A.T.; Foran, J.M.; Gojo, I.; et al. NCCN Guidelines Insights: Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2021**, *19*, 16–27, doi:10.6004/jnccn.2021.0002.

3. Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Roderick, H.L. Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 517–529, doi:10.1038/nrm1155.
4. Clapham, D.E. Calcium Signaling. *Cell* **2007**, *131*, 1047–1058, doi:10.1016/j.cell.2007.11.028.
5. Oliveira, A.G.; Guimarães, E.S.; Andrade, L.M.; Menezes, G.B.; Fatima Leite, M. Decoding Calcium Signaling across the Nucleus. *Physiology* **2014**, *29*, 361–368, doi:10.1152/physiol.00056.2013.
6. Patergnani, S.; Danese, A.; Bouhamida, E.; Aguiari, G.; Previati, M.; Pinton, P.; Giorgi, C. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21218323.
7. Cabanas, H.; Harnois, T.; Magaud, C.; Cousin, L.; Constantin, B.; Bourmeyster, N.; Déliot, N. Deregulation of Calcium Homeostasis in Bcr-Abl-Dependent Chronic Myeloid Leukemia. *Oncotarget* **2018**, *9*, 26309–26327, doi:10.18632/oncotarget.25241.
8. Luchsinger, L.L.; Strikoudis, A.; Danzl, N.M.; Bush, E.C.; Finlayson, M.O.; Satwani, P.; Sykes, M.; Yazawa, M.; Snoeck, H.-W. Harnessing Hematopoietic Stem Cell Low Intracellular Calcium Improves Their Maintenance In Vitro. *Cell Stem Cell* **2019**, *25*, 225–240, doi:10.1016/j.stem.2019.05.002.
9. Fukushima, T.; Tanaka, Y.; Hamey, F.K.; Chang, C.-H.; Oki, T.; Asada, S.; Hayashi, Y.; Fujino, T.; Yonezawa, T.; Takeda, R.; et al. Discrimination of Dormant and Active Hematopoietic Stem Cells by G(0) Marker Reveals Dormancy Regulation by Cytoplasmic Calcium. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 4144–4158.e7, doi:10.1016/j.celrep.2019.11.061.
10. Zhao, M.; Li, L. Osteoblast Ablation Burns out Functional Stem Cells. *Blood* **2015**, *125*, 2590–2591, doi:10.1182/blood-2015-03-633651.
11. Bowers, M.; Zhang, B.; Ho, Y.; Agarwal, P.; Chen, C.-C.; Bhatia, R. Osteoblast Ablation Reduces Normal Long-Term Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal but Accelerates Leukemia Development. *Blood* **2015**, *125*, 2678–2688, doi:10.1182/blood-2014-06-582924.
12. Becchetti, A. Ion Channels and Transporters in Cancer. 1. Ion Channels and Cell Proliferation in Cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *301*, C255–265, doi:10.1152/ajpcell.00047.2011.
13. Déliot, N.; Constantin, B. Plasma Membrane Calcium Channels in Cancer: Alterations and Consequences for Cell Proliferation and Migration. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 2512–2522, doi:10.1016/j.bbamem.2015.06.009.
14. Chafouleas, J.G.; Lagacé, L.; Bolton, W.E.; Boyd, A.E. 3rd; Means, A.R. Changes in Calmodulin and Its mRNA Accompany Reentry of Quiescent (G0) Cells into the Cell Cycle. *Cell* **1984**, *36*, 73–81, doi:10.1016/0092-8674(84)90075-8.
15. Rasmussen, C.D.; Means, A.R. Calmodulin, Cell Growth and Gene Expression. *Trends Neurosci.* **1989**, *12*, 433–438, doi:10.1016/0166-2236(89)90092-1.
16. Takuwa, N.; Zhou, W.; Kumada, M.; Takuwa, Y. Ca(2+)-Dependent Stimulation of Retinoblastoma Gene Product Phosphorylation and P34cdc2 Kinase Activation in Serum-Stimulated Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 138–145.
17. Yen, A.; Freeman, L.; Powers, V.; Van Sant, R.; Fishbaugh, J. Cell Cycle Dependence of Calmodulin Levels during HL-60 Proliferation and Myeloid Differentiation. No Changes during Pre-Commitment. *Exp. Cell Res.* **1986**, *165*, 139–151, doi:10.1016/0014-4827(86)90539-2.
18. Kahl, C.R.; Means, A.R. Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin-Dependent Pathways. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 719–736, doi:10.1210/er.2003-0008.
19. Monaco, S.; Rusciano, M.R.; Maione, A.S.; Soprano, M.; Gomathinayagam, R.; Todd, L.R.; Campiglia, P.; Salzano, S.; Pastore, L.; Leggiero, E.; et al. A Novel Crosstalk between Calcium/Calmodulin Kinases II and IV Regulates Cell Proliferation in Myeloid Leukemia Cells. *Cell Signal.* **2015**, *27*, 204–214, doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.007.
20. Kang, X.; Cui, C.; Wang, C.; Wu, G.; Chen, H.; Lu, Z.; Chen, X.; Wang, L.; Huang, J.; Geng, H.; et al. CAMKs Support Development of Acute Myeloid Leukemia. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 30, doi:10.1186/s13045-018-0574-8.
21. Tomono, M.; Toyoshima, K.; Ito, M.; Amano, H.; Kiss, Z. Inhibitors of Calcineurin Block Expression of Cyclins A and E Induced by Fibroblast Growth Factor in Swiss 3T3 Fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *353*, 374–378, doi:10.1006/abbi.1998.0667.
22. Buchholz, M.; Schatz, A.; Wagner, M.; Michl, P.; Linhart, T.; Adler, G.; Gress, T.M.; Ellenrieder, V. Overexpression of C-Myc in Pancreatic Cancer Caused by Ectopic Activation of NFATc1 and the Ca2+/Calcineurin Signaling Pathway. *EMBO J.* **2006**, *25*, 3714–3724, doi:10.1038/sj.emboj.7601246.
23. Prevarskaya, N.; Skryma, R.; Shuba, Y. Ion Channels and the Hallmarks of Cancer. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 107–121, doi:10.1016/j.molmed.2010.01.005.
24. Padma, S.; Subramanyam, C. Clinical Significance of Serum Calcineurin in Acute Leukemia. *Clin. Chim. Acta* **2002**, *321*, 17–21, doi:10.1016/s0009-8981(02)00094-3.
25. Chen, S.-J.; Bao, L.; Keefer, K.; Shanmughapriya, S.; Chen, L.; Lee, J.; Wang, J.; Zhang, X.-Q.; Hirschler-Laszkiewicz, I.; Merali, S.; et al. Transient Receptor Potential Ion Channel TRPM2 Promotes AML Proliferation and Survival through Modulation of Mitochondrial Function, ROS, and Autophagy. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 247, doi:10.1038/s41419-020-2454-8.
26. Song, S.; Babicheva, A.; Zhao, T.; Ayon, R.J.; Rodriguez, M.; Rahimi, S.; Balistrieri, F.; Harrington, A.; Shyy, J.Y.-J.; Thistlethwaite, P.A.; et al. Notch Enhances Ca(2+) Entry by Activating Calcium-Sensing Receptors and Inhibiting Voltage-Gated K(+) Channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2020**, *318*, C954–C968, doi:10.1152/ajpcell.00487.2019.
27. Shi, J.; Fu, L.; Wang, W. High Expression of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor, Type 2 (ITPR2) as a Novel Biomarker for Worse Prognosis in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *Oncotarget* **2015**, *6*, 5299–5309, doi:10.18632/oncotarget.3024.

28. Yamamura, H.; Yamamura, A.; Ko, E.A.; Pohl, N.M.; Smith, K.A.; Zeifman, A.; Powell, F.L.; Thistlethwaite, P.A.; Yuan, J.X.-J. Activation of Notch Signaling by Short-Term Treatment with Jagged-1 Enhances Store-Operated Ca(2+) Entry in Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2014**, *306*, C871–878, doi:10.1152/ajpcell.00221.2013.
29. Tohda, S.; Sakano, S.; Ohsawa, M.; Murakami, N.; Nara, N. A Novel Cell Line Derived from de Novo Acute Myeloblastic Leukaemia with Trilineage Myelodysplasia Which Proliferates in Response to a Notch Ligand, Delta-1 Protein. *Br. J. Haematol.* **2002**, *117*, 373–378, doi:10.1046/j.1365-2141.2002.03446.x.
30. Li, G.-H.; Fan, Y.-Z.; Liu, X.-W.; Zhang, B.-F.; Yin, D.-D.; He, F.; Huang, S.-Y.; Kang, Z.-J.; Xu, H.; Liu, Q.; et al. Notch Signaling Maintains Proliferation and Survival of the HL60 Human Promyelocytic Leukemia Cell Line and Promotes the Phosphorylation of the Rb Protein. *Mol. Cell Biochem.* **2010**, *340*, 7–14, doi:10.1007/s11010-010-0394-9.
31. Kannan, S.; Sutphin, R.M.; Hall, M.G.; Golfman, L.S.; Fang, W.; Nolo, R.M.; Akers, L.J.; Hammit, R.A.; McMurray, J.S.; Kornblau, S.M.; et al. Notch Activation Inhibits AML Growth and Survival: A Potential Therapeutic Approach. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 321–337, doi:10.1084/jem.20121527.
32. Lobry, C.; Ntziachristos, P.; Ndiaye-Lobry, D.; Oh, P.; Cimmino, L.; Zhu, N.; Araldi, E.; Hu, W.; Freund, J.; Abdel-Wahab, O.; et al. Notch Pathway Activation Targets AML-Initiating Cell Homeostasis and Differentiation. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 301–319, doi:10.1084/jem.20121484.
33. Tohda, S.; Kogoshi, H.; Murakami, N.; Sakano, S.; Nara, N. Diverse Effects of the Notch Ligands Jagged1 and Delta1 on the Growth and Differentiation of Primary Acute Myeloblastic Leukemia Cells. *Exp. Hematol.* **2005**, *33*, 558–563, doi:10.1016/j.exphem.2005.01.010.
34. Launay, S.; Gianni, M.; Kovács, T.; Bredoux, R.; Bruel, A.; Gélébart, P.; Zassadowski, F.; Chomienne, C.; Enouf, J.; Papp, B. Lineage-Specific Modulation of Calcium Pump Expression during Myeloid Differentiation. *Blood* **1999**, *93*, 4395–4405.
35. Laouedj, M.; Tardif, M.R.; Gil, L.; Raquil, M.-A.; Lachhab, A.; Pelletier, M.; Tessier, P.A.; Barabé, F. S100A9 Induces Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells through TLR4. *Blood* **2017**, *129*, 1980–1990, doi:10.1182/blood-2016-09-738005.
36. Chapekar, M.S.; Hartman, K.D.; Knode, M.C.; Glazer, R.I. Synergistic Effect of Retinoic Acid and Calcium Ionophore A23187 on Differentiation, c-Myc Expression, and Membrane Tyrosine Kinase Activity in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL-60. *Mol. Pharmacol.* **1987**, *31*, 140–145.
37. Li, H.; Xu, J.; Zhou, Y.; Liu, X.; Shen, L.E.; Zhu, Y.U.; Li, Z.; Wang, X.; Guo, Q.; Hui, H. PLSCR1/IP3R1/Ca(2+) Axis Contributes to Differentiation of Primary AML Cells Induced by Wogonoside. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2768, doi:10.1038/cddis.2017.175.
38. O'Reilly, D.; Buchanan, P. Calcium Channels and Cancer Stem Cells. *Cell Calcium* **2019**, *81*, 21–28, doi:10.1016/j.ceca.2019.05.006.
39. Snoeck, H.-W. Calcium Regulation of Stem Cells. *EMBO Rep.* **2020**, *21*, e50028, doi:10.15252/embr.202050028.
40. Horsley, V.; Aliprantis, A.O.; Polak, L.; Glimcher, L.H.; Fuchs, E. NFATc1 Balances Quiescence and Proliferation of Skin Stem Cells. *Cell* **2008**, *132*, doi:10.1016/j.cell.2007.11.047.
41. Aulestia, F.J.; Néant, I.; Dong, J.; Haiech, J.; Kilhoffer, M.-C.; Moreau, M.; Leclerc, C. Quiescence Status of Glioblastoma Stem-like Cells Involves Remodelling of Ca(2+) Signalling and Mitochondrial Shape. *Sci Rep.* **2018**, *8*, 9731, doi:10.1038/s41598-018-28157-8.
42. Bonora, M.; Kahsay, A.; Pinton, P. Mitochondrial Calcium Homeostasis in Hematopoietic Stem Cell: Molecular Regulation of Quiescence, Function, and Differentiation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2021**, *362*, 111–140, doi:10.1016/bs.ircmb.2021.05.003.
43. Umemoto, T.; Hashimoto, M.; Matsumura, T.; Nakamura-Ishizu, A.; Suda, T. Ca(2+)-Mitochondria Axis Drives Cell Division in Hematopoietic Stem Cells. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 2097–2113, doi:10.1084/jem.20180421.
44. Zhang, X.; Su, J.; Jeong, M.; Ko, M.; Huang, Y.; Park, H.J.; Guzman, A.; Lei, Y.; Huang, Y.-H.; Rao, A.; et al. DNMT3A and TET2 Compete and Cooperate to Repress Lineage-Specific Transcription Factors in Hematopoietic Stem Cells. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 1014–1023, doi:10.1038/ng.3610.
45. Ng, S.W.K.; 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, doi:10.1038/nature20598.
46. Bachas, C.; Schuurhuis, G.J.; Assaraf, Y.G.; Kwidama, Z.J.; Kelder, A.; Wouters, F.; Snel, A.N.; Kaspers, G.J.L.; Cloos, J. The Role of Minor Subpopulations within the Leukemic Blast Compartment of AML Patients at Initial Diagnosis in the Development of Relapse. *Leukemia* **2012**, *26*, 1313–1320, doi:10.1038/leu.2011.383.
47. Li, S.; Garrett-Bakelman, F.E.; Chung, S.S.; Sanders, M.A.; Hricik, T.; Rapaport, F.; Patel, J.; Dillon, R.; Vijay, P.; Brown, A.L.; et al. Distinct Evolution and Dynamics of Epigenetic and Genetic Heterogeneity in Acute Myeloid Leukemia. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 792–799, doi:10.1038/nm.4125.
48. Fric, J.; Lim, C.X.; Mertes, A.; Lee, B.T.; Vigano, E.; Chen, J.; Zolezzi, F.; Poidinger, M.; Larbi, A.; Strobl, H.; et al. Calcium and Calcineurin-Nfat Signaling Regulate Granulocyte-Monocyte Progenitor Cell Cycle Via Flt3-L. *Stem Cells* **2014**, doi:10.1002/stem.1813.
49. Metzelder, S.K.; Michel, C.; von Bonin, M.; Rehberger, M.; Hessmann, E.; Inselmann, S.; Solovey, M.; Wang, Y.; Sohlbach, K.; Brendel, C.; et al. NFATc1 as a Therapeutic Target in FLT3-ITD-Positive AML. *Leukemia* **2015**, *29*, 1470–1477, doi:10.1038/leu.2015.95.
50. Farge, T.; Saland, E.; de Toni, F.; Aroua, N.; Hosseini, M.; Perry, R.; Bosc, C.; Sugita, M.; Stuani, L.; Fraisse, M.; et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 716–735, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0441.

51. Samudio, I.; Harmancey, R.; Fiegl, M.; Kantarjian, H.; Konopleva, M.; Korchin, B.; Kaluarachchi, K.; Bornmann, W.; Duvvuri, S.; Taegtmeier, H.; et al. Pharmacologic Inhibition of Fatty Acid Oxidation Sensitizes Human Leukemia Cells to Apoptosis Induction. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 142–156, doi:10.1172/JCI38942.
52. Gherardi, G.; Monticelli, H.; Rizzuto, R.; Mammucari, C. The Mitochondrial Ca(2+) Uptake and the Fine-Tuning of Aerobic Metabolism. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 554904, doi:10.3389/fphys.2020.554904.
53. Baldrige, M.T.; King, K.Y.; Boles, N.C.; Weksberg, D.C.; Goodell, M.A. Quiescent Haematopoietic Stem Cells Are Activated by IFN-Gamma in Response to Chronic Infection. *Nature* **2010**, *465*, 793–797, doi:10.1038/nature09135.
54. Lombardi, A.A.; Gibb, A.A.; Arif, E.; Kolmetzky, D.W.; Tomar, D.; Luongo, T.S.; Jadiya, P.; Murray, E.K.; Lorkiewicz, P.K.; Hajnóczky, G.; et al. Mitochondrial Calcium Exchange Links Metabolism with the Epigenome to Control Cellular Differentiation. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4509, doi:10.1038/s41467-019-12103-x.
55. Chen, J.; Kao, Y.-R.; Sun, D.; Todorova, T.I.; Reynolds, D.; Narayanagari, S.-R.; Montagna, C.; Will, B.; Verma, A.; Steidl, U. Myelodysplastic Syndrome Progression to Acute Myeloid Leukemia at the Stem Cell Level. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 103–110, doi:10.1038/s41591-018-0267-4.
56. 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, doi:10.1073/pnas.1324297111.
57. Koefler, H.P.; Leong, G. Preleukemia: One Name, Many Meanings. *Leukemia* **2017**, *31*, 534–542, doi:10.1038/leu.2016.364.
58. Saeed, B.R.; Manta, L.; Raffel, S.; Pyl, P.T.; Buss, E.C.; Wang, W.; Eckstein, V.; Jauch, A.; Trumpp, A.; Huber, W.; et al. Analysis of Nonleukemic Cellular Subcompartments Reconstructs Clonal Evolution of Acute Myeloid Leukemia and Identifies Therapy-Resistant Preleukemic Clones. *Int. J. Cancer* **2021**, *148*, 2825–2838, doi:10.1002/ijc.33461.
59. 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, doi:10.1038/nature13038.
60. Bencomo-Alvarez, A.E.; Rubio, A.J.; Gonzalez, M.A.; Eiring, A.M. Energy Metabolism and Drug Response in Myeloid Leukaemic Stem Cells. *Br. J. Haematol.* **2019**, *186*, 524–537, doi:10.1111/bjh.16074.
61. Gilliland, D.G.; Jordan, C.T.; Felix, C.A. The Molecular Basis of Leukemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* **2004**, 80–97, doi:10.1182/asheducation-2004.1.80.
62. Jones, C.L.; Stevens, B.M.; D’Alessandro, A.; Reisz, J.A.; Culp-Hill, R.; Nemkov, T.; Pei, S.; Khan, N.; Adane, B.; Ye, H.; et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell* **2018**, *34*, 724–740.e4, doi:10.1016/j.ccell.2018.10.005.
63. Chapuis, N.; Poulain, L.; Birsén, R.; Tamburini, J.; Bouscary, D. Rationale for Targeting Deregulated Metabolic Pathways as a Therapeutic Strategy in Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 405, doi:10.3389/fonc.2019.00405.
64. Maher, M.; Diesch, J.; Casquero, R.; Buschbeck, M. Epigenetic-Transcriptional Regulation of Fatty Acid Metabolism and Its Alterations in Leukaemia. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 405, doi:10.3389/fgene.2018.00405.
65. Tabe, Y.; Konopleva, M.; Andreeff, M. Fatty Acid Metabolism, Bone Marrow Adipocytes, and AML. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 155, doi:10.3389/fonc.2020.00155.
66. Tcheng, M.; Roma, A.; Ahmed, N.; Smith, R.W.; Jayanth, P.; Minden, M.D.; Schimmer, A.D.; Hess, D.A.; Hope, K.; Rea, K.A.; et al. Very Long Chain Fatty Acid Metabolism Is Required in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2021**, *137*, 3518–3532, doi:10.1182/blood.2020008551.
67. Stevens, B.M.; Jones, C.L.; Pollyea, D.A.; Culp-Hill, R.; D’Alessandro, A.; Winters, A.; Krug, A.; Abbott, D.; Goosman, M.; Pei, S.; et al. Fatty Acid Metabolism Underlies Venetoclax Resistance in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Nat. Cancer* **2020**, *1*, 1176–1187, doi:10.1038/s43018-020-00126-z.
68. Zhong, W.; Xu, M.; Li, C.; Zhu, B.; Cao, X.; Li, D.; Chen, H.; Hu, C.; Li, R.; Luo, C.; et al. ORP4L Extracts and Presents PIP(2) from Plasma Membrane for PLCβ3 Catalysis: Targeting It Eradicates Leukemia Stem Cells. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 2166–2177, doi:10.1016/j.celrep.2019.01.082.
69. Csanády, L.; Töröcsik, B. Four Ca²⁺ Ions Activate TRPM2 Channels by Binding in Deep Crevices near the Pore but Intracellularly of the Gate. *J. Gen. Physiol.* **2009**, *133*, 189–203, doi:10.1085/jgp.200810109.
70. Gutierrez, S.; Alvarado-Vázquez, P.A.; Eisenach, J.C.; Romero-Sandoval, E.A.; Boada, M.D. Tachykinins Modulate Nociceptive Responsiveness and Sensitization: In Vivo Electrical Characterization of Primary Sensory Neurons in Tachykinin Knockout (Tac1 KO) Mice. *Mol. Pain* **2019**, *15*, 1744806919845750, doi:10.1177/1744806919845750.
71. Steinhoff, M.S.; von Mentzer, B.; Geppetti, P.; Pothoulakis, C.; Bunnett, N.W. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 265–301, doi:10.1152/physrev.00031.2013.
72. Ge, C.; Huang, H.; Huang, F.; Yang, T.; Zhang, T.; Wu, H.; Zhou, H.; Chen, Q.; Shi, Y.; Sun, Y.; et al. Neurokinin-1 Receptor Is an Effective Target for Treating Leukemia by Inducing Oxidative Stress through Mitochondrial Calcium Overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 19635–19645, doi:10.1073/pnas.1908998116.
73. Glass, C.; Wuertz, C.; Cui, X.; Bi, Y.; Davuluri, R.; Xiao, Y.-Y.; Wilson, M.; Owens, K.; Zhang, Y.; Perkins, A. Global Identification of EVI1 Target Genes in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67134, doi:10.1371/journal.pone.0067134.
74. Feng, W.; Yang, X.; Wang, L.; Wang, R.; Yang, F.; Wang, H.; Liu, X.; Ren, Q.; Zhang, Y.; Zhu, X.; et al. P2X7 Promotes the Progression of MLL-AF9 Induced Acute Myeloid Leukemia by Upregulation of Pbx3. *Haematologica* **2021**, *106*, 1278–1289, doi:10.3324/haematol.2019.243360.

75. Marchi, S.; Marinello, M.; Bononi, A.; Bonora, M.; Giorgi, C.; Rimessi, A.; Pinton, P. Selective Modulation of Subtype III IP₃R by Akt Regulates ER Ca²⁺ Release and Apoptosis. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e304, doi:10.1038/cddis.2012.45.
76. Barazzuol, L.; Giamogante, F.; Cali, T. Mitochondria Associated Membranes (MAMs): Architecture and Physiopathological Role. *Cell Calcium* **2021**, *94*, 102343, doi:10.1016/j.ceca.2020.102343.
77. Kuchay, S.; Giorgi, C.; Simoneschi, D.; Pagan, J.; Missiroli, S.; Saraf, A.; Florens, L.; Washburn, M.P.; Collazo-Lorduy, A.; Castillo-Martin, M.; et al. PTEN Counteracts FBXL2 to Promote IP3R3- and Ca(2+)-Mediated Apoptosis Limiting Tumour Growth. *Nature* **2017**, *546*, 554–558, doi:10.1038/nature22965.
78. Høyer-Hansen, M.; Bastholm, L.; Szyniarowski, P.; Campanella, M.; Szabadkai, G.; Farkas, T.; Bianchi, K.; Fehrenbacher, N.; Elling, F.; Rizzuto, R.; et al. Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase-Beta, and Bcl-2. *Mol. Cell* **2007**, *25*, 193–205, doi:10.1016/j.molcel.2006.12.009.
79. Xu, X.; Zhao, J.; Xu, Z.; Peng, B.; Huang, Q.; Arnold, E.; Ding, J. Structures of Human Cytosolic NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Reveal a Novel Self-Regulatory Mechanism of Activity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33946–33957, doi:10.1074/jbc.M404298200.
80. Waitkus, M.S.; Diplas, B.H.; Yan, H. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Gliomas. *Neuro. Oncol.* **2016**, *18*, 16–26, doi:10.1093/neuonc/nov136.
81. Sjöblom, T.; Jones, S.; Wood, L.D.; Parsons, D.W.; Lin, J.; Barber, T.D.; Mandelker, D.; Leary, R.J.; Ptak, J.; Silliman, N.; et al. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* **2006**, *314*, 268–274, doi:10.1126/science.1133427.
82. Yan, H.; Parsons, D.W.; Jin, G.; McLendon, R.; Rasheed, B.A.; Yuan, W.; Kos, I.; Batinic-Haberle, I.; Jones, S.; Riggins, G.J.; et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 765–773, doi:10.1056/NEJMoa0808710.
83. Yen, K.E.; Bittinger, M.A.; Su, S.M.; Fantin, V.R. Cancer-Associated IDH Mutations: Biomarker and Therapeutic Opportunities. *Oncogene* **2010**, *29*, 6409–6417, doi:10.1038/onc.2010.444.
84. Gross, S.; Cairns, R.A.; Minden, M.D.; Driggers, E.M.; Bittinger, M.A.; Jang, H.G.; Sasaki, M.; Jin, S.; Schenkein, D.P.; Su, S.M.; et al. Cancer-Associated Metabolite 2-Hydroxyglutarate Accumulates in Acute Myelogenous Leukemia with Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 339–344, doi:10.1084/jem.20092506.
85. Marcucci, G.; Maharry, K.; Wu, Y.-Z.; Radmacher, M.D.; Mrózek, K.; Margeson, D.; Holland, K.B.; Whitman, S.P.; Becker, H.; Schwind, S.; et al. IDH1 and IDH2 Gene Mutations Identify Novel Molecular Subsets within de Novo Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2348–2355, doi:10.1200/JCO.2009.27.3730.
86. Mardis, E.R.; Ding, L.; Dooling, D.J.; Larson, D.E.; McLellan, M.D.; Chen, K.; Koboldt, D.C.; Fulton, R.S.; Delehaunty, K.D.; McGrath, S.D.; et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1058–1066, doi:10.1056/NEJMoa0903840.
87. Ward, P.S.; Cross, J.R.; Lu, C.; Weigert, O.; Abel-Wahab, O.; Levine, R.L.; Weinstock, D.M.; Sharp, K.A.; Thompson, C.B. Identification of Additional IDH Mutations Associated with Oncometabolite R(-)-2-Hydroxyglutarate Production. *Oncogene* **2012**, *31*, 2491–2498, doi:10.1038/onc.2011.416.
88. McKenney, A.S.; Levine, R.L. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Leukemia. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 3672–3677, doi:10.1172/JCI67266.
89. Dang, L.; White, D.W.; Gross, S.; Bennett, B.D.; Bittinger, M.A.; Driggers, E.M.; Fantin, V.R.; Jang, H.G.; Jin, S.; Keenan, M.C.; et al. Cancer-Associated IDH1 Mutations Produce 2-Hydroxyglutarate. *Nature* **2009**, *462*, 739–744, doi:10.1038/nature08617.
90. Chen, J.; Yang, J.; Sun, X.; Wang, Z.; Cheng, X.; Lu, W.; Cai, X.; Hu, C.; Shen, X.; Cao, P. Allosteric Inhibitor Remotely Modulates the Conformation of the Orchestric Pockets in Mutant IDH2/R140Q. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16458, doi:10.1038/s41598-017-16427-w.
91. Stein, E.M.; DiNardo, C.D.; Fathi, A.T.; Mims, A.S.; Pratz, K.W.; Savona, M.R.; Stein, A.S.; Stone, R.M.; Winer, E.S.; Seet, C.S.; et al. Ivosidenib or Enasidenib Combined with Intensive Chemotherapy in Patients with Newly Diagnosed AML: A Phase 1 Study. *Blood* **2021**, *137*, 1792–1803, doi:10.1182/blood.2020007233.
92. Prensner, J.R.; Chinnaiyan, A.M. Metabolism Unhinged: IDH Mutations in Cancer. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 291–293, doi:10.1038/nm0311-291.
93. Shafat, M.S.; Gnaneswaran, B.; Bowles, K.M.; Rushworth, S.A. The Bone Marrow Microenvironment – Home of the Leukemic Blasts. *Blood Rev.* **2017**, *31*, 277–286, doi:10.1016/j.blre.2017.03.004.
94. Reinisch, A.; Chan, S.M.; Thomas, D.; Majeti, R. Biology and Clinical Relevance of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Semin. Hematol.* **2015**, *52*, 150–164, doi:10.1053/j.seminhematol.2015.03.008.
95. Adams, G.B.; Chabner, K.T.; Alley, I.R.; Olson, D.P.; Szczepiorkowski, Z.M.; Poznansky, M.C.; Kos, C.H.; Pollak, M.R.; Brown, E.M.; Scadden, D.T. Stem Cell Engraftment at the Endosteal Niche Is Specified by the Calcium-Sensing Receptor. *Nature* **2006**, *439*, 599–603, doi:10.1038/nature04247.
96. Mansour, A.; Abou-Ezzi, G.; Sitnicka, E.; Jacobsen, S.E.W.; Wakkach, A.; Blin-Wakkach, C. Osteoclasts Promote the Formation of Hematopoietic Stem Cell Niches in the Bone Marrow. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 537–549, doi:10.1084/jem.20110994.
97. Sugiyama, T.; Kohara, H.; Noda, M.; Nagasawa, T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* **2006**, *25*, 977–988, doi:10.1016/j.immuni.2006.10.016.
98. Lévesque, J.-P.; Helwani, F.M.; Winkler, I.G. The Endosteal ‘Osteoblastic’ Niche and Its Role in Hematopoietic Stem Cell Homing and Mobilization. *Leukemia* **2010**, *24*, 1979–1992, doi:10.1038/leu.2010.214.
99. Le, P.M.; Andreeff, M.; Battula, V.L. Osteogenic Niche in the Regulation of Normal Hematopoiesis and Leukemogenesis. *Haematologica* **2018**, *103*, 1945–1955, doi:10.3324/haematol.2018.197004.

100. Nervi, B.; Ramirez, P.; Rettig, M.P.; Uy, G.L.; Holt, M.S.; Ritchey, J.K.; Prior, J.L.; Piwnica-Worms, D.; Bridger, G.; Ley, T.J.; et al. Chemosensitization of Acute Myeloid Leukemia (AML) Following Mobilization by the CXCR4 Antagonist AMD3100. *Blood* **2009**, *113*, 10.
101. Spoo, A.C.; Lübbert, M.; Wierda, W.G.; Burger, J.A. CXCR4 Is a Prognostic Marker in Acute Myelogenous Leukemia. *Blood* **2007**, *109*, 786–791, doi:10.1182/blood-2006-05-024844.
102. Zeng, Z.; Xi Shi, Y.; Samudio, I.J.; Wang, R.-Y.; Ling, X.; Frolova, O.; Levis, M.; Rubin, J.B.; Negrin, R.R.; Estey, E.H.; et al. Targeting the Leukemia Microenvironment by CXCR4 Inhibition Overcomes Resistance to Kinase Inhibitors and Chemotherapy in AML. *Blood* **2009**, *113*, 6215–6224, doi:10.1182/blood-2008-05-158311.
103. Uy, G.L.; Rettig, M.P.; Motabi, I.H.; McFarland, K.; Trinkaus, K.M.; Hladnik, L.M.; Kulkarni, S.; Abboud, C.N.; Cashen, A.F.; Stockerl-Goldstein, K.E.; et al. A Phase 1/2 Study of Chemosensitization with the CXCR4 Antagonist Plerixafor in Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2012**, *119*, 3917–3924, doi:10.1182/blood-2011-10-383406.
104. Brown, E.M.; MacLeod, R.J. Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 239–297, doi:10.1152/physrev.2001.81.1.239.
105. Lam, B.S.; Cunningham, C.; Adams, G.B. Pharmacologic Modulation of the Calcium-Sensing Receptor Enhances Hematopoietic Stem Cell Lodgment in the Adult Bone Marrow. *Blood* **2011**, *117*, 1167–1175, doi:10.1182/blood-2010-05-286294.
106. Brown, E.M. Extracellular Ca²⁺ Sensing, Regulation of Parathyroid Cell Function, and Role of Ca²⁺ and Other Ions as Extracellular (First) Messengers. *Physiol. Rev.* **1991**, *71*, 371–411, doi:10.1152/physrev.1991.71.2.371.
107. Linde, N.; Fluegen, G.; Aguirre-Ghiso, J.A. The Relationship Between Dormant Cancer Cells and Their Microenvironment. *Adv. Cancer Res.* **2016**, *132*, 45–71, doi:10.1016/bs.acr.2016.07.002.
108. Purton, L.E.; Dworkin, S.; Olsen, G.H.; Walkley, C.R.; Fabb, S.A.; Collins, S.J.; Chambon, P. RAR γ Is Critical for Maintaining a Balance between Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 1283–1293, doi:10.1084/jem.20052105.
109. Ghiaur, G.; Yegnasubramanian, S.; Perkins, B.; Gucwa, J.L.; Gerber, J.M.; Jones, R.J. Regulation of Human Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal by the Microenvironment's Control of Retinoic Acid Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 16121–16126, doi:10.1073/pnas.1305937110.
110. Nghiem, P.; Ollick, T.; Gardner, P.; Schulman, H. Interleukin-2 Transcriptional Block by Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin Kinase. *Nature* **1994**, *371*, 347–350, doi:10.1038/371347a0.
111. Anderson, K.A.; Means, A.R. Defective Signaling in a Subpopulation of CD4₂ T Cells in the Absence of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 7.
112. Si, J.; Mueller, L.; Collins, S.J. CaMKII Regulates Retinoic Acid Receptor Transcriptional Activity and the Differentiation of Myeloid Leukemia Cells. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1412–1421, doi:10.1172/JCI30779.
113. Gao, Y.; Camacho, L.H.; Mehta, K. Retinoic Acid-Induced CD38 Antigen Promotes Leukemia Cells Attachment and Interferon- γ /Interleukin-1 β -Dependent Apoptosis of Endothelial Cells: Implications in the Etiology of Retinoic Acid Syndrome. *Leuk. Res.* **2007**, *31*, 455–463, doi:10.1016/j.leukres.2006.07.004.
114. Bertagnolo, V.; Neri, L.M.; Marchisio, M.; Mischiati, C.; Capitani, S. Phosphoinositide 3-Kinase Activity Is Essential for All-Trans-Retinoic Acid-Induced Granulocytic Differentiation of HL-60 Cells. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 542–546.
115. Wu, X.; Shao, G.; Chen, S.; Wang, X.; Wang, Z.-Y. Studies on the Relationship between Protein Kinase C and Differentiation of Human Promyelocytic Leukemia Cells Induced by Retinoic Acid. *Leuk. Res.* **1989**, *13*, 869–874, doi:10.1016/0145-2126(89)90039-8.
116. Yen, A.; Roberson, M.S.; Varvayanis, S.; Lee, A.T. Retinoic Acid Induced Mitogen-Activated Protein (MAP)/Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Kinase-Dependent MAP Kinase Activation Needed to Elicit HL-60 Cell Differentiation and Growth Arrest. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3163–3172.
117. Su, M.; Alonso, S.; Jones, J.W.; Yu, J.; Kane, M.A.; Jones, R.J.; Ghiaur, G. All-Trans Retinoic Acid Activity in Acute Myeloid Leukemia: Role of Cytochrome P450 Enzyme Expression by the Microenvironment. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127790, doi:10.1371/journal.pone.0127790.
118. Bragado, P.; Estrada, Y.; Parikh, F.; Krause, S.; Capobianco, C.; Farina, H.G.; Schewe, D.M.; Aguirre-Ghiso, J.A. TGF- β 2 Dictates Disseminated Tumour Cell Fate in Target Organs through TGF- β -RIII and P38 α / β Signalling. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 1351–1361, doi:10.1038/ncb2861.
119. Bruserud, Ø.; Tsykunova, G.; Hernandez-Valladares, M.; Reikvam, H.; Tvedt, T.H.A. Therapeutic Use of Valproic Acid and All-Trans Retinoic Acid in Acute Myeloid Leukemia—Literature Review and Discussion of Possible Use in Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 423, doi:10.3390/ph14050423.
120. Kim, Y.; Jeung, H.-K.; Cheong, J.-W.; Song, J.; Bae, S.H.; Lee, J.I.; Min, Y.H. All-Trans Retinoic Acid Synergizes with Enasidenib to Induce Differentiation of IDH2-Mutant Acute Myeloid Leukemia Cells. *Yonsei Med. J.* **2020**, *61*, 762, doi:10.3349/ymj.2020.61.9.762.
121. Ghiaur, G.; Wroblewski, M.; Loges, S. Acute Myelogenous Leukemia and Its Microenvironment: A Molecular Conversation. *Semin. Hematol.* **2015**, *52*, 200–206, doi:10.1053/j.seminhematol.2015.03.003.
122. Ciciarello, M.; Corradi, G.; Loscocco, F.; Visani, G.; Monaco, F.; Cavo, M.; Curti, A.; Isidori, A. The Yin and Yang of the Bone Marrow Microenvironment: Pros and Cons of Mesenchymal Stromal Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1135, doi:10.3389/fonc.2019.01135.

123. Benito, J.; Ramirez, M.S.; Millward, N.Z.; Velez, J.; Harutyunyan, K.G.; Lu, H.; Shi, Y.-X.; Matre, P.; Jacamo, R.; Ma, H.; et al. Hypoxia-Activated Prodrug TH-302 Targets Hypoxic Bone Marrow Niches in Preclinical Leukemia Models. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1687–1698, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3378.
124. van Oosterwijk, J.G.; Buelow, D.R.; Drenberg, C.D.; Vasilyeva, A.; Li, L.; Shi, L.; Wang, Y.-D.; Finkelstein, D.; Shurtleff, S.A.; Janke, L.J.; et al. Hypoxia-Induced Upregulation of BMX Kinase Mediates Therapeutic Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*, 369–380, doi:10.1172/JCI91893.
125. Jensen, P.O.; Mortensen, B.T.; Hodgkiss, R.J.; Iversen, P.O.; Christensen, I.J.; Helledie, N.; Larsen, J.K. Increased Cellular Hypoxia and Reduced Proliferation of Both Normal and Leukaemic Cells during Progression of Acute Myeloid Leukaemia in Rats. *Cell Prolif.* **2000**, *33*, 381–395, doi:10.1046/j.1365-2184.2000.00183.x.
126. Portwood, S.; Lal, D.; Hsu, Y.-C.; Vargas, R.; Johnson, M.K.; Wetzler, M.; Hart, C.P.; Wang, E.S. Activity of the Hypoxia-Activated Prodrug, TH-302, in Preclinical Human Acute Myeloid Leukemia Models. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6506–6519, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0674.
127. Prakriya, M.; Feske, S.; Gwack, Y.; Srikanth, S.; Rao, A.; Hogan, P.G. Orai1 Is an Essential Pore Subunit of the CRAC Channel. *Nature* **2006**, *443*, 230–233, doi:10.1038/nature05122.
128. Yeromin, A.V.; Zhang, S.L.; Jiang, W.; Yu, Y.; Safrina, O.; Cahalan, M.D. Molecular Identification of the CRAC Channel by Altered Ion Selectivity in a Mutant of Orai. *Nature* **2006**, *443*, 226–229, doi:10.1038/nature05108.
129. Sipkins, D.A.; Wei, X.; Wu, J.W.; Runnels, J.M.; Côté, D.; Means, T.K.; Luster, A.D.; Scadden, D.T.; Lin, C.P. In Vivo Imaging of Specialized Bone Marrow Endothelial Microdomains for Tumour Engraftment. *Nature* **2005**, *435*, 969–973, doi:10.1038/nature03703.
130. Eyles, J.; Puaux, A.-L.; Wang, X.; Toh, B.; Prakash, C.; Hong, M.; Tan, T.G.; Zheng, L.; Ong, L.C.; Jin, Y.; et al. Tumor Cells Disseminate Early, but Immunosurveillance Limits Metastatic Outgrowth, in a Mouse Model of Melanoma. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 2030–2039, doi:10.1172/JCI42002.
131. Feske, S. Calcium Signalling in Lymphocyte Activation and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 690–702, doi:10.1038/nri2152.
132. Wolf, I.M.A.; Guse, A.H. Ca²⁺ Microdomains in T-Lymphocytes. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 73, doi:10.3389/fonc.2017.00073.
133. Man, K.; Gabriel, S.S.; Liao, Y.; Gloury, R.; Preston, S.; Henstridge, D.C.; Pellegrini, M.; Zehn, D.; Berberich-Siebelt, F.; Febbraio, M.A.; et al. Transcription Factor IRF4 Promotes CD8⁺ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **2017**, *47*, 1129–1141.e5, doi:10.1016/j.immuni.2017.11.021.
134. Martinez, G.J.; Pereira, R.M.; Äijö, T.; Kim, E.Y.; Marangoni, F.; Pipkin, M.E.; Togher, S.; Heissmeyer, V.; Zhang, Y.C.; Crotty, S.; et al. The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8⁺ T Cells. *Immunity* **2015**, *42*, 265–278, doi:10.1016/j.immuni.2015.01.006.
135. Oestreich, K.J.; Yoon, H.; Ahmed, R.; Boss, J.M. NFATc1 Regulates PD-1 Expression upon T Cell Activation. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 4832–4839, doi:10.4049/jimmunol.181.7.4832.
136. Ritprajak, P.; Azuma, M. Intrinsic and Extrinsic Control of Expression of the Immunoregulatory Molecule PD-L1 in Epithelial Cells and Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol.* **2015**, *51*, 221–228, doi:10.1016/j.oraloncology.2014.11.014.
137. Saudemont, A.; Quesnel, B. In a Model of Tumor Dormancy, Long-Term Persistent Leukemic Cells Have Increased B7-H1 and B7.1 Expression and Resist CTL-Mediated Lysis. *Blood* **2004**, *104*, 2124–2133, doi:10.1182/blood-2004-01-0064.
138. Schneider, H.; Smith, X.; Liu, H.; Bismuth, G.; Rudd, C.E. CTLA-4 Disrupts ZAP70 Microcluster Formation with Reduced T Cell/APC Dwell Times and Calcium Mobilization. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 40–47, doi:10.1002/eji.200737423.
139. Chen, X.; Cherian, S. Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis. *Clin. Lab. Med.* **2017**, *37*, 753–769, doi:10.1016/j.cll.2017.07.003.
140. Wu, Y.; Chen, M.; Wu, P.; Chen, C.; Xu, Z.P.; Gu, W. Increased PD-L1 Expression in Breast and Colon Cancer Stem Cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2017**, *44*, 602–604, doi:10.1111/1440-1681.12732.
141. Nair, J.S.; DaFonseca, C.J.; Tjernberg, A.; Sun, W.; Darnell, J.E.; Chait, B.T.; Zhang, J.J. Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 Phosphorylation in Response to IFN-. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 5971–5976, doi:10.1073/pnas.052159099.
142. Berthon, C.; Driss, V.; Liu, J.; Kuranda, K.; Leleu, X.; Jouy, N.; Hetuin, D.; Quesnel, B. In Acute Myeloid Leukemia, B7-H1 (PD-L1) Protection of Blasts from Cytotoxic T Cells Is Induced by TLR Ligands and Interferon-Gamma and Can Be Reversed Using MEK Inhibitors. *Cancer Immunol. Immunother.* **2010**, *59*, 1839–1849, doi:10.1007/s00262-010-0909-y.
143. Teixeira, L.K.; Fonseca, B.P.F.; Vieira-de-Abreu, A.; Barboza, B.A.; Robbs, B.K.; Bozza, P.T.; Viola, J.P.B. IFN- Production by CD8⁺ T Cells Depends on NFAT1 Transcription Factor and Regulates Th Differentiation. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5931–5939, doi:10.4049/jimmunol.175.9.5931.
144. Stahl, M.; Goldberg, A.D. Immune Checkpoint Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Novel Combinations and Therapeutic Targets. *Curr. Oncol. Rep.* **2019**, *21*, 37, doi:10.1007/s11912-019-0781-7.
145. Sehgal, A.; Whiteside, T.L.; Boyiadzis, M. Programmed Death-1 Checkpoint Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15*, 1191–1203, doi:10.1517/14712598.2015.1051028.
146. Payne, K.K.; Keim, R.C.; Graham, L.; Idowu, M.O.; Wan, W.; Wang, X.-Y.; Toor, A.A.; Bear, H.D.; Manjili, M.H. Tumor-Reactive Immune Cells Protect against Metastatic Tumor and Induce Immunoediting of Indolent but Not Quiescent Tumor Cells. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *100*, 625–635, doi:10.1189/jlb.5A1215-580R.
147. Zhang, L.; Gajewski, T.F.; Kline, J. PD-1/PD-L1 Interactions Inhibit Antitumor Immune Responses in a Murine Acute Myeloid Leukemia Model. *Blood* **2009**, *114*, 1545–1552, doi:10.1182/blood-2009-03-206672.

148. Segovia, M.; Russo, S.; Jeldres, M.; Mahmoud, Y.D.; Perez, V.; Duhalde, M.; Charnet, P.; Rousset, M.; Victoria, S.; Veigas, F.; et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell* **2019**, *35*, 767–781.e6, doi:10.1016/j.ccell.2019.04.003.
149. Rashidi, A.; Uy, G.L. Targeting the Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **2015**, *10*, 126–131, doi:10.1007/s11899-015-0255-4.
150. Behrmann, L.; Wellbrock, J.; Fiedler, W. Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche—Take a Closer Look. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 444, doi:10.3389/fonc.2018.00444.
151. Karantanou, C.; Godavarthy, P.S.; Krause, D.S. Targeting the Bone Marrow Microenvironment in Acute Leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2018**, *59*, 2535–2545, doi:10.1080/10428194.2018.1434886.
152. Isidori, A.; Salvestrini, V.; Ciciarello, M.; Loscocco, F.; Visani, G.; Parisi, S.; Lecciso, M.; Ocadlikova, D.; Rossi, L.; Gabucci, E.; et al. The Role of the Immunosuppressive Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia Development and Treatment. *Expert Rev. Hematol.* **2014**, *7*, 807–818, doi:10.1586/17474086.2014.958464.
153. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
154. Chae, Y.K.; Dimou, A.; Pierce, S.; Kantarjian, H.; Andreeff, M. The Effect of Calcium Channel Blockers on the Outcome of Acute Myeloid Leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2014**, *55*, 2822–2829, doi:10.3109/10428194.2014.901513.
155. Zhang, H.; Yu, P.; Lin, H.; Jin, Z.; Zhao, S.; Zhang, Y.; Xu, Q.; Jin, H.; Liu, Z.; Yang, W.; et al. The Discovery of Novel ACA Derivatives as Specific TRPM2 Inhibitors That Reduce Ischemic Injury Both In Vitro and In Vivo. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 3976–3996, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c02129.
156. Wang, J.-X.; Zhang, L.; Huang, Z.-W.; Zhang, X.-N.; Jiang, Y.-Y.; Liu, F.-J.; Long, L.; Xue, M.-J.; Lu, G.; Liu, Q.; et al. Aurora Kinase Inhibitor Restrains STAT5-Activated Leukemic Cell Proliferation by Inducing Mitochondrial Impairment. *J. Cell Physiol.* **2020**, *235*, 8358–8370, doi:10.1002/jcp.29680.
157. Löwenberg, B.; Muus, P.; Ossenkoppele, G.; Rousselot, P.; Cahn, J.-Y.; Ifrah, N.; Martinelli, G.; Amadori, S.; Berman, E.; Sonneveld, P.; et al. Phase 1/2 Study to Assess the Safety, Efficacy, and Pharmacokinetics of Barasertib (AZD1152) in Patients with Advanced Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2011**, *118*, 6030–6036, doi:10.1182/blood-2011-07-366930.
158. Yang, J.; Ikezoe, T.; Nishioka, C.; Tasaka, T.; Taniguchi, A.; Kuwayama, Y.; Komatsu, N.; Bandobashi, K.; Togitani, K.; Koeffler, H.P.; et al. AZD1152, a Novel and Selective Aurora B Kinase Inhibitor, Induces Growth Arrest, Apoptosis, and Sensitization for Tubulin Depolymerizing Agent or Topoisomerase II Inhibitor in Human Acute Leukemia Cells in Vitro and in Vivo. *Blood* **2007**, *110*, 2034–2040, doi:10.1182/blood-2007-02-073700.
159. Birkenkamp, K.U.; Geugien, M.; Lemmink, H.H.; Kruijer, W.; Vellenga, E. Regulation of Constitutive STAT5 Phosphorylation in Acute Myeloid Leukemia Blasts. *Leukemia* **2001**, *15*, 1923–1931, doi:10.1038/sj.leu.2402317.
160. Warsch, W.; Kollmann, K.; Eckelhart, E.; Fajmann, S.; Cerny-Reiterer, S.; Hölbl, A.; Gleixner, K.V.; Dworzak, M.; Mayerhofer, M.; Hoermann, G.; et al. High STAT5 Levels Mediate Imatinib Resistance and Indicate Disease Progression in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **2011**, *117*, 3409–3420, doi:10.1182/blood-2009-10-248211.
161. Hung, L.-Y.; Tseng, J.T.; Lee, Y.-C.; Xia, W.; Wang, Y.-N.; Wu, M.-L.; Chuang, Y.-H.; Lai, C.-H.; Chang, W.-C. Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Interacts with Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) in Activating Aurora-A Gene Expression. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4337–4351, doi:10.1093/nar/gkn417.
162. Wang, Z.; Mi, T.; Bradley, H.L.; Metts, J.; Sabnis, H.; Zhu, W.; Arbiser, J.; Bunting, K.D. Pimozide and Imipramine Blue Exploit Mitochondrial Vulnerabilities and Reactive Oxygen Species to Cooperatively Target High Risk Acute Myeloid Leukemia. *Antioxid. (Basel)* **2021**, *10*, doi:10.3390/antiox10060956.
163. Chen, Y.; Hui, H.; Yang, H.; Zhao, K.; Qin, Y.; Gu, C.; Wang, X.; Lu, N.; Guo, Q. Wogonoside Induces Cell Cycle Arrest and Differentiation by Affecting Expression and Subcellular Localization of PLSCR1 in AML Cells. *Blood* **2013**, *121*, 3682–3691, doi:10.1182/blood-2012-11-466219.
164. Wang, W.; Xiao, J.; Adachi, M.; Liu, Z.; Zhou, J. 4-Aminopyridine Induces Apoptosis of Human Acute Myeloid Leukemia Cells via Increasing [Ca²⁺]_i through P2X7 Receptor Pathway. *Cell Physiol. Biochem.* **2011**, *28*, 199–208, doi:10.1159/000331731.
165. Angka, L.; Lee, E.A.; Rota, S.G.; Hanlon, T.; Sukhai, M.; Minden, M.; McMillan, E.M.; Quadrilatero, J.; Spagnuolo, P.A. Glucopsychosine Increases Cytosolic Calcium to Induce Calpain-Mediated Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells. *Cancer Lett.* **2014**, *348*, 29–37, doi:10.1016/j.canlet.2014.03.003.
166. Yanamandra, N.; Buzzeeo, R.W.; Gabriel, M.; Hazlehurst, L.A.; Mari, Y.; Beaupre, D.M.; Cuevas, J. Tipifarnib-Induced Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia and Multiple Myeloma Cells Depends on Ca²⁺ Influx through Plasma Membrane Ca²⁺ Channels. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2011**, *337*, 636–643, doi:10.1124/jpet.110.172809.
167. Diez-Bello, R.; Jardin, I.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Orai1 and Orai2 Mediate Store-Operated Calcium Entry That Regulates HL60 Cell Migration and FAK Phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 1064–1070, doi:10.1016/j.bbamer.2016.11.014.
168. Manteniotis, S.; Wojcik, S.; Göthert, J.R.; Dürig, J.; Dührsen, U.; Gisselmann, G.; Hatt, H. Deorphanization and Characterization of the Ectopically Expressed Olfactory Receptor OR51B5 in Myelogenous Leukemia Cells. *Cell Death Discov.* **2016**, *2*, 16010, doi:10.1038/cddiscovery.2016.10.
169. Yeh, Y.-C.; Parekh, A.B. CRAC Channels and Ca(2+)-Dependent Gene Expression. In *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*; Kozak, J.A., Putney, J.W.J., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2018; pp. 93–106. ISBN 978-1-315-15259-2.

-
170. He, X.; Dou, A.; Feng, S.; Roman-Rivera, A.; Hawkins, C.; Lawley, L.; Zhang, J.; Wunderlich, M.; Mizukawa, B.; Halene, S.; et al. Cyclosporine Enhances the Sensitivity to Lenalidomide in MDS/AML in Vitro. *Exp. Hematol.* **2020**, *86*, 21-27.e2, doi:10.1016/j.exphem.2020.05.001.
 171. Borella, G.; Da Ros, A.; Borile, G.; Porcù, E.; Tregnago, C.; Benetton, M.; Marchetti, A.; Bisio, V.; Montini, B.; Michielotto, B.; et al. Targeting the Plasticity of Mesenchymal Stromal Cells to Reroute the Course of Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2021**, *138*, 557–570, doi:10.1182/blood.2020009845.

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

La dormance tumorale et l'échappement des cellules cancéreuses à la réponse immunitaire représentent les causes majeures de chimiorésistance et de rechute chez les patients atteints de cancer. Les mécanismes responsables de ces événements restent encore mal compris et c'est pourquoi il est important d'identifier les voies de signalisation qui contrôlent la quiescence cellulaire afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques visant les cellules persistantes.

Ces problématiques sont critiques dans les leucémies aiguës myéloïdes car le taux de rechute associé à la maladie minimale résiduelle est malheureusement très élevé et, à ce jour, aucune thérapie n'a permis une éradication totale des cellules leucémiques.

La lyse cytotoxique des cellules tumorales par les LT CD8⁺ est dépendante de la signalisation calcique. Néanmoins, l'efficacité et la cinétique de cette activité cytotoxique peut être modulée par les cellules tumorales présentant une résistance innée contre le système immunitaire, notamment par l'expression de PD-L1.

Dans ce sens, mon projet de thèse consistera à étudier la signature calcique de la synapse immunologique entre les LT cytotoxiques et les cellules leucémiques. Cette étude a pour but de **mettre en évidence une potentielle spécificité de la signalisation calcique lors de la lyse cytotoxique ou non des cellules leucémiques qui peut être dépendante des propriétés intrinsèques des cellules (CSL, expression de l'axe PD-1/PD-L1, état d'épuisement des LT).**

Plus spécifiquement, il est question **d'étudier la signature calcique de la synapse immunologique en fonction des phénotypes des deux types de cellules et/ou en présence de la signalisation PD-1/PD-L1 dans un contexte clinique à partir de prélèvements sanguins de donneurs sains et de patients atteints de LAM au diagnostic.** Cette signalisation calcique est également étudiée dans des conditions de modulation à l'aide d'inhibiteurs spécifiques des voies calciques afin de **mieux comprendre les acteurs impliqués qui impacteraient le devenir du statut quiescent/prolifératif des cellules leucémiques et/ou les mécanismes d'immunoéchappement.**

Plusieurs scénarios pourraient être envisagés suite à la modulation des signaux calciques : (i) favoriser la sortie des cellules leucémiques de leur état de quiescence afin de les sensibiliser à la chimiothérapie, (ii) une altération de l'expression de PD-1 et PD-L1 (cibles de NFAT) rétablissant ainsi la fonctionnalité des LT contre les cellules leucémiques et (iii) une restauration des fonctions des LT par stimulation directe de la voie

Ca²⁺/calcineurine/NFAT en aval de la signalisation inhibitrice de PD-1 (inhibition de la signalisation du TCR). La restauration de la fonctionnalité des LT pourrait ainsi aboutir à une lyse cytotoxique des cellules leucémiques persistantes.

Au niveau de l'approche méthodologique, les défis et objectifs sont multiples : les cellules leucémiques et les LT CD8⁺ issus de patients seront triés selon leur phénotype (cellules leucémiques non souches, CSL, expression de PD-1, expression de PD-L1) puis mis en contact dans un contexte de synapse immunologique. Il est question de former des synapses immunologiques allogéniques (des LT CD8⁺ sains avec des cellules leucémiques d'un patient LAM) ou autologues (des LT CD8⁺ et des cellules leucémiques d'un même patient LAM) afin de comparer l'activité des LT de donneurs sains et LAM.

Dans le cadre d'une collaboration étroite, l'apport original de l'expertise du laboratoire mixte international franco-japonais (SMMiL-E) spécialisé en microsystèmes de microfluidique nous permettra d'avoir à disposition un système qui vise à (i) optimiser la capture de paires de cellules entre un LT et la cellule leucémique, (ii) favoriser le contact entre un LT et une cellule leucémique en fonction des phénotypes des deux types cellulaires et (iii) de réduire considérablement le nombre de cellules nécessaires pour la réalisation du test de formation de la synapse immunologique.

Plus spécifiquement, l'optimisation de ces microsystèmes ainsi que la mise en place de protocoles efficaces pour étudier des cellules de patients permettra :

- D'étudier efficacement la réponse calcique des cellules isolées ou de paires de cellules à l'échelle de la cellule unique.
- D'étudier la signature calcique des différentes paires des cellules formées en fonction des phénotypes étudiés.
- D'étudier des populations rares (CSL, LT CD8⁺ PD1⁺, ...).
- D'évaluer l'effet en temps réel d'inhibiteurs des canaux calciques membranaires SOCs durant les cinétiques pour une meilleure compréhension de leur impact sur les événements cellulaires et moléculaires (lyse, formation de la synapse, signal calcique...) de la synapse immunologique et ainsi mieux comprendre les différentes signatures calciques.

L'objectif est d'analyser la signature calcique des cellules isolées ou sous forme de paires de cellules en fonction de leur phénotype et/ou de la modulation de la signalisation calcique réalisée simultanément au sein du microsystème de microfluidique. Le flux calcique des deux types cellulaires sera évalué par imagerie calcique, microscopie confocale et

vidéo-microscopie au laboratoire U-1003 en partenariat avec le Dr Loïc Lemonnier, expert en signalisation calcique.

Une expérience parallèle en cytométrie en flux permettra d'étudier le phénomène de lyse cytotoxique sur ces mêmes paires de cellules et la récupération des surnageants sera également effectuée afin de vérifier par ELISA la sécrétion d'IFN γ par les LT.

En parallèle de notre projet d'étude de la signalisation calcique de la synapse immunologique à l'échelle de la cellule unique à l'aide de la microfluidique, nous nous intéressons également à la signature calcique des cellules de LAM au sein de lignées cellulaires humaines et de cellules primaires de patients atteints de LAM au diagnostic.

Nous avons pour objectif de **montrer pour la première fois l'implication potentielle du canal calcique ORAI1 dans l'entrée capacitive de Ca $^{2+}$ dans les cellules de LAM.**

Cette étude nous permettra également d'identifier une potentielle **signature calcique spécifique en fonction** (i) du **statut de différenciation**, (ii) de la **quiescence/prolifération**, (iii) de **l'activité ABCB1**, (iv) de la **proportion du compartiment des CSL** et (v) d'un **mauvais pronostic des cellules leucémiques**.

Pour finir, nous étudierons l'effet du **traitement chimiothérapeutique Ara-C sur la régulation de l'expression de ORAI1 et la signalisation calcique des cellules leucémiques résistantes au traitement** (Schéma 8).

Ces projets multidisciplinaires et collaboratifs pourraient donc, à terme, apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes encore non élucidés à ce jour qui contrôlent l'échappement des cellules leucémiques et la maladie résiduelle dans les LAM (quiescence des CSL, dormance immunologique *via* l'axe PD-1/PD-L1). Trouver une signature calcique spécifique dans ces divers contextes permettra d'offrir des perspectives d'optimisation de l'efficacité des protocoles de chimiothérapies et d'immunothérapies actuellement utilisés en clinique en proposant (i) de nouveaux traitements combinant le ciblage des canaux calciques aux thérapies conventionnelles et/ou (ii) une immunothérapie de précision.

Les résultats de mon projet de thèse seront organisés en trois volets :

- Notre article intitulé « *Pairing cells of different sizes in a microfluidic device for immunological synapse monitoring* » nous permet de valider expérimentalement les microsystèmes de microfluidique pour l'analyse de l'homéostasie calcique à l'échelle de la cellule unique. Ainsi, nous sommes capables de mettre en contact

une paire de cellules issues de patients et analyser la réponse calcique de la synapse immunologique formée.

- Grâce à la méthodologie basée sur la microfluidique, nous pouvons étudier la réponse calcique de cellules leucémiques et LT en faible quantité et à l'échelle de la cellule unique lors de la formation de synapses immunologiques ou en étude isolée. Ces études sont réalisées avec des échantillons de donneurs sains et de patients atteints de LAM au diagnostic afin d'étudier les sous-populations de cellules leucémiques et LT, et d'étudier la réponse calcique des synapses immunologiques formées en fonction de leur phénotype.
- Enfin, notre article « *Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure* » montre l'implication de la signalisation calcique dans la régulation des mécanismes des cellules leucémiques, et plus particulièrement des CSL, ainsi que le rôle de la signalisation calcique dans la résistance à l'Ara-C.

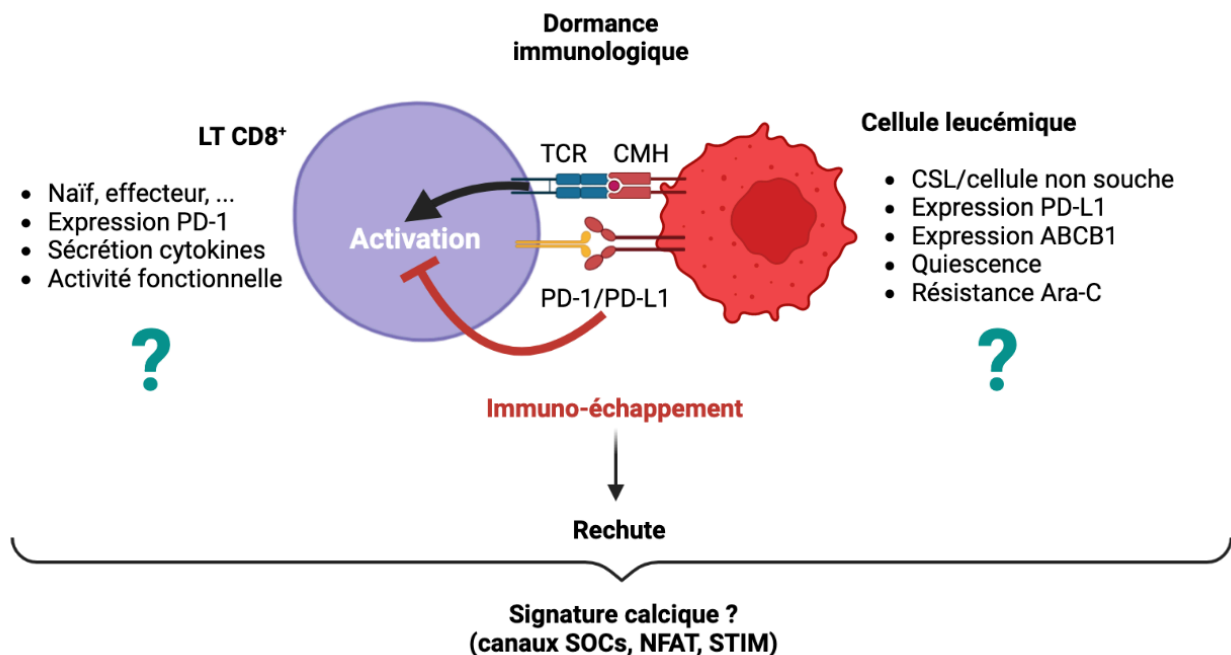


Schéma 8 : mécanismes pouvant réguler l'immuno-échappement des cellules leucémiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

1.1 Lignées cellulaires

Pour ces travaux, deux lignées cellulaires couramment étudiées dans le cadre des leucémies aiguës myéloïdes ont été utilisées :

- La lignée cellulaire KG1, caractérisée par un blocage de différenciation au stade myéloblastique. Elle a été initialement obtenue à partir de cellules de la moelle osseuse isolées chez un individu masculin de 59 ans de type caucasien. Cette lignée a été obtenue grâce au fournisseur ATCC® (CCL-246™).
- La lignée cellulaire U937, caractérisée par un blocage de différenciation des cellules au stade monocyttaire. Elle a été obtenue à partir de cellules isolées d'un homme caucasien de 37 ans. Cette lignée a été obtenue grâce au fournisseur ATCC® (CRL-1593.2™).

1.2 Échantillons de patients

Les cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) sont obtenues à partir de prélèvements sanguins de donneurs sains et de patients au stade du diagnostic de la LAM provenant respectivement de l'Établissement Français du Sang (EFS) et du Service des Maladies Du Sang de l'Hôpital Claude Huriez de Lille (Numéros d'autorisation : CSTMT079 et PLER/2021/005). Les caractéristiques (pronostic, mutations, sexe...) des patients et de la LAM sont indiquées dans le tableau 8.

Afin de collecter les PBMC de donneurs sains, le sang est d'abord dilué au demi dans une solution saline phosphatée modifiée sans Ca^{2+} ni MgCl_2 (*phosphate-buffered saline*, PBS, Gibco). De cette suspension, 25mL sont doucement ajoutés à une solution de 25mL de Pancoll (Pan Biotech, Aidenbach, Allemagne) dans un tube Falcon 50, et ce, avec le moins d'agitation possible. Une centrifugation par gradient de densité est ensuite réalisée pendant 30min à 400g sans utiliser les freins (accélération 1 et frein 0) afin de séparer les PBMC du reste des cellules sanguines. Après avoir extrait avec attention les tubes de la centrifugeuse afin de préserver le gradient de densité, l'anneau de PBMC contenant les lymphocytes, monocytes et plaquettes est ensuite délicatement récupéré. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS et resuspendues dans 90% de sérum de veau foetal (SVF, Gibco) et 10% de DMSO pour être cryoconservées dans de l'azote liquide jusqu'à utilisation.

Pour certaines expérimentations, les PBMC de patients LAM sont enrichis en cellules leucémiques par déplétion des cellules immunitaires *via* une sélection immuno-magnétique négative (CD3 pour les lymphocytes T et CD20 pour les lymphocytes B). Les cellules sont ensuite également cryoconservées dans l'azote liquide dans une solution composée de 90% de SVF et 10% de DMSO jusqu'à leur utilisation.

Après décongélation, les suspensions cellulaires sont traitées avec de la DNase (Qiagen, Germantown, MD, États-Unis) à une concentration finale de 50 µg/mL afin d'éliminer les débris. Une fois que l'action de la DNase est terminée, les cellules peuvent être utilisées et maintenues dans du milieu de culture RPMI-1640 (GlutaMax, Life Technologies) complété avec un cocktail d'antibiotiques (1% pénicilline et streptomycine, Life Technologies) ainsi que du SVF décomplémenté à 10%.

Le comité d'éthique local a approuvé toutes les études et le consentement éclairé des patients a été obtenu au moment du diagnostic (CHRU de Lille, Tumorothèque du C2RC, agrément n°CSTMT079, CSTMT089).

1.3 Conditions de culture

Les lignées sont cultivées et ensemencées 2 fois par semaine à une densité de 5 et 10 millions de cellules pour les U937 et KG1 respectivement dans un T75 cm² comprenant 25 mL de milieu RPMI-1640 (GlutaMax, Life Technologies) complété avec un cocktail d'antibiotiques (1% pénicilline et streptomycine, Life Technologies) ainsi que du SVF décomplémenté à des concentrations différentes selon le besoin des lignées (10% et 20% pour les lignées U937 et KG1 respectivement, Sigma-Aldrich). Les flasques sont maintenues à 37°C dans un incubateur (5% CO₂).

Les cellules leucémiques et LT de patients LAM sont cultivés dans un milieu RPMI-1640 (GlutaMax, Life Technologies) complété avec un cocktail d'antibiotiques (1% pénicilline et streptomycine, Life Technologies) et 10% de SVF lors des traitements ou suite au tri cellulaire avant de les étudier en imagerie calcique et microfluidique.

Les cellules vivantes et mortes sont dénombrées et discriminées sur lame de Malassez à l'aide du bleu de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich) qui est incorporé par les cellules mortes. Une fraction de 10µL du milieu cellulaire est prélevée et diluée au demi avec le bleu de Trypan.

Les cellules sont également comptées à l'aide de l'équipement Luna (LUNA-FLTM *Dual Fluorescence Cell Counter*). Une suspension cellulaire de 9 µL est ajoutée à 1 µL d'acridine orange/iodure de propidium (Invitrogen) afin de discriminer les cellules mortes des vivantes.

Cette technologie permet également d'obtenir le pourcentage de viabilité ainsi que la taille des cellules.

1.4 Tri et activation des LT CD8⁺ de donneurs sains

Après décongélation des PBMC de donneurs sains, les LT CD8⁺ sont triés négativement à l'aide de billes anti-CD8 provenant du kit *EasySep Human CD8 T Cell Isolation Kit* (StemCell). Après lavage, les PBMC sont resuspendus dans 2mL de PBS auxquels sont ajoutés un cocktail d'isolement (50µL/mL de PBS) pendant 5min à TA (température ambiante). Les billes *RapidSpheres™* anti-CD8 sont ensuite directement ajoutées (50µL/mL de PBS), puis le tube FACS en polystyrène transparent est placé dans un aimant *EasyStep™ Magnet* (Stemcell technologies) pendant 3min. La sélection négative fait que seuls les LT CD8⁺ ne sont pas retenus par les billes aimantées et le contenu du tube est donc versé doucement dans un autre tube afin de collecter les LT CD8⁺ isolés. Les cellules sont ensuite lavées et reprise dans du milieu RPMI-1640 (GlutaMax, Life Technologies) complété avec un cocktail d'antibiotiques (1% pénicilline et streptomycine, Life Technologies) ainsi que du SVF décomplémenté à 10%.

Afin d'activer les LT CD8⁺, des billes d'activation recouvertes avec des anticorps CD3/CD28 humains (Thermofischer Scientific) ont été ajoutées au ratio 1 :1 dans le milieu cellulaire avec de l'IL-2 (Ozyme) à concentration finale de 250 UI/mL, et ce, pendant 3 jours. Après les 3 jours d'activation, les billes sont retirées et les cellules comptées puis lavées avant d'être de nouveauensemencées avec de l'IL-2 pendant 4 jours de plus avant leur utilisation pour les expérimentations (imagerie calcique, lyse cytotoxique, ...).

Avant les expérimentations de formation de synapse immunologique, que ce soit en cytométrie en flux pour l'étude de la lyse cytotoxique ou en imagerie calcique afin d'évaluer l'homéostasie calcique de la synapse immunologique, les LT CD8⁺ et les cellules leucémiques sont chargés avec 1 µg ml⁻¹ d'un cocktail de superantigènes (SEA et Tsst-1, Sigma-Aldrich) pendant 45 min à 37 °C afin de favoriser la formation de la synapse immunologique (Schéma 9).

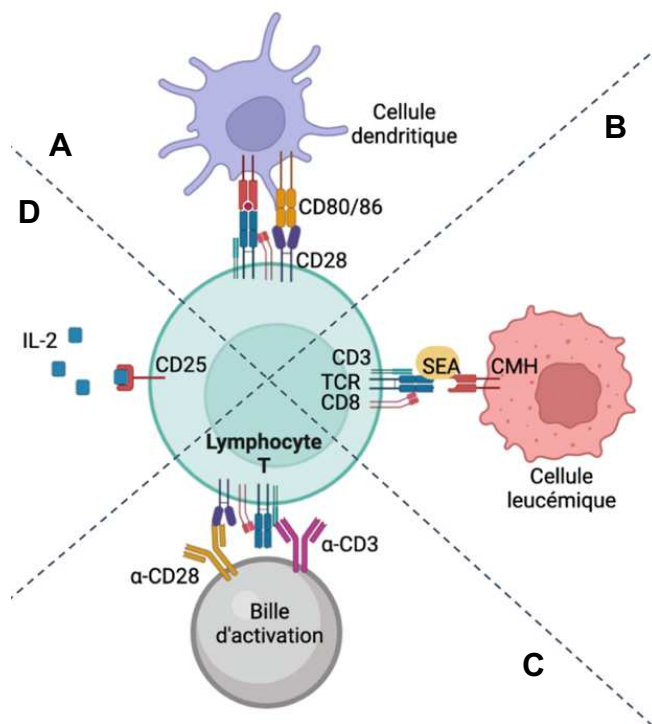


Schéma 9 : Quatre différentes méthodes d'activation du LT. (A) physiologiquement, les LT sont stimulés par les CPA comme les cellules dendritiques *via* le complexe TCR-CMH et les co-activateurs. (B) Cette stimulation peut être mimée par un superantigène comme le Staphylococcus enterotoxin A (SEA) qui lie le CMH avec le TCR. (C) Un complexe artificiel TCR-ligand peut être réalisé par des billes recouvertes avec des anticorps CD3 et/ou CD28. (D) Les LT peuvent également être activés par la liaison de l'IL-2 à son récepteur CD25.

1.5 Traitements des cellules

Afin d'évaluer la modulation de l'homéostasie calcique, les lignées cellulaires humaines de LAM et cellules primaires de patients atteints de LAM au diagnostic ont subi pendant 24h ou 72h d'incubation à 37°C différents traitements puis ont été collectées et dénombrées (vivantes et mortes). Les cellules ont été cultivées dans des plaques 24 puits à une densité de 1 million de cellules par puits et ont été incubées soit (i) avec du milieu complet dans lequel a été ajouté de la cytarabine (Ara-C, CHU Lille Hôpital Huriez), une molécule anticancéreuse inhibant la synthèse de l'ADN des cellules en prolifération utilisée en clinique pour traiter les LAM, aux concentrations finales de 0.1, 1, 5 ou 10µM ou soit (ii) avec du milieu complet auquel a été ajoutée la molécule synta66 (concentration finale 10µM, Sigma-Aldrich), un inhibiteur des canaux calciques SOCs ORAI1 bloquant l'entrée capacitive de Ca²⁺ suite à la déplétion des stocks calciques intracellulaires. Des conditions contrôles dans du milieu complet sans les molécules thérapeutiques sont réalisées pour chaque expérience.

Avant tri cellulaire, les cellules leucémiques de patients LAM ont été incubées avec de l'IFN_γ (Cell Signaling) pendant 24h à une concentration finale de 25ng/mL afin d'évaluer son effet sur l'expression du marqueur de surface PD-L1.

1.6 Inhibition spécifique du niveau d'expression du gène ORAI1 par siRNA

Il est question d'étudier l'impact d'une inhibition spécifique du canal calcique ORAI1 afin de déterminer le rôle de ORAI1 dans l'entrée capacitive de Ca²⁺. Pour ce faire, cinq millions

de cellules KG1 ou U937 ont été transfectées par électroporation dans un tampon de transfection (LONZA Amaxa® Cell Line Nucleofactor™ Kit V) avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre *ORAI1* (100 nM, Santa Cruz Biotechnology) pour inhiber le niveau d'expression de *ORAI1*. Après le passage des cellules dans l'électroporateur *Amaxa Nucleofactor™ II*, les cellules transfectées sont cultivées dans des plaques 6 puits à une concentration de 5 millions de cellules par puits contenant 5 mL de milieu. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été collectées et l'expression de *ORAI1* a été évaluée par RT-qPCR. L'efficacité de l'extinction de l'expression génique était d'environ 90% et 95% pour les lignées cellulaires KG1 et U937 respectivement dans toutes les expériences.

2. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une méthode qui permet de localiser et quantifier les protéines d'intérêt à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes. Ici, cela permet de visuellement localiser et ainsi vérifier l'activation du facteur de transcription NFAT et ses différentes isoformes ainsi que l'expression de Ki67, protéine exprimée durant les phases actives du cycle cellulaire, au sein des cellules U937, KG1 et de patient LAM traitées ou non à l'Ara-C. Les cellules sont immobilisées sur des lamelles recouvertes de poly-L-lysine à 0,01% (Sigma-Aldrich) disposées dans une plaque 24 puits pour être incubées 24 heures à 37°C. Le lendemain, une fixation au PFA 4% (Paraformaldéhyde solution 4%, Sigma-Aldrich) est réalisée puis la solution de saturation/perméabilisation Triton X-100 (0,1% dans du PBS) est ajoutée durant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont préalablement été lavées 3 fois au PBS-Tween (0,1% de Tween dans du PBS, Merck) durant 5 minutes avant de les incuber dans une solution de blocage (1% BSA dans du PBS, Sigma-Aldrich) 1 heure à température ambiante pour une saturation des sites aspécifiques. Les anticorps primaires IgG de lapin dirigés contre les différentes isoformes du facteur de transcription NFAT humain (NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4, dilution 1 :100, Abcam) sont directement ajoutés à la solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois au PBS-Tween pendant 5 minutes avant d'ajouter l'anticorps conjugué au fluorochrome FITC dirigé contre le marqueur de prolifération Ki67 humain (dilution 1 :100, Abcam) ainsi que l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 568 dirigé contre l'anticorps primaire IgG anti-lapin de NFAT (Dilution 1 :2000, Invitrogen) pendant 1 heure à température ambiante dans la solution de blocage. Des contrôles négatifs ont été effectués en remplaçant les anticorps primaires de NFAT et l'anticorps conjugué au fluorochrome FITC par des isotopes. Après 2 lavages successifs de 5 minutes au PBS-Tween, un

marquage nucléaire a été effectué au Hoechst 33342 (10 µg/mL de PBS, Molecular Probes) durant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont été rincées 1 fois au PBS-Tween durant 5 minutes avant de récupérer les lamelles qui ont ensuite été montées sur lame avec du milieu de montage (*fluoroshield mounting medium*, Abcam) pour observation.

L'observation microscopique a été effectuée à l'aide d'un microscope inversé LSM 880 (ZEISS) équipé d'un système d'imagerie confocale à balayage laser pour visualiser le niveau d'intensité de fluorescence du noyau (Hoechst : filtre, λ_{ex} : 343 nm, λ_{em} : 483 nm), des isoformes du facteur de transcription NFAT (filtre, λ_{ex} 568 nm, λ_{em} : 605 nm) et de la protéine Ki67 (filtre, λ_{ex} 488 nm, λ_{em} : 532 nm). Les photos sont enregistrées avec le logiciel Zen black 2010 aux grossissements x200, x400 et x630 et analysées avec le logiciel imageJ.

3. Évaluation de la sécrétion d'IFN γ par les LT de donneurs sains et LAM par test ELISA

Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique de détection afin de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action du substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Après centrifugation, et afin d'éliminer les cellules, le milieu des LT CD8⁺ primaires de donneurs sains et LAM a été collecté à différents jours de l'activation des LT avec les billes d'activation CD3/CD28 et l'IL-2 ou bien après lyse cytotoxique dans le but d'évaluer le niveau d'IFN γ sécrété par les cellules à l'aide du kit *Human IFN gamma High Sensitivity ELISA Kit* (ThermoFisher). Les surnageants sont stockés à -20°C en attendant l'utilisation des kits ELISA. Après lavage des puits de la plaque 96 puits pré-coatée, la dilution du standard est réalisée puis le diluant d'échantillon ainsi que la coenzyme Biotine sont ajoutés à tous les puits. Cinquante µL de chaque échantillon sont ajoutés en duplicatas à la plaque qui est ensuite incubée pendant 2h à TA sur un agitateur de plaque. Après un nouveau lavage des puits, 100µL de Streptavidine HRP sont ajoutés à tous les puits et la plaque est ensuite incubée à TA pendant 1h sur un agitateur de plaque. Après lavage, 100µL de la première solution permettant l'amplification du signal sont ajoutés avant une incubation de 15min à TA sur un agitateur de plaque. Après lavage, la seconde solution d'amplification est ajoutée avec un volume de 100µL pendant 30min à TA sur un agitateur de plaque. Après lavage, 100µL de substrat TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, aux absorbances maximales de 370 et 652nm) qui détecte la streptavidine HRP et produit une couleur bleue lorsqu'il est oxydé par le substrat HRP sont ajoutés pendant 10 à 20min à TA tout en vérifiant le développement colorimétrique des échantillons. La réaction a été

stoppée par ajout de 100µL de solution stop une fois que le plus haut standard ait atteint une couleur bleu profond. L'ajout de la solution stop produit alors une couleur jaune. La lecture de l'absorbance des échantillons de la plaque est ensuite réalisée sur le *Varioskan™ LUX multimode microplate reader* à 450nm (Thermofisher).

4. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant l'analyse simultanée de plusieurs caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des cellules telles que la taille, la granularité, les marqueurs de surface ou encore l'homéostasie calcique. La cytométrie en flux est réalisée sur l'appareil LSR-Fortessa X20 (BD-Biosciences) à l'aide du logiciel FACSDiva. L'analyse des résultats est ensuite effectuée sur le logiciel FlowJo (Tree Star).

4.1 Immunophénotypages/marquages extracellulaires

Plusieurs panels de phénotypages ont été mis au point afin de discriminer les différentes sous-populations de cellules leucémiques (Tableau 4) et LT (Tableaux 5 à 7) au sein des lignées cellulaires humaines de LAM et de donneurs sains et atteints de LAM au diagnostic. Il s'agit de discriminer les cellules leucémiques en fonction de marqueurs de surface caractéristiques des CSL et PD-L1, et de discriminer les LT CD8⁺ en fonction de PD-1 et également en fonction de différents marqueurs attestant de leur statut de différenciation. Ces panels sont répertoriés dans les tableaux ci-dessous afin de clarifier les différents fluorochromes utilisés pour chaque protocole. Après rinçage, les cellules sont marquées avec des anticorps conjugués à un fluorochrome dans 100µL de PBS avec 10% de SVF pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les dilutions de chaque anticorps sont également référencées et des isotypes correspondants ont été utilisés à la même concentration finale. Ensuite, les cellules sont rincées et remises en suspension dans du PBS avant d'être analysées par cytométrie en flux ou préparées pour le tri cellulaire.

Anticorps	Dilution	Isotype	Dilution	Fluorochrome couplé	Référence
Anti-CD3 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	1 :100	BV711	Biolegend 400168
Anti-TIM-3 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,5 :100	PE	Biolegend 356604
Anti-HLA-DR humain	1 :100	Isotype igG2b souris	1 :100	BV605	BD Biosciences 563099
Anti-CD34 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,25 :100	APC	Biolegend 400120

Anti-CD38 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	1 :100	BV421	Biolegend 400158
Anti-CD33 humain	0,125 :100	Isotype igG1 souris	0,125 :100	PeCy7	Biolegend 400126
Anti-PD-L1 (CD274) humain	1 :100	Isotype igG2b souris	2 :100	PerCPCy5.5	Biolegend 400338
Sonde de viabilité	1 :1000	-	-	750/777	Biotium 32011, 32011-T

Tableau 4 : Panel de phénotypage des cellules leucémiques. Le panel de tri des cellules leucémiques est similaire mais sans la sonde de viabilité.

Anticorps	Dilution	Isotype	Dilution	Fluorochrome couplé	Référence
Anti-CD3 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	1 :100	BV711	Biolegend 400168
Anti-CD8 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	1 :100	BV421	Biolegend 400158
Anti-PD1 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,25 :100	PE	Biolegend 356604

Tableau 5 : Panel de tri des LT.

Anticorps	Dilution	Isotype	Dilution	Fluorochrome couplé	Référence
Anti-CD3 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	1 :100	BV711	Biolegend 400168
Anti-CD8 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,125 :100	APC	Biolegend 400120
Anti-PD1 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,25 :100	PE	Biolegend 356604
Anti-CD27 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	2 :100	BV421	Biolegend 400158
Anti-CD45RA humain	1 :100	Isotype igG2b souris	1 :100	BV605	BD Biosciences 563099
Sonde de viabilité	1 :1000	-	-	750/777	Biotium

Tableau 6 : Panel n°1 de phénotypage des LT de donneurs sains et LAM afin de déterminer leur statut de différenciation.

Anticorps	Dilution	Isotype	Dilution	Fluorochrome couplé	Référence
Anti-CD3 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	1 :100	BV711	Biolegend 400168
Anti-CD8 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,125 :100	APC	Biolegend 400120
Anti-PD1 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,25 :100	PE	Biolegend 356604

Anti-CD25 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,1 :100	FITC	Biolegend 400108
Anti-CD69 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,3 :100	BV421	Biolegend 400158
Anti-CD57 humain	1 :100	-	-	PE Cf 594	BD Biosciences
Anti-CD28 humain	1 :100	Isotype igG1 souris	0,125 :100	PeCy7	Invitrogen 400126
Sonde de viabilité	1 :1000	-	-	750/777	Biotium

Tableau 7 : Panel n°2 de phénotypage des LT de donneurs sains et LAM afin de déterminer leur statut de différenciation.

4.2 Discrimination des sous-populations à l'aide de l'exclusion de la rhodamine 123

Afin de discriminer les sous-populations cellulaires au sein des lignées KG1 et U937, la sonde fluorescente Rhodamine (Rh123, Sigma-Aldrich, $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 531 \text{ nm}$) est utilisée. L'exclusion de la rhodamine par la cellule confère à cette dernière une propriété de résistance (surexpression de pompes d'efflux membranaires) et lui attribue ainsi un caractère de type cellule souche. La concentration cellulaire est tout d'abord ajustée à une concentration de 10^6 cellules par mL. L'incorporation de la rhodamine par les cellules s'effectue suite à une incubation de 20 minutes à 37°C et à l'obscurité dans un milieu de culture RPMI 1640 contenant de la Rh123 à une concentration finale de $0,1\mu\text{g/mL}$ (phase d'inclusion). Afin d'éliminer l'excédent de sonde, le culot de cellules obtenu après centrifugation est ensuite repris dans du milieu de culture, puis les cellules sont incubées durant une heure à 37°C à l'obscurité dans le but d'exclure la sonde qu'elles ont incorporée (phase d'exclusion).

Le contrôle positif de l'incorporation de la rhodamine par les cellules consiste à conserver les cellules dans de la glace après la phase d'inclusion de 20min afin d'empêcher l'exclusion de la sonde par les cellules et ainsi permettre un signal d'intensité de fluorescence maximal.

Après avoir repris les cellules dans du PBS, l'acquisition est réalisée sur le cytomètre en flux LSR Fortessa x20 (BD-Biosciences) qui permet de mesurer l'intensité de fluorescence de la Rh123. Après exclusion des débris et des doublets cellulaires, les cellules ont été sélectionnées selon le contrôle positif présentant le niveau d'intensité de fluorescence le plus élevé (car absence de phase d'exclusion de la Rh123). Les cellules avec une intensité de fluorescence égale au contrôle positif ont été considérées comme des cellules non souches (Rh123^{high}), tandis que les cellules présentant des propriétés de cellules souches

ont été considérées comme celles ayant exclu la sonde Rh123 et qui présentent donc une intensité de fluorescence inférieure à celle du contrôle positif (Rh123^{low}).

Afin de mieux discriminer les sous-populations des cellules leucémiques présentant un profil de cellules souches CD34⁺ CD38⁻, les anticorps anti-CD34 conjugué à l'allophycocyanine (APC) et anti-CD38 conjugué à la phycoérythrine (PE) ont été utilisés aux concentrations indiquées dans le tableau 4.

4.3 Mesure du statut quiescent des cellules leucémiques en fonction des sous-populations

Le statut quiescent des cellules leucémiques est évalué à l'aide d'une technique qui consiste à marquer la protéine nucléaire Ki67 avec un anticorps anti-Ki67 conjugué au fluorochrome FITC (dilution 1 :100, Abcam). Les cellules sont préalablement fixées au PFA 4% (Paraformaldehyde solution 4%, Sigma-Aldrich) pendant 10min à TA puis lavées et incubées durant 30min à TA avec une solution de saturation/perméabilisation Triton X100 à 0,1% (Sigma-Aldrich) et 10% de SVF complétée avec du PBS. Après lavage, les cellules sont incubées avec les anticorps anti-CD34 conjugué à l'APC et anti-CD38 conjugué au BV421 (les dilutions des anticorps et l'utilisation des isotypes correspondants sont similaires à celles indiquées dans le tableau 4) et anti-Ki67 conjugué au FITC (dilution 1 :100, Abcam) dans une solution de 100µL composée de Triton X100 0,1% et 10% de SVF complétée avec du PBS durant 30min à 4°C et à l'obscurité. Après lavage avec 1mL de PBS et centrifugation, les cellules sont reprises dans un volume de 500µL de PBS puis placées dans la glace avant l'analyse en cytométrie en flux.

La protéine Ki67 étant présente durant les phases actives du cycle cellulaire, cette méthode permet de discriminer les cellules prolifératives exprimant la protéine Ki67 (Ki67⁺) des cellules quiescentes (Ki67⁻) suite à la mesure du seuil de positivité basé sur l'intensité de fluorescence des cellules marquées avec l'isotype (contrôle négatif). Les cellules présentant une intensité de fluorescence inférieure ou égale à un log d'écart du signal maximal du contrôle négatif sont considérées comme des cellules ayant une faible activité proliférative (Ki67^{low}).

4.4 Étude de la concentration calcique intracellulaire des cellules

La cytométrie en flux permet de visualiser en temps réel les variations de concentrations cytosoliques en calcium libre par l'utilisation de la sonde calcique ratiométrique et fluorescente Indo1-AM (acétoxyméthylester, Thermo Fisher Scientific). Le groupement AM

permet à la sonde de diffuser à travers la membrane plasmique. Elle est ensuite retenue dans la cellule sans diffuser à travers la membrane suite à l'hydrolyse du groupement par les estérases endogènes et sa nouvelle forme lui permet alors d'émettre sa fluorescence au sein de la cellule.

La sonde Indo1-AM est une sonde ratiométrique ayant pour longueur d'onde d'excitation 350nm. La forme libre de la sonde émet à 475nm tandis que sa forme liée au calcium cytoplasmique émet à 400nm. Le rapport des intensités de fluorescences émises à 475 et 400nm permet d'estimer les variations de la concentration calcique dans la cellule. Ainsi, le ratio F400/F475 est directement proportionnel à la concentration de calcium cytoplasmique et permet le suivi de la concentration calcique intracellulaire de la population cellulaire étudiée.

Les cellules sont ajustées à la concentration de 10^6 par mL puis chargées avec la sonde à $0,7\mu\text{M/mL}$ de PBS à 37°C à l'obscurité durant 30 minutes. Afin d'éliminer l'excédent de sonde, les cellules se trouvant dans le PBS chargé en Indo1-AM sont centrifugées puis reprises dans 1mL de PBS. À l'aide du cytomètre et de son filtre UV, le flux calcique est mesuré par le ratio F400/475 pendant une cinétique de 13 minutes. Une acquisition de la concentration basale de calcium est effectuée durant les 2 premières minutes, puis $0,4\mu\text{L}$ de thapsigargine (concentration finale $2\mu\text{M}$, Focus Biomolecules) sont ajoutés afin de provoquer une vidange des réserves calciques intracellulaires en bloquant les pompes *Sarco/Endoplasmic reticulum Ca²⁺/ATPase* (SERCA) du réticulum endoplasmique. Après 9 minutes d'acquisition, $1,6\mu\text{L}$ de Ca^{2+} (concentration finale 2mM, Sigma-Aldrich) sont ajoutés afin d'induire une entrée capacitive de calcium due à la libération des stocks causée précédemment par la thapsigargine (Schéma 10).

Les données brutes sont analysées à l'aide du logiciel FlowJo et présentées sous forme de variation du ratio d'intensité de fluorescence F400/F475 en fonction du temps.

Pour calculer le stock calcique du RE, la valeur médiane du niveau basal de calcium a été soustraite à la valeur maximale suite à la vidange du stock calcique du RE après l'ajout de thapsigargine. Afin d'obtenir la valeur de l'entrée capacitive de Ca^{2+} dans la cellule, il s'agit de soustraire la valeur médiane du niveau basal de Ca^{2+} après vidange du stock calcique du RE à la valeur maximale d'entrée capacitive de Ca^{2+} après ajout de Ca^{2+} . Les aires sous la courbe au cours des 3 phases (taux basal de calcium, vidange du stock réticulaire de calcium et entrée capacitive de calcium) ont également été collectées.

Ces données permettent de quantifier la concentration calcique intracellulaire des cellules en fonction des conditions. La discrimination de sous-populations cellulaires est réalisée à l'aide du logiciel FlowJo et une stratégie de sélection de population par le seuil

de positivité des anticorps est appliquée. Ainsi, l'analyse du flux calcique est réalisée en fonction du phénotype Rh123^{low} et Rh123^{high} et en fonction des anticorps anti-CD34 conjugué à l'APC et anti-CD38 conjugué au BV421 utilisés aux concentrations indiquées dans le tableau 4.

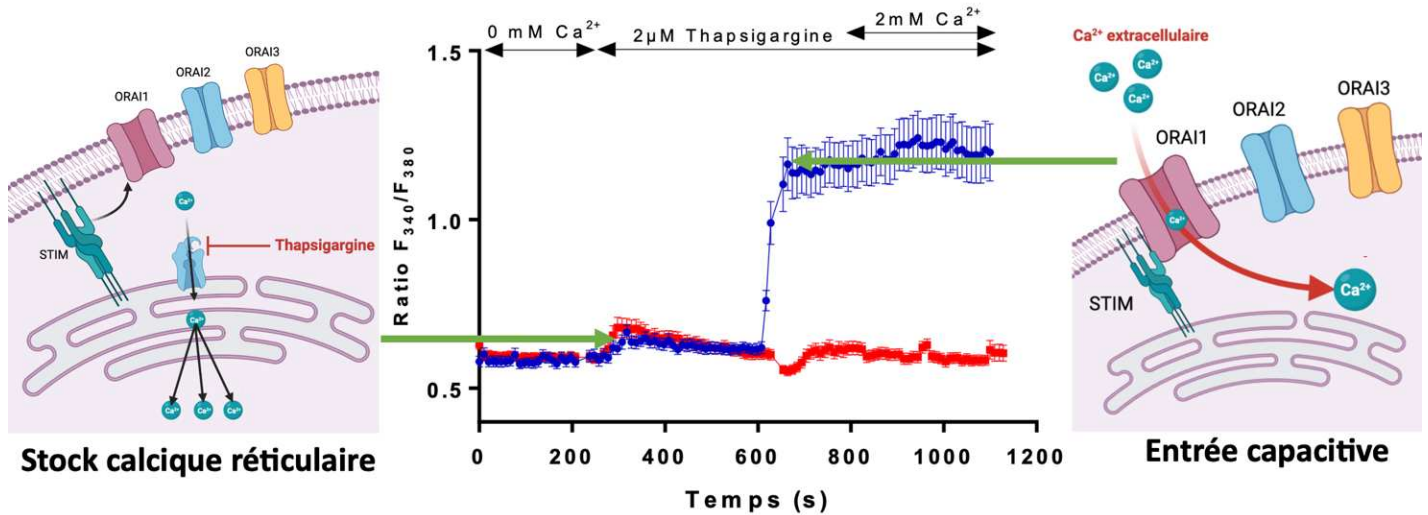


Schéma 10 : Réalisation expérimentale de la cinétique calcique de cellules isolées à l'aide de la thapsigargine et de Ca²⁺ extracellulaire. La concentration calcique basale des cellules est enregistrée pendant les 200 premières secondes avant d'ajouter de la thapsigargine afin d'induire une vidange des stocks calciques. L'ajout de Ca²⁺ extracellulaire à 800 secondes permet d'observer l'entrée capacitive de Ca²⁺ rendue possible par la vidange des stocks calciques provoquée par la thapsigargine.

4.5 Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée pour les différents traitements et sur les différents panels de phénotypages réalisés en utilisant une sonde de viabilité ayant un marquage réactif aux amines (*Biotium Live or Dye™ 750/777 Fixable Viability Staining Kit 32008A*). Après 24h d'incubation en présence des différents traitements ou bien dans le but de réaliser un phénotypage, les cellules sont d'abord lavées au PBS afin d'éliminer le milieu de culture puis marquées avec 1 μL de la sonde de viabilité dans 1 mL de PBS (dilution 1 :1000) pendant 30min à TA et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite centrifugées puis le culot cellulaire est repris dans 1 mL de PBS afin d'éliminer l'excédent de sonde. La sonde réactive aux amines est capable de traverser la membrane cellulaire des cellules mortes pour interagir avec les amines libres dans le cytoplasme. Les cellules vivantes, quant à elles, excluent ce marquage car leur membrane cellulaire est intacte. La fluorescence induite par la liaison de la sonde aux amines des cellules mortes permet de discriminer par cytométrie en flux les cellules mortes présentant une intensité de fluorescence plus forte que celle des cellules vivantes.

4.6 *Évaluation de la lyse cytotoxique suite à la formation de la synapse immunologique entre un LT et une cellule leucémique*

Afin d'évaluer la lyse cytotoxique suite à la formation de la synapse immunologique entre le LT et la cellule leucémique, nous avons utilisé le kit Pantoxilux (Interchim). Pantoxilux est un substrat fluorescent qui a une longueur d'onde d'excitation à 555nm et une longueur d'onde d'émission à 580nm et qui est perméable à la cellule. La sonde permet de discriminer spécifiquement les cellules cibles lors de la formation de la synapse immunologique en détectant les granzymes B et l'activité des caspases responsables de la lyse cytotoxique de ces cellules. Pour cette expérience, les cellules cibles et LT CD8⁺ sont dénombrés afin de les mettre en contact à un ratio 5 LT CD8⁺ pour 1 cellule cible. Après lavage des cellules cibles, celles-ci sont incubées avec la sonde fluorescente TFL4 ayant des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 633nm et 657nm. La sonde TFL4 est utilisée à la dilution 1 :3000 dans du PBS pendant 15min à 37°C à l'obscurité afin de discriminer les cellules leucémiques des LT cytotoxiques lors de l'analyse. Les LT CD8⁺ sont, quant à eux, incubés avec 1 µg ml⁻¹ d'un cocktail de superantigènes (SEA et Tsst-1, Sigma-Aldrich) pendant 45 min à 37°C afin de favoriser la formation de la synapse immunologique. Après lavage des deux types cellulaires, les cellules cibles sont mises au contact des cellules effectrices au ratio indiqué. Les cellules sont ensuite centrifugées puis le milieu est précautionneusement retiré afin de resuspendre les cellules dans 75µL de Pantoxilux. Les cellules sont centrifugées rapidement pendant 30 secondes afin de favoriser le rapprochement des cellules et donc la formation de la synapse immunologique pour induire la lyse cytotoxique, puis sont incubées pendant 1h à 37°C et à l'obscurité. Après incubation, les cellules sont centrifugées, lavées puis reprises dans du PBS avant l'analyse en cytométrie en flux. Les contrôles sont les deux types cellulaires non marqués ainsi que les cellules cibles marquées au TFL4 sans mise en contact avec le substrat fluorescent Pantoxilux.

4.7 *Analyse du cycle cellulaire*

Les cellules de lignées cellulaires de LAM ont été ajustées à une concentration de 10⁶ par mL pour être fixées et perméabilisées avec de l'éthanol à 70% (Sigma) pendant 30 minutes à -20°C. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité avec 50 µg/mL d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich) et 5 µg/mL de RNase (Qiagen) dans du PBS. L'iodure de propidium étant un intercalant fluorescent ($\lambda_{ex} = 535 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 617 \text{ nm}$) de l'ADN, il permet de déterminer la phase du cycle

cellulaire dans laquelle se trouvent les cellules. Pour déterminer le pourcentage de cellules dans la phase G0 du cycle cellulaire, les cellules ont été préincubées avec l'anticorps anti-Ki67 conjugué au fluorochrome FITC (Abcam) à une dilution de 1:100 ou avec l'isotype correspondant à la même concentration finale dans du PBS avec 10% de SVF pendant 30min à 4°C à l'obscurité. Afin de discriminer les sous-populations cellulaires d'intérêt CD34⁺ CD38⁻, les cellules ont également été marquées avec les anticorps anti-CD34 et anti-CD38 conjugués respectivement aux fluorochromes APC et BV421 (dilution 1 :100, avec l'utilisation d'isotypes correspondants comme présenté dans le tableau 4), et anti-Ki67 couplé au fluorochrome FITC dilué au 1 :100^{ème}. Ensuite, les cellules ont été conservées dans la glace jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux.

4.8 Tri cellulaire

Afin d'étudier plus précisément les différences entre le statut de différenciation des cellules leucémiques des lignées cellulaires U937 et KG1, il est question de trier les lignées cellulaires en fonction de l'activité ABCB1 de la population CD34⁺ CD38⁻.

Les cellules U937 et KG1 ont été chargées sur la base du test d'exclusion de la sonde Rh123. Les cellules ont ensuite été lavées et remises en suspension à une concentration de 5×10^6 par mL dans un milieu cellulaire de culture sans rouge de phénol et 1% de SVF (Sigma-Aldrich). Les cellules Rh123^{low} et Rh123^{high} ont été triées sur un cytomètre en flux FACS Aria (BD-Biosciences) sur la base du protocole de test d'exclusion Rh123 établi et les populations ont été déterminées sur la base du contrôle positif chargé avec la sonde Rh123 sans l'étape d'exclusion. Après le tri, les cellules ont été conservées à 37°C avant d'autres traitements et analyses.

Dans le but de réaliser les expérimentations de formation de synapse immunologique et lyse cytotoxique, et ce, en fonction du phénotype des sous-populations de cellules leucémiques et LT CD8⁺, les cellules de patients atteints de LAM au diagnostic sont triées afin d'étudier les sous-populations d'intérêt.

Après décongélation des PBMC de patients, les cellules sont incubées avec les anticorps décrits dans les panels de tri des cellules leucémiques et LT (tableaux 4 et 5) pendant 15min à TA et à l'obscurité dans du milieu cellulaire de culture sans rouge de phénol et 1% de SVF (Sigma-Aldrich). Après lavage, les cellules sont resuspendues dans le milieu cellulaire décrit ci-dessus à raison de 5 millions de cellules par mL en tube Falcon 15 pour le tri cellulaire. Les cellules sont collectées dans des tubes Eppendorf puis remises en culture dans du milieu RPMI-1640 (GlutaMax, Life Technologies) complété avec 1% de pénicilline et

streptomycine et du SVF 10% jusqu'au jour de l'expérience de lyse cytotoxique en cytométrie en flux, ou bien de formation de synapse immunologique en imagerie calcique.

4.9 *Utilisation de billes de compensation pour les panels d'immunophénotypage des cellules*

Des billes de compensation (Invitrogen) ont été utilisées en cytométrie en flux pour établir les différents phénotypes décrits dans les tableaux 1, 2, 3 et 4 et réaliser des matrices de compensation entre les fluorochromes utilisés pour un protocole. Un μL de l'anticorps à compenser est ajouté à une suspension de $50\mu\text{L}$ de billes de compensation avant d'incuber 30min à 4°C et à l'obscurité. Les billes sont ensuite lavées pendant 5min à $600g$ avant de les reprendre dans $300\mu\text{L}$ de PBS dans un tube FACS en polystyrène transparent de cytométrie en flux. Les seuils de positivité ont été déterminés sur la base de la fluorescence du contrôle négatif avec les isotypes correspondants.

4.10 *Calcul du rapport d'intensité médiane de fluorescence*

L'intensité médiane de fluorescence (IMF) est utilisée comme mesure de l'intensité d'expression des marqueurs de surface utilisés pour le phénotypage des cellules. Le rapport IMF est calculé en divisant la valeur IMF de l'anticorps par la valeur IMF de l'isotype spécifique. Une expression positive a été définie comme un rapport IMF $\geq 1,5$ et les valeurs IMF ont été déterminées à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star Inc.) telles quelles : négatif $< 1,5$; faible $< 1,5 -5$; élevé > 15 .

5. Étude de l'homéostasie calcique des LT CD8⁺ et cellules leucémiques à l'aide de l'imagerie calcique et la technologie microfluidique

Toutes les expériences ont été réalisées à 37°C , dans les dispositifs de microfluidique installés dans l'enceinte thermostatée du microscope (Nikon Eclipse Ti2-E). Toutes les 10 secondes, la ou les fluorescences sont excitées par une source UV (*Optoscan Monochromator*, Roper Scientific) et capturées par une caméra CMOS (*photometrics*).

5.1 Fabrication des micro-dispositifs de microfluidique

Les dispositifs de microfluidique sont réalisés par l'équipe collaboratrice du laboratoire SMMiL-E. Ces dispositifs sont composés d'une plaque de polydiméthylsiloxane (PDMS) avec un canal intégré collé sur un support en verre. La dalle de PDMS est fabriquée en deux étapes : fabrication du moule par photolithographie et moulage du PDMS sur les structures fabriquées. Le moule est composé de deux couches de SU8 déposées et structurées sur une plaquette de silicium. La première couche, d'une épaisseur de 1,5 à 2,5 μm , a été créée pour modeler les piliers de support. Le SU8 2002 a été déposé par centrifugation à 3500 rpm pendant 30 secondes sur une tranche de 7 centimètres et exposé avec un système de lithographie sans masque (100 mJ cm^{-2} avec un laser de 375 nm, Heidelberg MLA-150) après une cuisson douce de 2 minutes à 110°C . La deuxième couche, composée de SU8 3010, a été centrifugée à 3000 rpm pendant 30 secondes afin d'obtenir une hauteur de 12 à 14 μm pour capturer les petites cellules. Après une cuisson douce de 1 minute à 70°C suivie de 5 minutes à 110°C , le SU8 photo-résistant a été modelé (220 mJ cm^{-2}). Enfin, la tranche de silicium a été développée dans une solution de révélateur SU8 et cuite au four à 150°C pendant 15 minutes. Comme dernière étape, une fine couche de Téflon a été déposée avec une machine RIE (100 W, C4F6, 30 Sec, Oxford PlasmaPro80) pour faciliter le moulage de la dalle de PDMS. Le PDMS (élastomère de silicone, SYLGARD™), dont le rapport substrat/agent de durcissement est de 10:1, a été versé sur la tranche de silicium avec les structures SU8 après un mélange et un dégazage appropriés. L'épaisseur de la plaque de PDMS a été maintenue à environ 1 mm afin de conserver les réservoirs d'entrée à un volume raisonnable pour l'injection rapide des suspensions cellulaires et autres solutions requises. Le dispositif a été polymérisé à 70°C pendant 5 heures. Le PDMS solidifié a ensuite été décollé et les dispositifs individuels ont été découpés dans des tailles appropriées. Les entrées et la sortie ont été créées à l'aide de poinçons à biopsie (1,5 mm de diamètre pour les entrées d'injection et 0,5 mm de diamètre pour la sortie à connecter aux pompes). La surface inférieure du dispositif a été activée avec un nettoyeur à plasma (Harrick, Hi-level) pendant 5min, collée à une lamelle de verre (0,17 mm d'épaisseur) et cuite à 90°C pendant 30 minutes. La surface supérieure du dispositif a été protégée par du ruban adhésif pendant l'exposition au plasma afin de protéger les propriétés hydrophobes de la surface.

5.2 Préparation des dispositifs pour l'injection des cellules de patients

Les expériences ont été réalisées sur la platine du microscope inversé (Nikon Eclipse Ti2-E) dans un environnement contrôlé (37°C). Le dispositif de microfluidique est connecté

à une pompe à pression (Fluigent, LineUp™ Push-Pull). Avant les expériences, la surface du dispositif de microfluidique a été traitée pour éviter les fixations non spécifiques en injectant 50 mg mL⁻¹ de solution d'acide pluronique (F-127) par la sortie à l'aide d'une pompe à seringue (Kd Scientific) avec un débit initial de 25 µL min⁻¹ pendant 3 minutes, suivi d'un débit de 5 µL min⁻¹ pendant 7 minutes. Ensuite, le dispositif a été lavé avec de l'eau dé-ionisée à un débit de 25 µL min⁻¹ pendant 5 minutes. Après l'étape de traitement de surface, le dispositif a été placé sur la platine du microscope. Les connexions microfluidiques appropriées ont été réalisées et les entrées d'injection ont été scellées à l'aide de minces pièces de PDMS séparées. Le dispositif est donc prêt pour l'expérience et la suspension d'intérêt préparée à une densité déterminée pourra être injectée dans le système afin de réaliser l'analyse fonctionnelle des canaux calciques SOC grâce à un poste d'imagerie dédié.

5.3 *Étude de l'homéostasie calcique de cellules isolées en imagerie calcique*

Afin d'analyser fonctionnellement l'activité des canaux calciques SOCs, les cellules sont préalablement marquées à la sonde calcique fluorescente et ratiométrique Fura-2AM (Interchim). Le groupement AM permet à la sonde Fura-2 de diffuser à travers la membrane plasmique. Elle est ensuite retenue dans la cellule suite à l'hydrolyse du groupement par les estérases endogènes. La sonde est séquentiellement excitée à 340 et 380 nm. Sa forme liée au calcium est excitable à 340 nm, tandis que sa forme libre est excitable à 380 nm. L'émission de fluorescence se fait dans les deux cas à 510 nm. Le rapport des intensités de fluorescences obtenues après excitation à 340 nm et 380 nm (ratio 340/380) permet d'estimer la variation de la concentration calcique au sein de la cellule. Les cellules sont chargées pendant 45 minutes à 37°C et à l'obscurité dans du milieu de culture RPMI sans sérum (phenol red-free, Gibco) avec la sonde à une concentration finale de 2 µM. Les cellules ont ensuite été rincées dans une solution extracellulaire de composition suivante (en mM) : 140 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES (à pH 7,4 ajusté avec du NaOH), 10 Glucose, 1 MgCl₂ et 0 CaCl₂. Les cellules sont ensuite injectées dans le dispositif de microfluidique afin d'être capturées. Une fois les cellules capturées, l'imagerie calcique, qui permet de visualiser en temps réel la variation de la concentration calcique cytosolique des cellules grâce à la sonde calcique Fura2-AM, est réalisée. Les cellules sont constamment perfusées avec la solution extracellulaire décrite ci-dessus à une vitesse constante de 2 µL min⁻¹. Ensuite, une cinétique est réalisée en imagerie calcique. Durant les 200 premières secondes, la concentration basale de calcium des cellules est enregistrée, puis les cellules

sont perfusées avec une solution extracellulaire contenant 2 μM de thapsigargine, un inhibiteur des pompes SERCA. La thapsigargine entraîne la vidange des stocks calciques réticulaires qui est visualisée pendant 400s. Ensuite, à 600s d'acquisition, les cellules sont perfusées avec une solution extracellulaire contenant 2 mM de calcium afin de visualiser l'activité des canaux SOC induite par la vidange du réticulum endoplasmique. En fin d'enregistrement, 10 μM du ionophore calcique ionomycine (Invivogen) sont ajoutés afin de réaliser un contrôle positif permettant de s'assurer de la viabilité des cellules. Le synta66, inhibiteur des canaux calciques SOC ORAI1, a été utilisé à une concentration de 10 μM pour confirmer l'implication de ces canaux calciques dans l'entrée capacitive de Ca^{2+} induite par la thapsigargine.

5.4 *Étude de la réponse calcique des cellules suite à la formation de la synapse immunologique*

Pour l'analyse de la synapse immunologique entre un LT CD8^+ et une cellule leucémique, les LT CD8^+ sont chargés avec la sonde ratiométrique Fura2-AM comme expliqué précédemment et sont également incubés avec 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ d'un cocktail de superantigènes (SEA et Tsst-1, Sigma-Aldrich) pendant 45 min à 37°C.

Les cellules leucémiques, quant à elles, ont dans un premier temps été marquées au Dil (*Vybrant Dil cell-labeling solution*, Invitrogen), une sonde lipophile fluorescente aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 550 et 564nm. Cette sonde est retenue dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire des cellules leucémiques et permet de les discriminer des LT. Cependant, dans le but de permettre l'étude simultanée de la variation calcique cytosolique des deux types cellulaires, les cellules leucémiques ont ensuite été chargées avec la sonde calcique fluorescente Rhod4 ayant des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 523 et 551nm (Abcam) et n'interférant pas avec le signal de la sonde Fura2-AM. L'efficacité de cette sonde calcique Rhod4 n'étant finalement pas adaptée à notre étude de la variation calcique cytosolique des cellules leucémiques, il a finalement été décidé d'utiliser la sonde calcique fluorescente Fluo4-AM ayant des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectivement de 494 et 506nm (Invitrogen). Cette sonde est la sonde apportant les meilleurs résultats jusqu'à présent lors d'une analyse simultanée avec les LT chargés avec la sonde Fura2-AM.

Les LT et cellules leucémiques sont incubés simultanément mais séparément avec les sondes calciques pendant 30min à 37°C et à l'obscurité dans une solution de composition suivante (en mM) : 140 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 10 Glucose, 1 MgCl_2 , et 2 CaCl_2 . Après lavage, les cellules sont comptées puis reprises dans le milieu HBSS avant le début des

expérimentations. Les LT sont injectés en premier puis, une fois les puits occupés par les LT, leur concentration calcique basale est enregistrée pendant 200s. Les cellules leucémiques sont ensuite ajoutées dans le microsystème de microfluidique et l'enregistrement est prolongé pendant 30min afin d'observer la formation de synapses immunologiques. Les évènements précoces de la formation de la synapse immunologique sont observés suite à une réponse calcique de chaque type cellulaire correspondant à une variation du ratio d'intensité de fluorescence de leurs sondes calciques respectives. En fin d'enregistrement, 10 μM de ionomycine sont ajoutés afin de réaliser un contrôle positif qui permet de s'assurer de la viabilité des cellules (Schéma 11).

5.5 Analyses de la réponse calcique des cellules grâce au logiciel MetaFluor

L'acquisition et l'analyse sont réalisées sur le logiciel MetaFluor (*Molecular Devices Corp.*) qui permet d'analyser le ratio d'intensité de fluorescence de la sonde calcique en fonction du temps pour chaque cellule capturée au sein du dispositif. Les méthodes d'analyses divergent en fonction des expérimentations sur cellules isolées ou sur synapses immunologiques.

Concernant les expérimentations sur cellules isolées, il est question d'analyser uniquement la variation de l'intensité de fluorescence de la sonde Fura2-AM. Pour calculer le stock calcique du RE, la valeur médiane du niveau basal de Ca^{2+} a été soustraite à la valeur maximale après l'ajout de thapsigargine. Afin de quantifier l'entrée capacitive de Ca^{2+} dans la cellule, la valeur médiane basale de l'intensité de fluorescence avant l'ajout du Ca^{2+} est soustraite à la valeur maximale de l'intensité de fluorescence après l'ajout de Ca^{2+} extracellulaire.

Les expérimentations de formation de synapses immunologiques permettent de discriminer les deux types cellulaires à l'aide de deux sondes calciques. Tout d'abord nous collectons les informations visuelles qui sont (i) le nombre de LT capturés et (ii) le nombre de paires de cellules formées lorsqu'une cellule leucémique est piégée dans le même puits qu'un LT. Ensuite, grâce aux sondes calciques nous observons la réponse calcique à la fois au sein des LT et des cellules leucémiques attestant de la formation de la synapse immunologique. La valeur d'intérêt est la valeur maximale d'intensité de fluorescence après ajout des cellules leucémiques. Les LT étant chargés avec la sonde calcique ratiométrique Fura2-AM, le calcul est similaire à celui réalisé au cours des expérimentations sur cellules isolées en soustrayant la valeur médiane basale de l'intensité de fluorescence avant l'ajout des cellules leucémiques à la valeur maximale de l'intensité de fluorescence après l'ajout

des cellules leucémiques. Le même calcul est réalisé pour les cellules leucémiques chargées avec la sonde calcique Rhod4 ou Fluo4, à l'exception du fait que ces sondes n'étant pas ratiométriques, il est nécessaire d'éliminer le bruit de fond en réalisant le calcul F/F_0 , F_0 étant la première intensité de fluorescence enregistrée durant la cinétique.

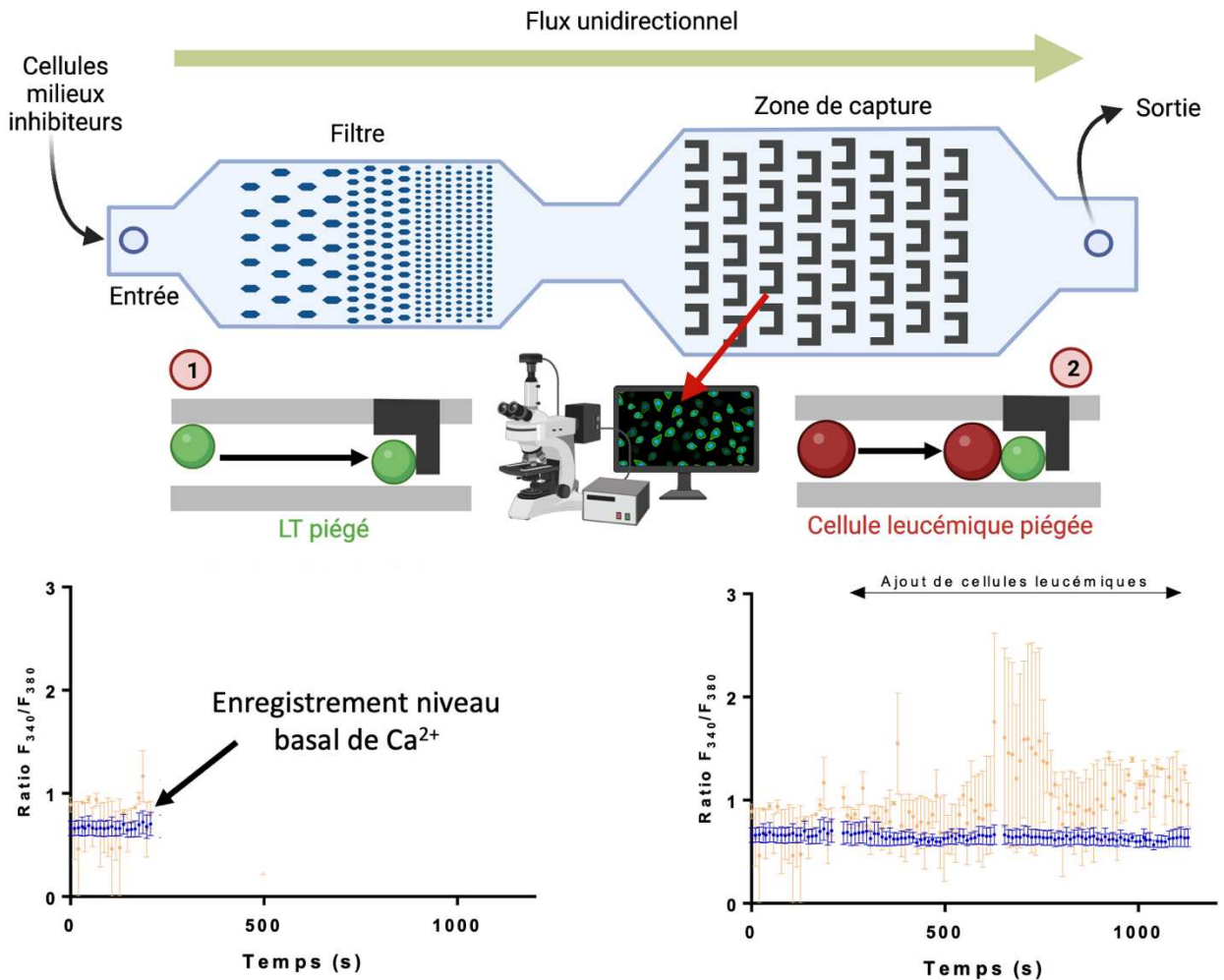


Schéma 11 : Représentation de la capture et de l'enregistrement des cellules lors des expérimentations d'imagerie calcique à l'aide de la microfluidique. Le dispositif est composé d'une zone d'entrée pour l'injection des cellules/milieus/inhibiteurs, une zone composée d'un filtre permettant de retenir les débris cellulaires et séparer les cellules agrégées, une zone de capture des cellules afin de suivre leur activité calcique et une zone de sortie du flux. La zone de capture est constituée d'environ 150 micropuits permettant de piéger les cellules et d'étudier leur mobilisation calcique en temps réel et à l'échelle de la cellule unique. Les LT sont injectés en premiers dans le dispositif de microfluidique. Une fois tous les pièges remplis par les LT, la concentration calcique basale des LT est enregistrée pendant 200 secondes. Ensuite, les cellules leucémiques sont injectées à leur tour afin de former des paires de cellules dans les pièges où se trouvent les LT. L'imagerie calcique permet alors d'observer une réponse calcique attestant de la formation de la synapse immunologique suite à l'entrée en contact des cellules.

6. Étude de l'expression des gènes

Il est question de vérifier la présence des gènes caractéristiques des cellules souches humaines *MMRN1*, *LAPTM4B*, *NYNRIN*, *KLF4*, *SOX2*, *NANOG*, *DNMT3B*, le canal calcique *ORAI1*, le transporteur membranaire *ABCB1* et le gène de référence *BETA2-MICROGLOBULIN (B2M)* (tous fournis par Applied Biosystems) au sein des cellules d'intérêt.

6.1 Extraction des ARN

Les cellules sont reprises dans un tampon RLT composé de 1mL de tampon RLT et 10 μ L de β -mercaptoethanol puis stockées à -80°C. Les ARN sont extraits à l'aide du RNeasy Micro Kit QIAGEN. Après homogénéisation de l'échantillon, les cellules sont lysées dans un tampon permettant d'inactiver les RNases. Les lysats sont ensuite précipités et filtrés sur des colonnes spécifiques permettant de diminuer leur viscosité et de les séparer des autres constituants cellulaires. Un traitement des cellules à l'éthanol froid 70% suivi d'une centrifugation à 12000g pendant 10 secondes permet la précipitation de l'ARN sur la membrane de la colonne. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 15min à température ambiante en présence de DNase (Qiagen, 79254) afin d'éliminer une éventuelle contamination par de l'ADN résiduel. Après 2 lavages successifs, l'ARN pur est finalement élué dans de l'eau RNase-free. La concentration en acides nucléiques est mesurée par spectrophotométrie en utilisant le *Nanodrop* (ThermoScientific) à 260nm et rapportée à la concentration en protéines mesurée à 280nm. Le ratio des densités optiques DO_{260nm}/DO_{280nm} permet d'apprécier la pureté des échantillons.

6.2 Rétro transcription (RT)

Les ARN extraits sont ensuite soumis à une rétro transcription (RT) à l'aide du kit *High Capacity cDNA, Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc). La réaction est amorcée lorsque 1 μ g des ARN totaux est ajouté au MIX composé de tampon 10X, de *Random Primers* (10X), de dNTP (25mM) et de la *reverse transcriptase* d'ADN polymérase ARN-dépendante. Cette RT-PCR est réalisée par l'utilisation du Veriti Thermocycleur avec le programme réalisant l'hybridation à 25°C pendant 10min, suivie de l'élongation à 37°C pendant 2 heures, puis d'un arrêt de la réaction à 85°C durant 2 minutes afin d'inactiver l'enzyme. Enfin, les échantillons sont conservés à 4°C.

6.3 Polymérase Chain Reaction en temps réel (qPCR) par la technique Taqman

La quantification des ADNc par PCR en temps réel est réalisée en duplex à l'aide de la technique Taqman (Thermofisher) afin de discriminer, au sein des échantillons, l'expression des gènes d'intérêt associés à la sonde fluorescente FAM par rapport au gène de référence associé à la sonde fluorescente VIC. Les échantillons de RT-PCR sont distribués dans les puits à une concentration de 10ng/puits avec le MIX contenant l'ADN polymérase (*TaqMan Gene Expression Master MIX* par Applied Biosystems), les amorces sens et anti-sens et de l'eau. La réaction se fait selon le protocole d'amplification qui varie en fonction des amorces utilisées. Il se décompose en 2 étapes principales : l'étape de maintien (2 minutes à 50°C et 10 minutes à 95°C) et l'étape de cycles (15 secondes à 95°C et 1 minutes à 60°C) qui est répétée 60 fois. Les résultats sont analysés avec le logiciel *StepOne Plus* afin de normaliser l'expression relative de nos gènes d'intérêt par rapport à notre gène de référence *B2M* utilisé comme contrôle endogène. Le rapport d'expression relative de chaque gène a été calculé par la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les valeurs calculées représentent le niveau d'expression de chaque gène par rapport à l'expression de *B2M*. L'absence d'expression dénote l'absence de détection dans 50 ng d'ADNc. La spécificité des sondes utilisées envers les gènes humains a été vérifiée en qPCR.

7. Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne). Dans le cas où 3 expériences indépendantes ont pu être réalisées, une différence significative a été évaluée par l'application d'un test *t* de Student ou ANOVA avec, le cas échéant (variance significativement différente), une correction de Welch. Les données et graphiques ont été analysés et réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 7) en considérant $p < 0,05$ comme étant significatif. Ainsi, les figures sont présentées avec la légende suivante :

* : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$

Article n°1

Pairing cells of different sizes in a microfluidic device for immunological synapse monitoring

AVANT-PROPOS

Les LT CD8⁺ étant les cellules effectrices majoritairement impliquées dans la réponse immunitaire antitumorale, un dysfonctionnement de cette réponse immunitaire peut mener à la progression du cancer et à la rechute. Étudier spécifiquement les interactions bidirectionnelles entre le LT CD8⁺ et la cellule cancéreuse permettrait de mieux comprendre la résistance des cellules cancéreuses et le dysfonctionnement des LT CD8⁺ contre ces cellules.

L'étude des cellules tumorales résiduelles/persistantes est une tâche compliquée étant donné la difficulté à détecter, localiser et accéder à ces cellules dans les tumeurs solides. Cependant, les hémopathies malignes permettent, au cours de la prise en charge et du suivi du patient (prélèvement médullaire et du sang périphérique), d'avoir plus facilement accès aux cellules persistantes résidants dans la MO et dans le sang périphérique. La LAM représente ainsi une pathologie cancéreuse qui « facilite » l'étude des cellules tumorales résiduelles chez le patient, mais également tout au long des différents stades de la maladie (diagnostic, MRD, rechute...).

Très peu d'équipes ont étudié *in vitro* la formation de la synapse immunologique entre des LT et des cellules leucémiques de patients. En 2008, l'équipe de Ramsay *et al.* a étudié la formation de la synapse immunologique de LT CD4⁺ et CD8⁺ avec des CPA et des LB issus de patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique en ayant recours à des tris à l'aide de billes magnétiques (Ramsay *et al.* 2008). En 2009, cette même équipe, cette fois représentée par Le Dieu *et al.*, a montré que les LT de patients LAM forment des synapses immunologiques dysfonctionnelles (Le Dieu *et al.* 2009). Bien que cette équipe ait montré l'aspect dysfonctionnel de la formation de synapses immunologiques chez des patients présentant des hémopathies au stade du diagnostic, l'activité calcique des populations lymphocytaires en fonction de leur phénotype ainsi que celui des cellules cibles n'a pas été étudiée. Pour ces études ne travaillant pas sur des sous-populations spécifiques, un nombre conséquent de cellules a été utilisé.

L'hétérogénéité des cellules cancéreuses et des LT selon le stade de la maladie, de même qu'au sein des sous-populations d'intérêt, fait qu'il est nécessaire de réaliser une analyse de la synapse immunologique à l'échelle de la cellule unique. Cette analyse permettrait de caractériser une signature spécifique et déterminer quelle sous-population de cellules leucémiques est résistante à l'action du système immunitaire et/ou potentiellement responsable de la rechute (Khaldoyanidi *et al.* 2021).

Nous avons donc décidé de trier à partir de cellules isolées chez le patient LAM les sous-populations cellulaires d'intérêt, notamment les CSL et non souches exprimant PD-L1 ou non, et les LT CD8⁺ en fonction de l'expression de PD-1. Le nombre de cellules par sous-population était de l'ordre de 10 000 à 80 000 cellules selon les patients.

L'analyse de la signalisation calcique liée à la formation de la synapse immunologique et aux événements cellulaires en découlant (lyse cytotoxique ou résistance, quiescence ou prolifération, ...) a d'abord été réalisée en utilisant une approche expérimentale conventionnelle comme les lames recouvertes de poly-lysine qui permettent d'immobiliser les cellules afin d'analyser leur activité calcique en microscopie. Il était question, dans un premier temps, d'immobiliser les LT préalablement chargés avec la sonde calcique ratiométrique Fura2 afin d'évaluer leur activité calcique. Après un enregistrement de leur activité calcique basale pendant 2 minutes, nous ajoutons les cellules leucémiques préalablement marquées avec le marqueur membranaire Dii pour les discriminer des LT et ainsi observer les cellules leucémiques rentrer en contact avec les LT pour former des synapses immunologiques. Cependant, cette technique est uniquement adaptée pour des expérimentations avec un nombre conséquent de cellules de l'ordre du million car, lors d'expérimentations avec des sous-populations faiblement représentées, et ce même au diagnostic, la probabilité de contact entre un LT et une cellule leucémique est trop faible. De plus, l'ajout des cellules leucémiques entraîne la plupart du temps le détachement des LT à la lame de poly-lysine, ce qui rend l'étude de leur homéostasie calcique difficile (Zhang *et al.* 2016).

Cette technique n'était donc pas compatible avec l'étude des sous-populations rares triées. Il était nécessaire de mettre au point une technique permettant l'étude cellule à cellule de la formation de la synapse immunologique tout en étant capable de faire varier les conditions expérimentales comme la présence ou absence de molécules pouvant apporter des informations importantes sur les interactions entre les cellules. C'est pourquoi notre collaboration avec l'équipe de biophysiciens (SMMiL-E) nous a permis de mettre au point des dispositifs de microfluidique compatibles avec l'imagerie calcique et la microscopie confocale. Les microsystèmes optimisent la capture et le contact de cellules à l'aide de pièges sur-mesure, l'ajout de molécules en temps réel et le contact entre un LT et une cellule leucémique en fonction des phénotypes des deux types cellulaires et ce, même en faible quantité, tout en enregistrant l'activité calcique en temps réel. Ces microsystèmes présentent une plus haute efficacité à capturer les cellules et former des paires de cellules et un contrôle du flux permet d'étudier les cellules dans un environnement contrôlé et surveillé où peuvent être ajoutées diverses molécules d'intérêt.

Bien que l'intérêt pour la microfluidique dans l'étude des cellules immunitaires et cancéreuses soit grandissant, notamment grâce au niveau de précision apporté pour évaluer une multitude de phénomènes biologiques complexes, il existe pour le moment peu d'articles sur la technologie microfluidique dans l'étude de la formation de la synapse immunologique combinée avec l'étude de l'activité calcique des cellules immunitaires.

En 2015, Dura *et al.* ont développé un système de microfluidique pour mettre en contact les cellules une à une et analyser les interactions de lymphocytes dans un environnement contrôlé. Ce contrôle d'entrée en contact des cellules permet d'étudier les événements précoces de l'activité et la réponse immunitaire des LT CD8⁺. Ils ont également montré être capables d'ajouter des réactifs sans risquer de perdre les cellules comme c'est le cas avec les techniques conventionnelles comme la culture sur lames recouvertes de poly-lysine. Ils ont ainsi pu étudier comment différentes conditions microenvironnementales impactent les cellules et ils ont également évalué l'activité et la réponse immunitaire de LT CD8⁺ de souris à l'échelle de la cellule unique. Dans cette étude, l'activité calcique des cellules est étudiée grâce à la sonde calcique ratiométrique Fura-2AM. De plus, la haute efficacité de capture des cellules et de formation des paires montre les bénéfices pour les études où les cellules ne sont pas en nombre suffisant pour les analyses à l'aide de techniques conventionnelles comme la cytométrie en flux (Dura *et al.* 2015).

Enfin, en 2016, la même équipe a montré la formation de synapses immunologiques avec les lignées cellulaires NK92MI et K562. Les NK92MI sont des cellules *natural killer* qui sont cytotoxiques notamment envers les cellules K562, des lymphoblastes, ce qui permet alors d'étudier le phénomène de réponse immunitaire entre ces cellules qui forment une synapse immunologique. Ainsi, la technologie de microfluidique leur permet l'étude de plusieurs paramètres à la fois comme l'étude de l'activité calcique, la sécrétion d'IFN γ et la lyse cytotoxique. Cette équipe étudie l'activité calcique de lignées cellulaires humaines et de LT CD8⁺ primaires de souris en simultanément avec la formation de la synapse immunologique (Dura *et al.* 2016).

A partir de ces études, nous avons donc élaboré, à l'aide de l'équipe collaboratrice, une méthode qui permettrait d'étudier pour la première fois les événements précoces liés à la formation de la synapse immunologique entre des cellules primaires de patients, notamment un LT CD8⁺ et une cellule leucémique à l'échelle de la cellule unique et au sein de sous-populations d'intérêt spécifiquement triées, ce qui n'a encore pas été réalisé auparavant.

Nous avons publié l'article « *Pairing cells of different sizes in a microfluidic device for immunological synapse monitoring* » en 2022 dans le journal *Lab Chip* en collaboration avec les équipes SMMiL-E et U1003 Phycell. Cet article présenté ici valide les expérimentations

permettant de mettre en contact deux types cellulaires de tailles et de phénotypes différents, et à observer un signal calcique de la part des LT. Grâce à la validation de l'utilisation des microdispositifs pour l'analyse fonctionnelle de la formation de synapses immunologiques par les cellules d'échantillons de patients, nous avons pu réaliser des tests sur des LT de donneurs sains et LAM au diagnostic isolés ou mis en contact avec des cellules leucémiques. L'optimisation de capture de paires de cellules a favorisé l'augmentation du rythme des expérimentations sur plusieurs échantillons de patients et nous a permis (i) d'étudier efficacement la réponse calcique de LT isolés ou de paires de cellules, (ii) de favoriser le contact entre un LT et une cellule leucémique en fonction des phénotypes des deux types cellulaires, de (iii) réduire considérablement le nombre de cellules nécessaires pour la formation de la synapse immunologique et (iv) d'ajouter des drogues afin de mieux comprendre les événements de la signature calcique (lyse, formation de la synapse immunologique, signal calcique, ...).

Le défi de notre équipe collaboratrice SMMiL-E a été de mettre au point un dispositif de microfluidique capable de capturer deux types cellulaires différents et de tailles différentes. Pour valider notre méthode, nous avons utilisé des LT humains primaires de donneurs sains et formé des synapses immunologiques avec deux autres types de cellules : les cellules de la lignée cellulaire LAM KG1 et des cellules leucémiques humaines primaires obtenues à partir de patients atteints de LAM.

Dans cet article, l'étude de la signalisation calcique a permis de montrer que les cellules étaient viables après capture dans le dispositif et que les solutions extracellulaires pouvaient être changées en l'espace de quelques secondes, cela en étudiant simultanément la réponse calcique des cellules chargées avec la sonde Fura2.

Cet article montre que les microsystèmes nous permettent d'étudier la réponse calcique des cellules en observant (i) le stock calcique réticulaire grâce à la thapsigargine et (ii) l'implication des canaux SOCs dans l'entrée capacitive de Ca^{2+} en ajoutant du Ca^{2+} extracellulaire ou l'inhibiteur des canaux SOCs synta66. Dans leur ensemble, ces expériences montrent que ces dispositifs sont compatibles avec les études de systèmes biologiques et la modulation pharmacologique.

Enfin, pour déterminer ces dispositifs comme aptes à capturer les cellules différentes et former la synapse immunologique entre les deux types cellulaires, il a été question d'injecter un premier type cellulaire, ici les LT de patients chargés avec la sonde calcique ratiométrique Fura2, puis les cellules cibles, ici les KG1 ou cellules leucémiques de patients marquées avec une sonde membranaire afin de les discriminer des LT. Suite à la formation de paires, il a été possible d'observer des variations de concentration calcique cytosolique

chez les LT, reflétant l'engagement du TCR dans la voie d'activation du LT CD8⁺ qui engendrera ou non la lyse cytotoxique de la cellule cible.

Les résultats montrés dans cet article valident donc notre méthode expérimentale d'étude en temps réel de la signalisation calcique de cellules isolées ou formant des synapses immunologiques à l'échelle de la cellule unique, et ce, pour des populations même faiblement représentées et de tailles différentes. Cette méthode permet de déchiffrer les mécanismes de formation de la synapse immunologique entre les cellules tumorales et les différents types de cellules immunitaires qui jouent un rôle important dans l'élimination des cellules tumorales.

De plus, malgré l'hétérogénéité des interactions entre les cellules immunitaires et cancéreuses causée par leurs propriétés spécifiques, notre méthode permet des études fonctionnelles détaillées au niveau de la synapse immunologique, reflétant la diversité des comportements des cellules immunitaires et des cellules malignes. Le suivi détaillé des interactions au niveau d'une seule paire de cellules pourrait permettre de découvrir des mécanismes clés pour améliorer l'efficacité de diverses stratégies immunothérapeutiques.


 Cite this: *Lab Chip*, 2022, 22, 908

Pairing cells of different sizes in a microfluidic device for immunological synapse monitoring^{†‡}

 Faruk Azam Shaik, ^{ab} Clara Lewuillon, ^{ac} Aurélie Guillemette, ^{ac} Bahram Ahmadian, ^{bd} Carine Brinster, ^{ac} Bruno Quesnel, ^{ac} Dominique Collard, ^{be} Yasmine Touil, ^{*ac} Loïc Lemonnier ^{*fg} and Mehmet Cagatay Tarhan ^{*bde}

Analyzing cell–cell interaction is essential to investigate how immune cells function. Elegant designs have been demonstrated to study lymphocytes and their interaction partners. However, these devices have been targeting cells of similar dimensions. T lymphocytes are smaller, more deformable, and more sensitive to pressure than many cells. This work aims to fill the gap of a method for pairing cells with different dimensions. The developed method uses hydrodynamic flow focusing in the z-direction for on-site modulation of effective channel height to capture smaller cells as single cells. Due to immune cells' sensitivity to pressure, the proposed method provides a stable system without any change in flow conditions at the analysis area throughout experiments. Paired live cells have their activities analyzed with calcium imaging at the immunological synapse formed under a controlled environment. The method is demonstrated with primary human T lymphocytes, acute myeloid leukemia (AML) cell lines, and primary AML blasts.

 Received 21st December 2021,
Accepted 20th January 2022

DOI: 10.1039/d1lc01156a

rsc.li/loc

Introduction

Cell–cell interaction is crucial in the development and function of multicellular organisms. Beyond maintaining tissue homeostasis, understanding how these interactions work provides insightful information on different pathological contexts such as cancers,¹ genetic diseases,² immunological responses,³ and bacterial infections.⁴ They play an essential role in cell behavior and affect how cells migrate, proliferate, and differentiate.⁵

Regarding immunological responses, these interactions during the formation of immunological synapses (IS) between immune cells and their partners or target cells could dictate

cell fate diversity and, therefore, regulation of immune functions.^{3,6} In cancer, innate and adaptive immune responses strongly cooperate in fighting against malignant cells. Among the adaptive immune system, cytotoxic T cells expressing cell-surface CD8 (cluster of differentiation 8) are the most potent effectors in the anticancer immune response and form the backbone of current successful cancer immunotherapies.⁷ Nonetheless, dysfunctional immune responses of the T lymphocytes could lead to cancer progression.⁸ Investigating the bi-directional cell–cell interactions between T lymphocytes and cancer cells would reveal underlying mechanisms of the (i) resistance of cancer cells and (ii) the dysfunctions of T lymphocyte activities against the malignant cells. Heterogeneity of both cancer cells and immune effectors and their interactions is a hallmark of malignant diseases. In hematological malignancies, as in acute myeloid leukemia (AML), the immune biology is even more complex to study because leukemia cells share some immunological characteristics of their normal hematopoietic progenitor counterpart, and interaction may occur in various environments like the bone marrow niche or circulating blood.⁹ Thus, AML is a perfect model to highlight the importance of IS studies. The fine and dynamic monitoring of events (*e.g.*, calcium mobilization) during IS formation highlights key mechanisms ruling cell fate. IS formation will result in events starting from the initial contact between T lymphocytes and leukemic cells and extending over several hours. While these events include

^a University of Lille, Lille, France

^b CNRS, IIS, COL, Univ. Lille SMMiL-E project, Lille, France

^c Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 – Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France. E-mail: yasmine.touil@inserm.fr

^d Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, Junia, Univ. Polytechnique Hauts-de-France, UMR 8520 -IEMN -Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie, F-59000 Lille, France. E-mail: cagatay.tarhan@junia.com

^e LIMMS/CNRS-IIS IRL2820, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

^f Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, France. E-mail: loic.lemonnier@inserm.fr

^g Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Villeneuve d'Ascq, France

[†] Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d1lc01156a

[‡] F. A. Shaik and C. Lewuillon contributed equally to this work. Y. Touil, L. Lemonnier, and M. C. Tarhan share the last authorship.

calcium responses in both cell types, monitoring these responses remains challenging, especially when dealing with primary cells obtained from patients. Indeed, these cells are difficult to obtain in great quantity without adding an extra burden on the patients. Moreover, the heterogeneity of the T lymphocytes and leukemic cells with resistive properties, depending on the stage of the disease, demands IS analysis at a single pair level to characterize IS signatures. Also, analyzing specific conditions requires certain subpopulations of T lymphocytes and leukemic cells, which uses a limited number of cells from patients for analysis, thus limiting the use of conventional observation methods such as flow cytometry.

Conventional methods such as bulk coculture systems¹⁰ and poly-L-lysine-coated coverslips¹¹ show significant limitations. These systems have no control over forming cell pairs.¹² Low efficiency in pairing is inevitable, and single-cell pairing is only possible by chance. Such systems can provide information at the population level but will miss crucial single-cell responses to monitor the heterogeneity among cells.¹³ Precise information on the nature of the contact, *e.g.*, duration and cells forming the contact, is essential to analyze the cellular response. In addition, observing the response under different experimental conditions, *e.g.*, absence or presence of specific ions or molecules, provides valuable information to characterize the interaction at an IS. It is clear that conventional methods are inadequate for a detailed analysis of the immune response between two cells in contact, and alternative techniques providing high control on cell pairing are required.

Microtechnologies, *e.g.*, micro-wells^{14–16} and droplet-based systems,^{17–19} attempted to overcome some of the limitations the conventional methods. Although these approaches improved performance over the conventional ones, they still have significant limitations on the spatial and temporal control over the contact, making sensitive analysis of early events unfeasible. The resulting low-throughput format leads to low spatiotemporal resolution.²⁰ Another impractical point is the lack of control over the environmental conditions, which restricts multi-step assays, *e.g.*, staining, washing, and drug testing. On the other hand, microfluidic systems provide practical solutions to major limitations. Due to the better handling capabilities, physical traps define precise positions of cell pairs,²¹ and controlling the flow in a microfluidic channel brings pairs in contact within a given time interval. Paired cells are monitored in a controlled environment by exchanging the solution in the channel. Elegant designs exhibit high efficiency in forming pairs of single cells by (i) applying a bi-directional flow to fill surrogate capture sites prior to the pairing step^{22,23} or (ii) inducing a lower flow rate for cells positioned at the narrow entrance of a trap before captured inside with a higher flow rate.²⁴ A dense trap geometry allows a massive number of pairs to be formed in parallel without compromising single-pair monitoring. However, despite all demonstrated functionalities, these techniques still exhibit a critical

limitation on the dimensions of the cells to pair. When physical traps are used, efficient pairing performance is available only for cells with similar dimensions. As a critical part of IS, T lymphocytes are significantly smaller than many other cells, *e.g.*, one-third of the size of stem cells.²³ Cells with significant size differences can cause pairs formed with multiple cells. Developing the channel and trap design for the larger cell can capture smaller cells, *e.g.*, T lymphocytes, in doublets or triplets due to the height of the channel and traps. As a result, an alternative method, which is practical and efficient enough to work with patient samples, is needed to pair single cells of different dimensions.

Here, we develop a method to pair non-adherent cells having different dimensions without compromising the benefits of microfluidics. We specially designed physical traps to bring different types of cells in contact. Trap positions provide the exact locations of pairs formed in a given time. Continuous monitoring allows real-time measurements of the early and late events in a controlled environment. Cell pairing of different sizes is based on on-site channel height modulation and a 3D trap design capturing smaller cells only at the channel bottom so that the higher part of the channel is designed for capturing larger cells. The on-site channel height modulation ensures that small cells stay at the bottom of the channel through hydrodynamic flow focusing in the *z*-direction. The method is suitable for analyzing patient samples due to the simple unidirectional flow protocol reducing required steps after sample insertion and minimizing possible cross-contamination. To validate our method, we used primary human T lymphocytes from healthy donors and formed IS with two cell types, KG1 and primary human blasts obtained from acute myeloid leukemia (AML) patients, while monitoring Ca²⁺ responses in T lymphocytes.

Experimental

Fabrication

The microfluidic device is a PDMS slab with embedded channels bonded on a glass coverslip. The PDMS slab is fabricated in two steps: fabrication of the mold by SU8 photolithography and PDMS molding on the fabricated structures.

The mold had three SU8 layers deposited and patterned on a silicon wafer. The first layer having 1.5–2.5 μm of thickness was created to pattern supporting pillars. SU8 2002 was spin-coated at 3500 rpm for 30 s on a 3 inch wafer and exposed with a maskless lithography system (100 mJ cm^{-2} with a 375 nm laser, Heidelberg MLA-150) after a soft bake of 2 minutes at 95 °C. The wafer was then post-baked for 2 minutes at 95 °C. The second layer, SU8 2005, was spun at 600 rpm for 30 s to have 4–6 μm of height for capturing small cells. After a soft bake of 1 minute at 65 °C followed by 2 minutes at 95 °C, the photoresist was patterned (120 mJ cm^{-2}). The exposed wafer was baked for 1 minute at 65 °C followed by 2 minutes at 95 °C. The last layer was 12–14 μm

of height. SU8 3010 photoresist was spun at 3000 rpm for 30 s, baked for 1 minute at 65 °C followed by 10 minutes at 95 °C, and exposed to UV light of 220 mJ cm⁻². Following the third layer exposure, the wafer was post-baked at 1 minute at 65 °C followed by 5 minutes at 95 °C, developed in a SU8 developer solution and hard-baked at 150 °C for 15 minutes. As the last step, a thin layer of Teflon was deposited with an RIE machine (100 W, C₄F₈, 30 mTorr, 30 s, Oxford PlasmaPro80) for easy molding of the PDMS slab.

PDMS, having a 10:1 ratio for base elastomer:curing agent, was poured on the silicon wafer with SU8 structures after adequate mixing and degassing. The thickness of the PDMS slab was around 1 mm to keep the inlet reservoirs at a reasonable volume for rapid injection of the cell suspensions and other required solutions. The device was cured at 70 °C for 5 hours. The solidified PDMS was then peeled off, and individual devices were cut into proper dimensions. The inlets and the outlet were created using biopsy punchers (1.5 mm diameter for primary inlets and 0.5 mm diameter for the auxiliary inlet and the outlet to connect to pumps). The bottom surface of the PDMS slab was activated with a plasma cleaner (Harrick, Hi-level, 5 minutes), bonded to a glass coverslip (0.17 mm thickness), and baked at 90 °C for 30 minutes. The top surface of the device was covered with tape during the plasma exposure to protect the hydrophobic surface properties.

Setup and protocol

Experiments were performed on an inverted microscope stage (Nikon Eclipse Ti2-E) in a controlled environment (*i.e.*, 37 °C). A confocal microscope (ZEISS LSM 880) was used for monitoring side views of cell pairs. The microfluidic device was connected to a pressure pump (Fluigent, LineUp™ Push-Pull) with two control units. One of the controllers was connected to the outlet and the other to the auxiliary inlet. Each controller had a dedicated flow sensor (Fluigent, FLU-M-D), allowing precise control of the flow rates of the injected and withdrawn liquid.

Prior to experiments, the microfluidic device surface was treated to avoid non-specific attachments by injecting 50 mg ml⁻¹ pluronic (F-127) solution from the outlet using a syringe pump (Kd Scientific) with an initial flow rate of 25 μl min⁻¹ for 3 min, followed by 5 μl min⁻¹ for 7 min. Then, the device was washed with deionized (DI) water. Water was inserted *via* the primary inlets while the outlet pump was working in the withdraw mode at 25 μl min⁻¹ for 5 min. Finally, the device channels were filled with culture medium injected *via* primary inlets while being withdrawn at 25 μl min⁻¹ for 5 min. The washing step with water was essential to prevent aggregate/crystal formation when pluronic solution and media were mixed. While performing this surface treatment step, we used a surrogate PDMS layer (thin layer with 1.2 mm diameter openings) aligned with the primary inlets to keep the hydrophobic surface properties of the device's top surface. This step was crucial for efficient sample solution

injection at the inlets during the experiments by preventing spread on the surface. After the surface treatment step, the device was placed on the microscope stage, proper microfluidic connections were made, and injection inlets were sealed with separate thin PDMS pieces.

The first step of the experiments was to capture cell type 1 (smaller cells), *i.e.*, T lymphocytes. After removing the seal over primary inlet 1, 5 μl T lymphocyte suspension was dropped at the inlet 1 while the outlet flow was set to -2 μl min⁻¹ and the auxiliary inlet flow to 1 μl min⁻¹. Depending on the patient sample conditions, the flow rates were decreased to -1 μl min⁻¹ and 0.5 μl min⁻¹, respectively when cells were smaller or softer. The auxiliary inlet pushed T lymphocytes down to the channel bottom and provided single-cell capturing at the specifically designed trap layer, *i.e.*, layer 1. After 5 minutes of flow, we increased the auxiliary inlet flow to 2.5 μl min⁻¹ to prevent cell arrival at the trapping area and clean the channel without changing the flow conditions on the trapped cells. Then, the seal of primary inlet 2 was removed, and the primary inlet 1 was sealed. Similar to the first step, 5 μl of cell type 2 (KG1 cell lines) were dropped on inlet 2, and the auxiliary inlet was turned OFF due to the larger size of these cells. As the row and column spacing were designed according to cell type 2, these cells showed higher efficiency in capturing. Over 80% of the cells were paired after 3 minutes of flow. For long monitoring sessions, the auxiliary inlet can be turned ON (2.5 μl min⁻¹) to seal the trapping area, or the flow can continue in the case of patient samples as such cases might not have the expected concentration levels. The trapping area was monitored with Ca²⁺ imaging protocol using the Fura 2 ratiometric calcium dye throughout the experiment. If post-pairing actions were required, the seal of primary inlet 3 was removed, and primary inlet 2 was sealed while the auxiliary flow was at 2.5 μl min⁻¹. Paired cells could be exposed to any drugs or other solutions injected *via* primary inlet 3 after stopping the auxiliary flow. A demonstration was performed to stain the cytoskeleton after pairing.

Finite element fluidic modeling

The finite element method (FEM) was used to model and optimize the device. The microchannel geometry was drawn on COMSOL Multiphysics v.5.5 platform. The geometry used for the simulations was identical to the actual device. The user-defined proper meshing was optimized to reduce the simulation error and minimize the simulation time. Coarse or extremely coarse meshing introduces error in the results, while extremely fine meshing takes long simulation time and memory. The geometry-dependent selective meshing (position dependent) helps to improve the result in a time-efficient manner. The fluid velocity fields were simulated using the Navier-Stokes equation for an incompressible Newtonian fluid,

$$\rho \left[\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} \right] = -\nabla p + \mu \nabla^2 \mathbf{v} \quad (1)$$

$$\nabla \cdot v = 0 \quad (2)$$

where v is the velocity (m s^{-1}), p is the pressure (Pa), ρ is the density (kg m^{-3}), μ is the viscosity ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$), and t is the time (s). The device wall boundaries had no-slip conditions, and all the velocity conditions followed the experimental protocols.

Channel height modulation was verified using the transport of the dilute species module and the Laminar flow module for the fluid velocity profile simulation. Primary inlet and auxiliary inlet solutions were simulated as fluids containing different concentrations. The parametric sweep study condition was chosen for auxiliary and outlet to alter the flow condition, thus different flow ratio (r) as in Table 1.

The species concentration was monitored inside the microfluidic channel using convection–diffusion equation,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c - u \cdot \nabla c \quad (3)$$

where c is the concentration (mol m^{-3}) and D is the diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). The auxiliary inlet and the primary inlet fluid concentrations were set to 0 and 1 mol m^{-3} . The diffusion concentration was chosen as $10^{-9} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Water was the working fluid for all the simulations.

Cell culture and preparations

KG1 acute myeloid leukemia cell line was purchased from ATCC® (CCL-246™). This cell line was cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 1% penicillin streptomycin antibiotic cocktail (Gibco) and 10% of fetal bovine serum (FBS) (Gibco). Healthy T lymphocytes and AML blasts were obtained from peripheral blood samples prepared by the French National Blood transfusion service (France) and Lille Hospital, respectively. PBMC were separated by Ficoll–Hypaque density gradient centrifugation, and CD8⁺ T cells were negatively selected using the EasySep Human CD8⁺ T Cell Isolation Kit and magnetic separation columns (Stem Cell Technology). AML blasts were isolated from peripheral blood after Ficoll separation and after lymphocyte depletion using immunomagnetic negative selection (CD3 for T-, and CD20 for B-lymphocytes). For microfluidic assays, samples were treated with DNase (50 U ml⁻¹) to prevent long DNA segments from sticking in the device. Before injecting into

the device, the cells were filtered through nylon mesh with 30 μm pore size (MACS® SmartStrainers) to eliminate any remaining aggregates. Cells were stained with membrane dyes DiI and DiO (Life Technologies) for pairing efficiency experiments following the manufacturer's instructions. The local ethics committee approved all studies, and all healthy and leukemia suffering patients signed an informed consent (EFS, CHRU de Lille, Tumorothèque du C2RC, approval numbers CSTMT079 and PLER/2021/005).

Cell stimulation protocols

Ionomycin stimulation was performed by perfusing ionomycin (Invivogen) at 10 μM final concentration. Antibody stimulations were performed by pairing CD8⁺ T cells with anti-CD3/CD28-coated microbeads (ThermoFischer Scientific). For SOC channels activity experiments, thapsigargin (focus biomolecules) was added at 2 μM final concentration, and then a 2 mM Ca²⁺ solution was subsequently injected 6 minutes later. Calcium channel inhibitors Synta66 (Sigma Aldrich) and BTP2 (Abcam) were added at a final concentration of 10 μM to assess the implication of SOC calcium channels in the thapsigargin-induced calcium entry.

For the cell pairing experiments, first, allogenic healthy CD8⁺ T lymphocytes were activated by anti-CD3/CD28 beads at a 1:1 ratio for 3 days and cultured 7 days with 30 U ml⁻¹ of human recombinant IL-2. Activated allogenic healthy CD8⁺ T lymphocytes were subsequently pulsed with or without 1 μg ml⁻¹ of a cocktail of superantigens (SEA and Tsst-1; Sigma-Aldrich) for 30 min at 37 °C and AML blast cell was stained with membrane dye DiI (Thermo Fischer Scientific) before cell–cell pairing experiments.

Calcium imaging

Ratiometric dye Fura-2/AM (Interchim) was used as a Ca²⁺ indicator. Cells were loaded in serum-free RPMI 1640 (phenol red-free; Gibco) at 37 °C and 5% CO₂ for 45 min. Cells were washed in RPMI 1640 by centrifugation and then resuspended in an extracellular solution containing (in mM): 140 NaCl, 5KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 glucose, 10 Hepes (pH 7.4 adjusted with NaOH). A similar solution devoid of calcium (0 Ca²⁺) was used during the imaging experiments, as indicated in the text and figures. All experiments were conducted at 37 °C in microfluidic devices installed on a microscope stage (Nikon Eclipse Ti2-E). Every 10 seconds, fluorescence was alternatively excited at 340 and 380 nm with an Optoscan monochromator (Roper Scientific) and captured at 510 nm by a CMOS camera (photometrics). Acquisition and analysis were performed with the MetaFluor software (Molecular Devices Corp.).

On-chip actin staining and imaging

Actin filament staining was performed on the chip by adapting the manufacturer's protocols. After washing with PBS, cell pairs were fixed in 10% neutral buffered formalin

Table 1 Flow conditions for the channel height modulation simulation

Auxiliary flow (μl min ⁻¹)	Outlet flow (μl min ⁻¹)	Flow ratio (r) (Auxiliary : outlet)
0	2	0
0.5	2	0.25
1	2	0.5
1.5	2	0.75
2	2	1
2.5	2	1.25

for 10 min, rewashed with PBS, and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 for an additional 10 min. Cells were rewashed with PBS before adding phalloidin-488 dye solution for actin filaments staining. Cells were imaged at corresponding wavelengths with an inverted fluorescence microscope.

Results and discussion

Device design and optimization

Microfluidic systems provide practical solutions to investigate early signaling events of heterogeneous cell-cell interaction of single-cell pairs. These solutions allow analysis in a

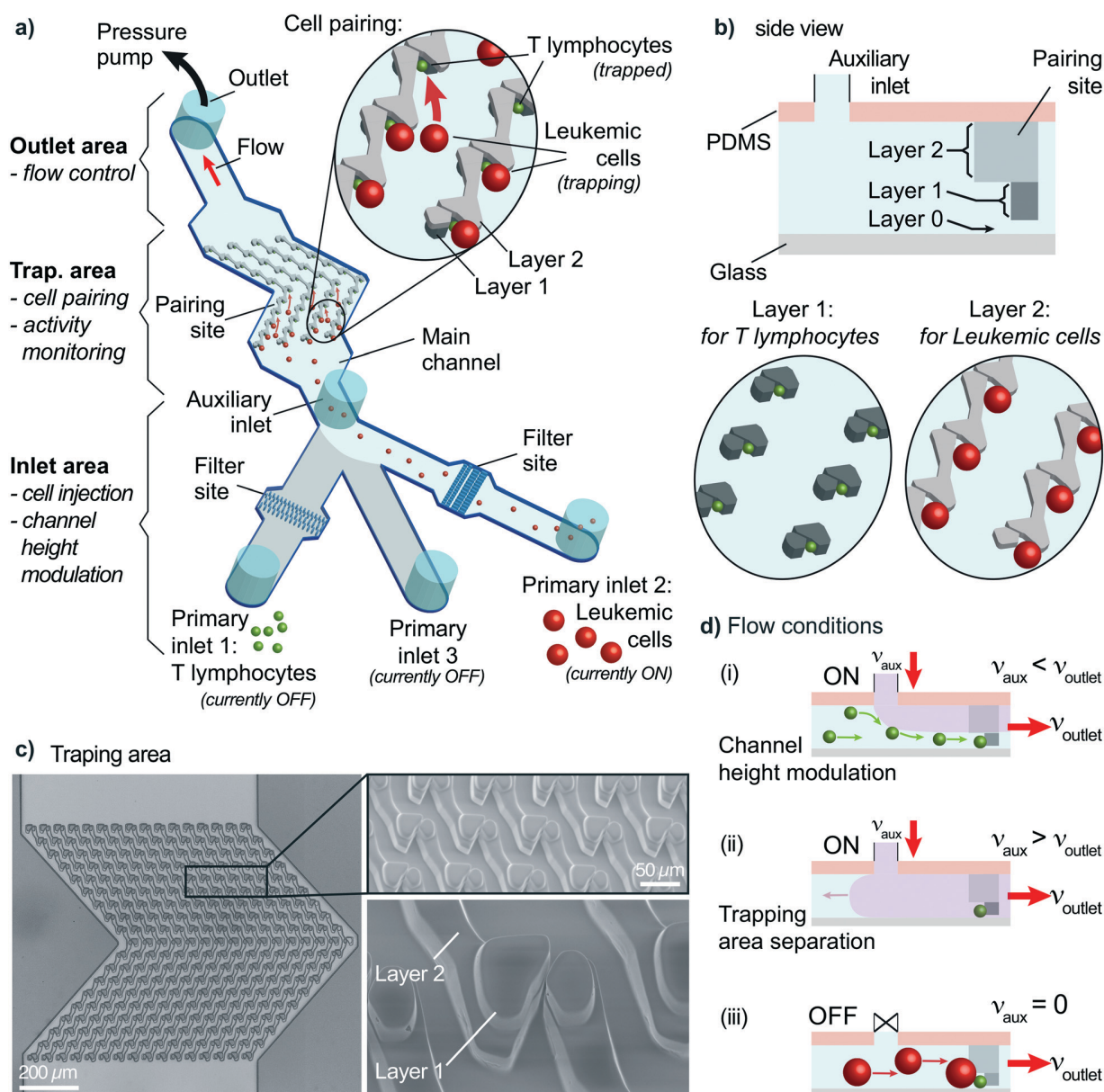


Fig. 1 Overall view of the proposed method. **a)** The device has three areas: inlet area for cells/drugs injection and channel height modulation, trapping area for cell pairing and activity monitoring, and outlet area for flow control. A multi-layer PDMS device captures T lymphocytes (layer 1) and leukemic cells (layer 2) at the pairing sites. First, T lymphocytes are injected via primary inlet 1 and captured using auxiliary and outlet flows at the trap site. Then, primary inlet 2 is turned ON (others OFF), allowing layer 2 walls to guide leukemic cells to form pairs as demonstrated schematically. **b)** A side view of the device schematics demonstrates three layers: layer 0 for helping T lymphocytes capture at layer 1, and layer 2 walls directing leukemic cells to a pairing site. **c)** Brightfield image (left) and SEM images (right) show the trapping area and a close-up view of a trap with two layers on the PDMS device. **d)** The auxiliary inlet provides three flow conditions: (i) for channel height modulation, auxiliary flow is lower than the outlet flow allowing single-cell capturing of smaller cells. (ii) For separating the trapping area from the inlet area, auxiliary flow is set to a value higher than the outlet flow. This condition is used when changing the inlet in use. (iii) For allowing larger-cell capturing, the auxiliary flow is set to zero. The outlet flow, and thus, the flow condition in the trapping area, is set to a constant value throughout the experiments to minimize the mechanical stimulation of cells.

controlled environment with remarkable spatial and temporal controls. The critical requirement for such practical solutions is having complete control over the cell handling process. Cells must be positioned at predefined locations, and pairs must be formed within a limited time. These steps must be observed in real-time to measure cellular activity, *e.g.*, monitoring intracellular Ca^{2+} concentrations using ratiometric dyes with fluorescence microscopy. Therefore, the proposed design uses specially designed physical traps on a glass coverslip to pair cells while monitoring fluorescence throughout an experiment.

The microfluidic device is a fabricated PDMS slab placed on a coverslip. The device has three parts (Fig. 1a): an inlet area, an outlet area, and a trapping area. Inlet and outlet areas are used for cell handling by injecting a cell suspension in the channel and controlling the flow. The trapping area is crucial because both cell pairing and the activity measurements are performed in this area.

The inlet area has three primary inlets for cells or drugs injection and an auxiliary inlet for on-site channel height modulation. Two primary inlets are assigned to the two types of cells to pair. The remaining primary inlet is required when post-pairing actions are taken, *e.g.*, setting specific environmental conditions, staining, and drug insertion. These inlets are not connected to any pumps and allow direct injection of solutions into the channel to improve the practicality and provide rapid responses. The inlets are sealed to prevent cross-contamination and opened only during sample insertion (Fig. S1†). The auxiliary inlet is connected to a pressure pump with precise control of the induced flow. The sub-channels of primary inlets merge into the main channel before reaching the auxiliary inlet. An essential element of the inlet area is the filter site. Each cell-injection primary inlet has a cell-size specific filter area before the main channel (Fig. 1a and S2†). This filter prevents cell or debris aggregates from reaching the trapping area and clogging the channel.

The outlet area connects the main channel to a pressure pump to control the flow. The pump is first used to fill the channel prior to the experiments. After surface treatment, the channel is filled with a buffer solution (or media) until all air bubbles are removed from the channel using the “injection” mode (positive pressure). The second use of the pump is to control the flow in the “withdrawn” mode (negative pressure) to provide a unidirectional flow. Flow sensors connected to pumps provide precise monitoring and control of the constant unidirectional flow applied throughout the experiment.

The trapping area is the most critical part of the device, where cells are paired and monitored for analysis. An array of 3D traps is fabricated in the PDMS structure with dedicated layers for each cell type. There exist three layers (Fig. 1b). The first one (layer 0) at the bottom has a 2 μm height without any structures except for several columns maintaining structural integrity. The next layer (layer 1) captures cell type 1 (smaller cells) during the unidirectional flow from the

primary inlet 1 to the outlet. Layer 1 structure starts from 2 μm until 8 μm above the bottom surface for capturing T lymphocytes. Traps are formed of two parts on each side of a narrow opening (Fig. 1b and c) to provide a flow path for cell capture. A second cell following the first one is forced to take another flow path as the narrow opening was blocked (demonstrated with velocity profile simulations; Fig. S3†). The channel height modulation is critical for cell type 1 (smaller cells) to be kept at the bottom surface for avoiding multiple cells captured on top of each other because the height of the trap can accommodate multiple cells (Fig. 1d). The last layer (layer 2) is designed as a wall from 8 μm height to 20 μm height to affect only cell type 2 (larger cells) (Fig. 1d). The wall is designed to have an angle (45°) with the initial flow direction to direct larger cells specifically to the pairing positions (Fig. 1a and S4†). The angle is reversed for the later part of the assay to improve the capture rate, which results in a >-shaped array (Fig. S4†). Due to its small size, cell type 1 is not affected by layer 2 and can move under the wall structures, while the auxiliary flow is used for height modulation. The formed pair has a contact plane perpendicular to the visualization plane, allowing fluorescence imaging of each cell.

The trapping array is formed with specific spacing between each row and column. The array must be designed according to the size of larger cells, *i.e.*, cell type 2, to prevent clogging. As a trade-off, the capturing efficiency of the smaller cells, *i.e.*, cell type 1, decreases due to trap-site density being scarce for the size of cell type 1. Experimental evaluation showed that an optimum row spacing corresponds to ~ 2 times and the column spacing to ~ 1.4 times the cell diameter (cell type 2) (Fig. S5†). In the demonstrations, we used primary human CD8^+ T lymphocytes (5–8 μm in diameter) and KG1 AML cell line (12–18 μm in diameter). Thus, the row and column spacings were chosen as 30 μm and 20 μm , respectively.

On-site channel height modulation

On-site channel height modulation is essential for providing pairs of single cells from each cell type. As the device must be designed with a height suitable for the larger cells (cell type 2) to avoid clogging, active on-site control is needed for adjusting the channel height for smaller cells (cell type 1) to sustain single-cell pairing without compromising practicality. We integrate the auxiliary-inlet 3D hydrodynamic focusing flow²⁵ with the outlet cell handling flow when channel height is modulated. Positioned between primary inlets and the trapping area, the flow introduced at the auxiliary inlet forms a laminar flow pushing the injected type 1 cells (*via* inlet 1) to the bottom surface for trapping at the capture sites (Fig. 1d-i). This effective channel height can be modulated by collective control of the auxiliary inlet and outlet flow (Fig. 2a and S6†).

The relation between the auxiliary inlet flow and the outlet flow plays a critical role in single-cell capturing for cell type 1

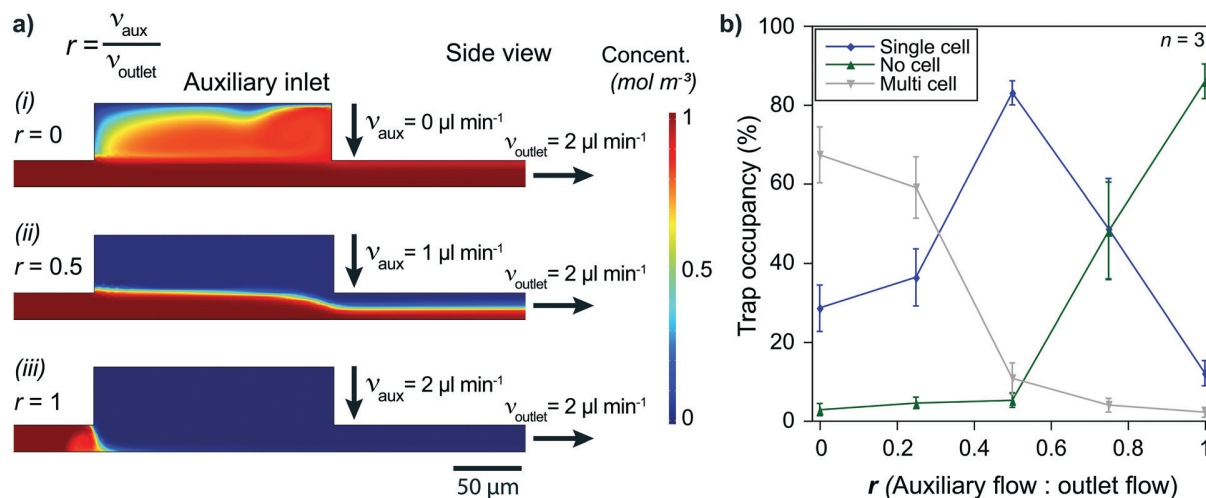


Fig. 2 Single-cell capturing requires optimized flow conditions. a) Simulations show that solutions injected at the primary inlets can (i) cover all the trapping area ($r = 0$), (ii) flow only at a limited height above the surface ($0 < r < 1$), or (iii) be blocked at the auxiliary inlet ($r = 1$) by selecting auxiliary and outlet flows appropriately. b) Low auxiliary flow condition ($r \sim 0$) results in multiple T lymphocytes being captured in a single trap. On the other hand, high auxiliary flow ($r \sim 1$) prevents cells from moving to the trapping area and causes the vast majority of the trap sites to stay unoccupied. The auxiliary flow being around half of the outlet flow ($r \sim 0.5$) is optimum, resulting in $>80\%$ of the trap sites being filled with single T lymphocytes.

(smaller cells). We demonstrated the effect of on-site channel height modulation with primary human CD8⁺ T lymphocytes from healthy donors. When we did not use any auxiliary flow, only $\sim 30\%$ of the trap sites were occupied with single T lymphocytes. The vast majority of the traps ($\sim 70\%$) had multiple cells because the channel was too high for these small cells to capture as single cells. While keeping the outlet flow constant, increasing the auxiliary flow rate improved the single-cell capturing percentage. The auxiliary flow being half of the outlet flow (flow ratio, $r = 0.5$) provided the optimum condition with a single cell trapping rate being $>80\%$ and a multiple-cell trapping rate being $\sim 10\%$. Further increase in the auxiliary flow decreased the effective channel height preventing T lymphocytes from reaching the trapping area, resulting in fewer single-cells captured and increased empty traps (reaching $\sim 90\%$ for $r = 1$). Therefore, for the given channel configuration, T lymphocyte experiments used half of the (withdrawn) outlet flow as the (injected) auxiliary flow (Fig. 2b).

Besides the single-cell capturing capability, the auxiliary flow could practically separate the trapping area from the inlet area. This separation helped stability when switching from using one primary inlet to another. Among three primary inlets, we used only one of them at once to provide practicality and prevent cross-contamination between inlet channels. Therefore, we sealed injection inlets with PDMS pieces when they were not used. Physically opening and sealing the primary inlets caused pressure fluctuations which could remove the captured cells from the traps. The auxiliary flow prevented any pressure fluctuation at the inlet area affecting the trapping area and separated them by making effective channel height zero (auxiliary inlet flow \geq outlet flow, *i.e.*, $r \geq 1$, Fig. 1d-ii and S6†). As the outlet flow, and

thus, the flow at the trapping area did not change, the captured cell condition stayed constant throughout the experiment.

Single-cell capturing

Cell pairing was performed between two cell types which required independent single-cell capturing of two different cell types at specific positions. Small type 1 cells were captured using the outlet and auxiliary flows, while type 2 cells were captured only with the outlet flow (Fig. 1d).

Single-cell capturing of the smaller cells was demonstrated with primary human CD8⁺ T lymphocytes obtained from healthy donors. T lymphocytes with a concentration of $150\,000 \text{ cells ml}^{-1}$ were injected into a fabricated device. The effect of the channel height modulation on single-cell capturing was investigated by comparing different pump configurations. An outlet flow rate of $2 \mu\text{l min}^{-1}$ was applied on the microfluidic device using a syringe pump (Kd Scientific) and a pressure pump (Fluigent, LineUp™ Push-Pull). These conditions were compared with a combined auxiliary and outlet flow case with $1 \mu\text{l min}^{-1}$ auxiliary and $2 \mu\text{l min}^{-1}$ outlet flow rates (flow ratio, $r = 0.5$ for auxiliary:outlet flows to stay in the optimum range). The results showed a clear improvement over the no auxiliary conditions after a 5 minute flow (Fig. 3a). Both syringe and pressure pumps showed similar results: only $\sim 25\%$ of the traps were occupied with single cells, and double, triple, and quadruple occupations were all $>20\%$. The auxiliary flow use improved the single-cell occupancy rate above 80% . Multiple-cell occupancy rates were $<10\%$, where most of the multiple-cell occupancies were because of the arrival of cell aggregates rather than multiple single-cells being captured separately.

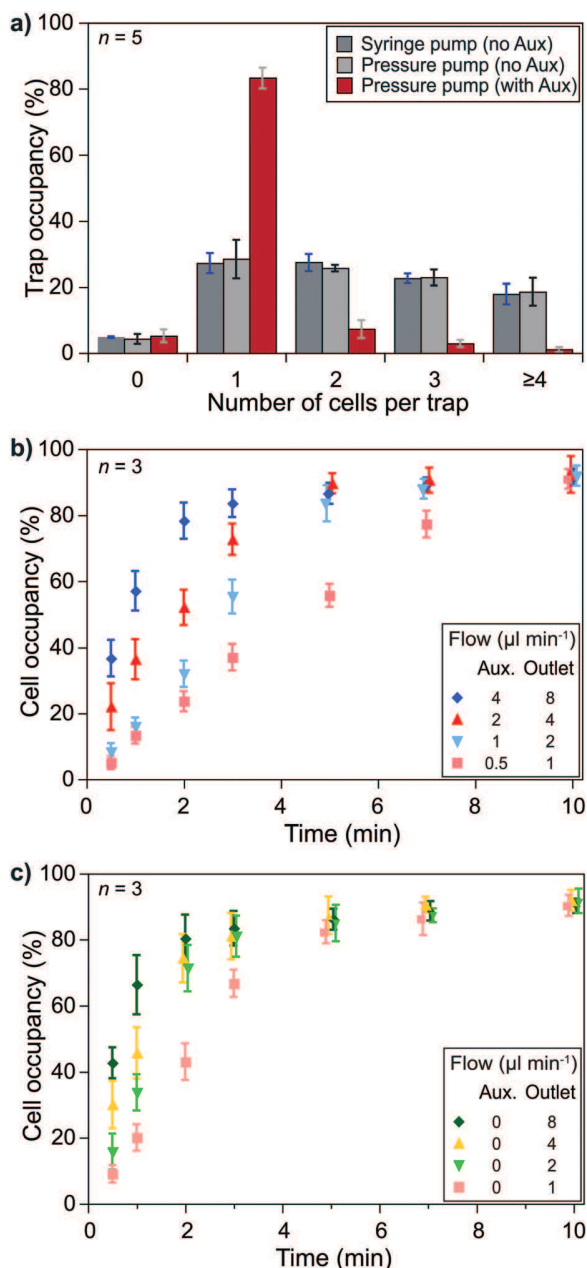


Fig. 3 Single-cell capturing requires optimized flow conditions. a) Using auxiliary flow improves the capture of a single T lymphocyte drastically. b) Keeping the auxiliary to outlet flow ratio at 0.5, different flow rates show different trap occupancy characteristics. Obtaining 80% single-cell occupancy in 5 minutes is chosen as an acceptable condition (1 $\mu\text{l min}^{-1}$ auxiliary and 2 $\mu\text{l min}^{-1}$ outlet flow) to keep mechanical stimulation at low levels. c) KG1 cells are captured with only the outlet flow. Over 80% single-cell occupancy was achieved in 3 minutes with the same outlet flow (2 $\mu\text{l min}^{-1}$) due to the trap array design being better suited for the size of KG1 cells than T lymphocytes.

Essential parameters to obtain optimum capturing performance were the auxiliary and outlet flow rates. We used the optimum flow rate ratio, *i.e.*, 0.5, to test different flow conditions. Higher flow rates brought more cells and, thus, filled the trap sites in a shorter time. However, on the one

hand, high flow rates provided higher drag forces on the cells that could cause cells to be compressed at the flow layer (the 2 μm layer at the bottom of the channel) and to slip away. We prefer minimizing mechanical stimulations as the pressure can activate signaling pathways and ion channels. On the other hand, lower flow rates did not exhibit notable mechanical effects but took longer to fill the trap sites. Injecting T lymphocytes (150 000 cells ml^{-1}) in the device with flow rates of 4 $\mu\text{l min}^{-1}$ auxiliary and 8 $\mu\text{l min}^{-1}$ outlet flows filled 80% of the traps with single cells in 2 minutes while flow rates of 0.5 $\mu\text{l min}^{-1}$ auxiliary and 1 $\mu\text{l min}^{-1}$ outlet flows took 10 minutes to reach >80% occupancy for single cells. We considered 5 minutes acceptable for >80% single-cell occupancy and chose 1 $\mu\text{l min}^{-1}$ auxiliary and 2 $\mu\text{l min}^{-1}$ outlet flows (Fig. 3b). However, when handling primary human CD8^+ T lymphocytes from AML patients (not shown here) we observed a higher variation of the cells' size (and possibly stiffness). We had to use lower flow rates for some experiments to prevent cells from slipping away from the capture site.

Similar experiments were performed to capture larger cells, *i.e.*, single KG1 cells, using only the outlet flow. Although an 80% single-cell capture rate was achieved in 2 minutes with 4 $\mu\text{l min}^{-1}$ outlet flow, we decided to use 2 $\mu\text{l min}^{-1}$ outlet flow to keep the same flow rate throughout the experiments while minimizing the potential mechanical stimulation of cells. According to the results, an 80% single-cell capture rate is achieved in 3 minutes of outlet flow (Fig. 3c).

The size difference between the two types of cells resulted in a decrease in the capturing efficiency of T lymphocytes. The row and column spacings were decided according to the KG1 cells to avoid clogging. Their diameters were 1.5–3 times larger than T lymphocytes. Consequently, there were large gaps between the T lymphocyte capture sites. We considered >80% of a single-cell trap occupancy as a sufficient level. The experimental results showed that around 30% of the T lymphocytes injected in the channel could be captured to reach this occupancy level in 5 minutes of combined auxiliary/outlet flow (Fig. S7a†). In contrast, >50% of the injected KG1 cells were captured in 3 minutes of outlet flow to reach >80% of a single-cell trap occupancy (Fig. S7b†).

Single-cell analysis: SOC monitoring

The previous sections demonstrated the single-cell capturing performance of the proposed method. A crucial step is to validate the functionality of the captured cells before applying for cell–cell interactions at an IS. We took this opportunity to perform a single-cell analysis of early signaling and functional responses of non-adherent cells. We performed experiments using cells loaded with the ratiometric Fura 2 calcium dye to validate cell viability and drug responsiveness. Cells were captured in our device while monitoring over time calcium concentrations $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the cytoplasm with a dedicated calcium imaging rig. We used

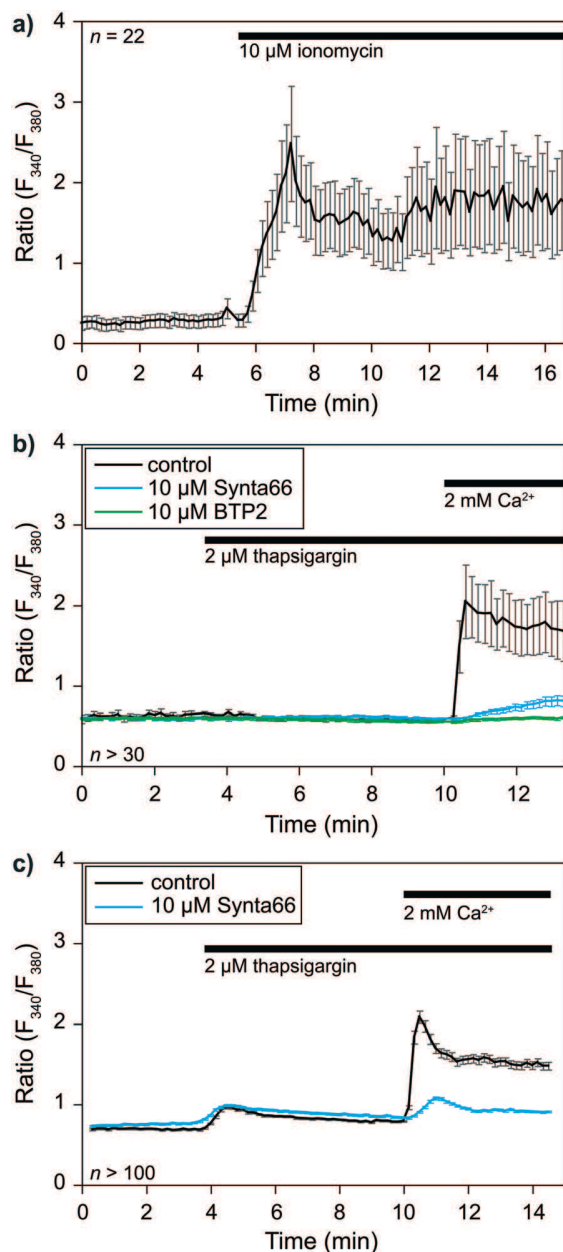


Fig. 4 Calcium response of CD8⁺ T-lymphocytes and KG1 cells. a) Time course of T-lymphocytes calcium responses to the application of the calcium ionophore ionomycin. b) Time courses of T-lymphocytes responses to thapsigargin, either alone (control) or combined with Synta66 or BTP2, two inhibitors of SOC channels. c) The same experiment as (b), but with KG1 cells. *n* corresponds to the number of analyzed cells.

two representative cell types: primary human CD8⁺ T lymphocytes isolated from healthy donors and the KG1 AML cell line as proof of principle.

The calcium response of CD8⁺ T-lymphocytes was monitored at 37 °C after being captured in the device (Fig. 4a). We first used the calcium ionophore ionomycin as a positive control to determine whether captured cell remained alive. The application of 2 μM ionomycin in the presence of 2

mM calcium in the extracellular solution elicited a rapid increase in [Ca²⁺]_i expressed here as a ratio of fluorescence (F_{340}/F_{380}). This experiment showed that (i) cells remained viable in the device, and (ii) the extracellular solution around the cells could be exchanged within seconds.

We then evaluated cells' capacity to respond to a commonly used drug, namely thapsigargin, to further validate the potential application of our device to pharmacological studies. Thapsigargin is an inhibitor of SERCA (sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase) pumps. Application of this drug induces a calcium release from the endoplasmic reticulum (ER), leading to the activation of store-operated calcium (SOC) channels in the plasma membrane and the resulting capacitative calcium entry. SOCs represent the main calcium entry pathway in non-excitable cells, and their activation and roles are well documented in T cells and leukemia cells.^{26,27} We thus decided to use SOC channels as a readout for our device's practical applications to biological studies. Application of 2 μM thapsigargin at $t = 3.5$ min elicited a transient increase in [Ca²⁺]_i corresponding to the ER calcium stores release (Fig. 4b and c). Subsequent application of 2 mM extracellular calcium at $t = 10$ min allowed us to determine SOC activity in both cell types. SOC activity resulted in a calcium entry into the cells, leading to an increase in [Ca²⁺]_i visualized through an increase in the fluorescence ratio of the calcium dye Fura 2. Experiments were repeated in the presence of 10 μM BTP2 or 10 μM Synta66 (added with thapsigargin at $t = 3.5$ min), two well-known inhibitors of SOC channels, to further validate our ability to apply pharmacological modulators in our device. The perfusion of T lymphocytes and KG1 cells in separate devices with both compounds led to the expected inhibition of SOC activity. Indeed, in the presence of BTP2 and Synta66, extracellular calcium application only resulted in a slight increase in [Ca²⁺]_i as shown by the reduced fluorescence variations compared to respective control conditions (Fig. 4b and c). Overall, these experiments show that this new device is compatible with biological systems studies.

Cell pairing and cellular activity monitoring

Investigating an immunological synapse requires a controlled cell pairing process between two cells, *e.g.*, T lymphocytes and leukemic cells. We used primary human CD8⁺ T lymphocytes and KG1 AML cell lines for cell pairing demonstrations. As explained in the methods section, we first injected T lymphocytes *via* primary inlet 1 and captured them at the trapping area in the presence of an auxiliary flow. Then, the active primary inlet was changed from 1 to 2 while the auxiliary flow was separating the inlet area from the trapping area. KG1 cells were injected *via* inlet 2 and captured after stopping the auxiliary flow. The outlet flow was kept constant throughout the experiment to minimize mechanical stimulation of the cells. We considered >80% single-cell occupancy acceptable for both T lymphocytes and

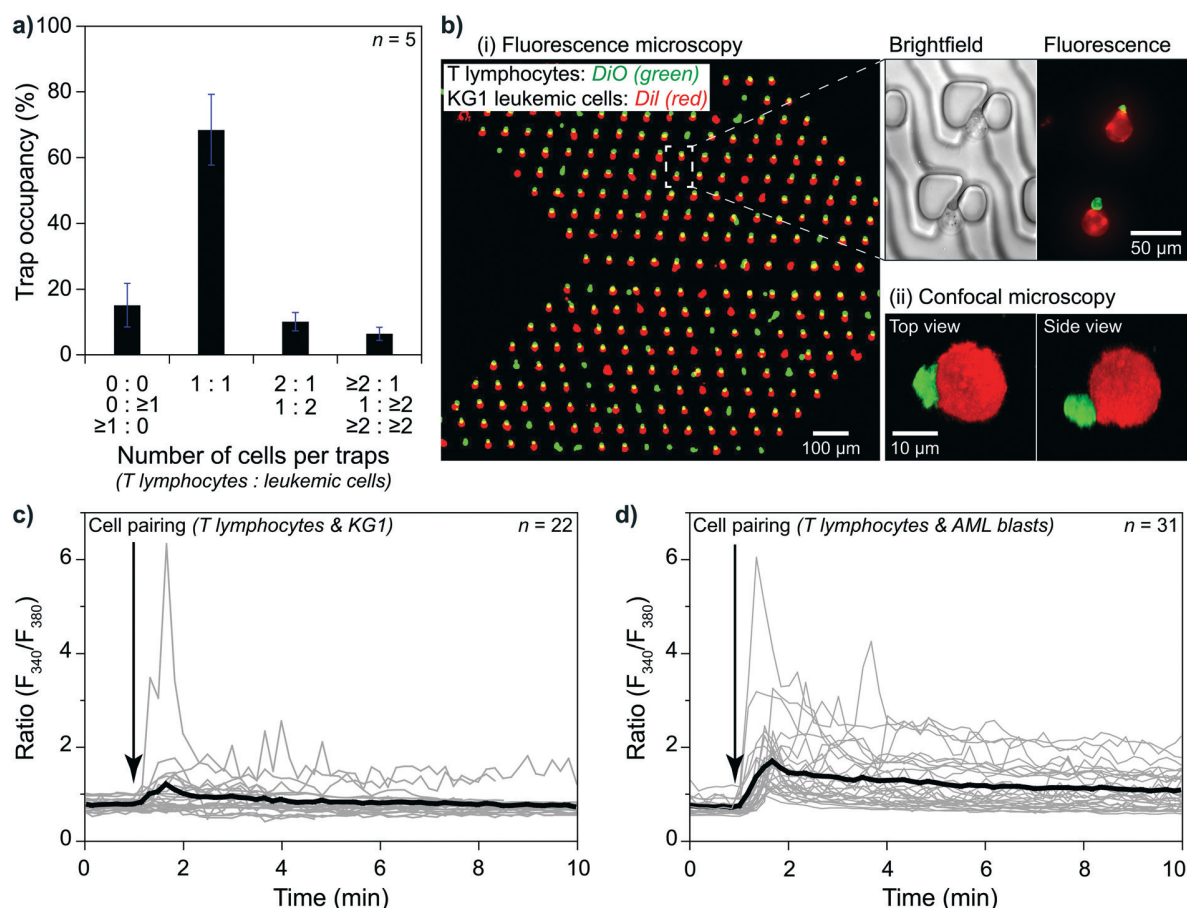


Fig. 5 Cell pairing and monitoring their activities. a) The proposed method formed pairs of single primary human T lymphocytes and single KG1 cells captured at 70% of the trap sites. b) (i) A view of paired T lymphocytes (green) and KG1 cells (red). Most of the multi-cell pairs were captured as doublets. (ii) Imaging a pair with confocal microscopy. c) Ca^{2+} imaging experiments showing T cell activity following IS formation. Cell pairs were formed at $t = 1$ min. d) An allogenic condition was obtained by pairing primary human CD8^+ T lymphocytes from healthy donors and primary AML blasts.

KG1 cells and performed cell pairing by operating the pump with the chosen flow parameters. The results showed that single T lymphocytes and single KG1 cells formed pairs at $\sim 70\%$ of trap sites (Fig. 5a). An additional $\sim 10\%$ of the sites were single-to-doublet cell pairs. Most of these multi-cell pairs (Fig. 5a and b) were formed by cells arriving in the trapping area as aggregates rather than being captured as two separate cells.

Cell-cell interaction studies benefit from observing late events and the early ones. For monitoring late events, pairs must stay at each trap site they were captured until the end of the observation. We tested our protocol with two different designs for a 4 hour observation period under constant outlet flow at 37°C . Slower flows, e.g., $0.02 \mu\text{l min}^{-1}$, resulted in losing pairs ($<15\%$) mainly due to Brownian motion separating KG1 away, while faster flows resulted in losing pairs mainly due to T lymphocytes being slipped away through the narrow opening of the trap or the flow layer (layer 0) at the bottom. The narrow opening design affected the ratio of lost pairs. Continuous flow caused many pairs to slip away in a straight narrow opening design (80% at $4 \mu\text{l}$

min^{-1}). Tilting the narrow opening at an angle of 45° increased the fluidic resistivity and decreased the adverse effects significantly. The lost pairs were only at $\sim 15\%$ at $4 \mu\text{l min}^{-1}$ outlet flow in an angled narrow opening device. For long observation sessions, the optimum flow rate was obtained as $0.3 \mu\text{l min}^{-1}$, at which rate only $<3\%$ of the pairs were lost at the end of a 4 hour observation (Fig. S8[†]). The number of lost pairs did not change after 0.5 hours, which suggested that much longer observation was possible (Fig. S8[†]).

The ability to monitor cell-cell interactions from initial contact to an extended time opens a unique opportunity to perform single-cell analysis of the resulting early signaling and functional responses. We studied the early events that occurred during an IS formation between an effector immune cell with its target cell to validate the principle for our device's practical applications. We monitored early activation of the immune cell in real-time, reflected by the calcium mobilization at 37°C . Here, the IS was formed by the interaction between one KG1 cell and one CD8^+ T lymphocyte cell. Using our device coupled to a calcium imaging rig, we

monitored in real-time basal $[Ca^{2+}]_i$, and $[Ca^{2+}]_i$ variations, a rapid and sensitive readout of T cell receptor (TCR) engagement following IS formation between superantigen pulsed primary human CD8⁺ T lymphocytes and KG1. The results showed the induced calcium responses in T lymphocytes loaded with Fura2 calcium dye due to the pairs formed between CD8⁺ T lymphocytes and KG1 (Fig. 5c and S9a†). A similar unidirectional flow protocol was applied to pair CD8⁺ T lymphocytes and primary human leukemic blasts (Fig. 5d and S9b†). Positive control was performed by adding ionomycin at the end of all experiments to check T cells viability and responsiveness to stimuli (Fig. S9c†). Our results proved that the proposed method enables real-time analysis of cellular activities on pairs of single cells, even for size differences reaching three times.

The third primary inlet allows the proposed method to perform some post-pairing actions. After the formation of the IS and the assay period, the auxiliary inlet separates the inlet and the trapping areas without compromising the constant flow conditions at the trap sites. In this condition, the second primary inlet is sealed, and the third primary inlet is opened to inject solutions into the channel. We demonstrated the feasibility of our method to assay the early molecular events during lymphocyte activation. As actin filaments are reorganized during synapse formation, we stained them to monitor whether they were polarized at the cell contact point. We first fixed and then permeabilized the cells to perform staining. As the last step, we injected phalloidin-488 to finalize actin filaments fluorescent staining (Fig. S10†).

Discussion

The presented method provided pairs of non-adherent cells having different sizes to investigate early and late cellular activities at IS. Techniques such as droplet microfluidics could potentially bring cells of different sizes nearby but still cannot study early signaling dynamics and their correlation to subsequent functional behaviors.²⁴ Demonstrated microfluidic channels show excellent performance in investigating early signaling and high efficiency in forming pairs of similar-sized cells.²³ 2D design changes on such systems could capture cells with different dimensions. However, when the smaller cell is as small as half of the larger cell, multiple cell capturing is inevitable in the z-direction. Therefore, we introduced a practical channel height modulation to provide pairs formed by single cells despite their size differences. Hydrodynamic flow focusing in the z-direction allowed us to flow the smaller cells by the bottom surface and capture them at the trap sites positioned at that level. As discussed below, this flow, named auxiliary flow, showed several other advantages.

Pairing cells of different sizes required a device designed according to the larger cells. The channel height, trap density, and trap position were decided accordingly. Although we could overcome the channel height effect on smaller cells with an auxiliary flow, the trap density and positioning could

not be designed according to the smaller cells. Consequently, such cells showed a lower capturing rate and efficiency. The overall capture efficiency can be improved by repeating the >shaped trap sites. This paper demonstrated the method with primary human samples after several sorting steps, which resulted in a limited number of cells. Moreover, to achieve sensitive Ca^{2+} imaging, we used relatively higher magnification (20×), limiting our observation area. As a result, we did not push higher efficiency rates but focused on pairs of single cells.

Pressure can activate the signaling pathways of a cell. It can also induce ATP release from the cells, activating SOC channels of the same and surrounding cells.²⁷ T cells are not only sensitive to pressure²⁸ but also smaller and more deformable than many other cells, *e.g.*, cardiac myocytes²⁸ and stem cells.²³ As we monitor TCR with Ca^{2+} imaging to investigate cellular activities, stable and reliable protocols minimizing the pressure fluctuations applied on cells are crucial. A unidirectional flow format and single-step trapping minimize the disturbance to the captured cells, unlike other examples requiring bidirectional flows with consecutive two-trap-site capturing²³ or multi-step trapping through physical constraints with different flow rates.²⁴ Compressing cells (reaching 50%) during capturing²⁴ may lead to unexpected cellular responses in addition to the ones due to immunological responses. The auxiliary inlet completely separates the inlet area from the trapping area without changing the flow conditions in the latter. Therefore, the auxiliary inlet flow and single-step cell capturing provide constant flow conditions at trap sites throughout the experiments minimizing potential external effects on cellular activity during actions taken at the front end of the device.

The proposed three primary inlet geometry may seem intricate; however, it minimizes washing steps and cross-channel contamination as only one inlet works at a time. When we increase the auxiliary flow rate above the outlet flow rate (flow ratio, $r > 1$) right before changing from inlet 1 to inlet 2, we induce a flow towards inlet 1 which cleans the main channel. The new cells injected in inlet 2 flow along the main channel without contamination from inlet 1. As a result, the auxiliary flow separating the inlet and trapping areas makes the system much more stable during the injection of new cells or solutions in the channel by preventing any flow fluctuation in the trapping area while cleaning the main channel simultaneously.

Conclusions

Studies on cell–cell interactions attracted many researchers, particularly cancer immunology, to develop cell pairing devices to investigate early events. Although some designs were demonstrated for analyzing pairs with similar-sized cells, these devices show difficulties maintaining pairs of single cells when the dimension of cells differs. We filled this gap by introducing 3D hydrodynamic flow focusing on changing the effective channel height while pairing cells with

different dimensions. We used physical traps having different geometries to capture different cell types. Ca^{2+} imaging was performed in real-time to monitor early events at an immunological synapse formed by paired cells at specific trap sites. We demonstrated the method using primary human T lymphocytes, KG1 AML cell lines, and primary AML blasts. As T lymphocytes are sensitive to pressure, our method provided minimal disturbance to the cells and pairs by keeping the flow conditions at the trapping area constant throughout the experiments, including both cell capturing steps. The results showed that the proposed method could pair primary human cells having different dimensions forming an IS in a controlled environment.

To sum up, the proposed method leads to deciphering mechanisms of IS formation between tumor cells and different types of immune cells (*e.g.*, T and natural killer), which play a significant role in cancer immunology. In addition, despite the heterogeneity of immune-cancer cells interactions caused by their specific properties, our method allows detailed functional studies at the IS level reflecting the diversity of immune cells and malignant cells behaviors. The detailed tracking of immune-cancer cell interactions at the single pair level helps uncover key mechanisms to improve the efficiency of various immunotherapeutic strategies.

Author contributions

Conceptualization: D. C., B. Q., Y. T., L. L., M. C. T. Data curation: F. A. S, C. L, Y. T., L. L., M. C. T. Formal analysis: F. A. S, C. L, Y. T., L. L., M. C. T. Funding acquisition: D. C., B. Q., Y. T., L. L., M. C. T. Investigation: F. A. S, C. L, A. G., B. A., Y. T., L. L., M. C. T. Methodology: F. A. S, C. L, A. G., C. B., D. C., B. Q., Y. T., L. L., M. C. T. Project administration: Y. T., L. L., M. C. T. Resources: C. B., D. C., B. Q., Y. T., L. L., M. C. T. Supervision: C. B., D. C., B. Q., Y. T., L. L., M. C. T. Validation: F. A. S, C. L, A. G., B. A., Y. T., L. L., M. C. T. Visualization: F. A. S, B. A., L. L., M. C. T. Writing – original draft: F. A. S, C. L., Y. T., L. L., M. C. T. Writing – review & editing: F. A. S., C. L, D. C., B. Q., Y. T., L. L., M. C. T.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work is in the framework of SMMiL-E activities. F. A. Shaik is a recipient from a Contrat de Plan Etat-Région CPER Cancer 2015-2020 fellowship. This work is supported by grants from Contrat de Plan Etat-Région CPER Cancer 2015-2020, INSERM, CNRS, Ligue contre le cancer (Septentrion), Ligue nationale contre le cancer, ARC, and the Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL). The authors acknowledge IRCL for hosting SMMiL-E. M. C. Tarhan acknowledges Fondation ARC. We would also like to thank Nathalie Jouy (Flow Cytometry Platform, Univ Lille, Lille, France) for her technical assistance, and Jean-Claude

Gerbedoen (LIMMS, Lille, France) for his assistance on fabrication. Clara Lewuillon is financed by Lille Hospital and by Hauts de France Region.

References

- Z. Wan, X. Gao, Y. Dong, Y. Zhao, X. Chen, G. Yang and L. Liu, *Am. J. Cancer Res.*, 2018, **8**, 1661–1673.
- M. Mittelbrunn and F. Sánchez-Madrid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2012, **13**, 328–335.
- H. Daneshpour and H. Youk, *Curr. Opin. Syst. Biol.*, 2019, **18**, 44–52.
- M. A. Kalliomäki and W. A. Walker, *Clin. Gastroenterol.*, 2005, **34**, 383–399.
- S. Cai, C. Wu, W. Yang, W. Liang, H. Yu and L. Liu, *Nanotechnol. Rev.*, 2020, **9**, 971–989.
- E. C. Lai, *Development*, 2004, **131**, 965–973.
- H. Raskov, A. Orhan, J. P. Christensen and I. Gögenur, *Br. J. Cancer*, 2021, **124**, 359–367.
- D. E. Speiser, P. C. Ho and G. Verdeil, *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, **16**, 599–611.
- S. Khaldoyanidi, D. Nagorsen, A. Stein, G. Ossenkoppele and M. Subklewe, *J. Clin. Oncol.*, 2021, **39**, 419–432.
- D. R. Bogdanowicz and H. H. Lu, *Biotechnol. J.*, 2013, **8**, 395–396.
- H. Ge, L. Tan, P. Wu, Y. Yin, X. Liu, H. Meng, G. Cui, N. Wu, J. Lin, R. Hu and H. Feng, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 1–10.
- Y. C. Chen, Y. H. Cheng, H. S. Kim, P. N. Ingram, J. E. Nor and E. Yoon, *Lab Chip*, 2014, **14**, 2941–2947.
- H. Dolznig, C. Rupp, C. Puri, C. Haslinger, N. Schweifer, E. Wieser, D. Kerjaschki and P. Garin-Chesa, *Am. J. Pathol.*, 2011, **179**, 487–501.
- C. H. Kim, I. R. Suhito, N. Angeline, Y. Han, H. Son, Z. Luo and T. H. Kim, *Adv. Healthcare Mater.*, 2020, **9**, 1901751.
- J. A. James, M. Sushmitha, R. Premkumar, V. Narayanamurthy and R. Kalpana, in *2017 International Conference on Microelectronic Devices, Circuits and Systems, ICMDCS 2017*, 2017, vol. 2017, pp. 1–6.
- Y. Zhou, N. Shao, R. Bessa de Castro, P. Zhang, Y. Ma, X. Liu, F. Huang, R. F. Wang and L. Qin, *Cell Rep.*, 2020, **31**, 107574.
- T. Konry, S. Sarkar, P. Sabhachandani and N. Cohen, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2016, **18**, 259–284.
- T. Lam, M. D. Brennan, D. A. Morrison and D. T. Eddington, *Lab Chip*, 2019, **19**, 682–692.
- D. K. Kang, M. Monsur Ali, K. Zhang, E. J. Pone and W. Zhao, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2014, **58**, 145–153.
- S. Srikanth and Y. Gwack, *Mol. Cells*, 2013, **35**, 182–194.
- L. Li, H. Wang, L. Huang, S. Alan Michael, W. Huang and H. Wu, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 15908–15914.
- A. M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch and J. Voldman, *Nat. Methods*, 2009, **6**, 147–152.
- B. Dura, S. K. Dougan, M. Barisa, M. M. Hoehl, C. T. Lo, H. L. Ploegh and J. Voldman, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 1–13.

- 24 B. Dura, M. M. Servo, R. M. Barry, H. L. Ploeghf, S. K. Dougand and J. Voldman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, E3599–E3608.
- 25 H. Cabanas, T. Harnois, C. Magaud, L. Cousin, B. Constantin, N. Bourmeyster and N. Déliot, *Oncotarget*, 2018, **9**, 26309–26327.
- 26 N. Watkins, B. M. Venkatesan, M. Toner, W. Rodriguez and R. Bashir, *Lab Chip*, 2009, **9**, 3177–3184.
- 27 G. Dahl, *Philos. Trans. R. Soc., B*, 2015, **370**, 1–11.
- 28 S. Faley, K. Seale, J. Hughey, D. K. Schaffer, S. Vancompernelle, B. McKinney, F. Baudenbacher, D. Unutmaz and J. P. Wikswo, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1700–1712.

Supplementary Information

Pairing Cells of Different Sizes in a Microfluidic Device for Immunological Synapse Monitoring

Faruk Azam Shaik,^{a,b} Clara Lewuillon,^{a,c} Aurélie Guillemette,^{a,c} Bahram Ahmadian,^{b,d} Carine Brinster,^{a,c} Bruno Quesnel,^{a,c} Dominique Collard,^{b,e} Yasmine Touil,^{*,a,c} Loïc Lemonnier,^{*,f,g} and Mehmet Cagatay Tarhan^{*,b,d,e}

^a University of Lille, Lille, France.

^b CNRS, IIS, COL, Univ. Lille, SMMiL-E project, Lille, France.

^c Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 - Canther - Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France.

^d Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, Junia, Univ. Polytechnique Hauts-de-France, UMR 8520 -IEMN -Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie, F-59000 Lille, France.

^e LIMMS/CNRS-IIS IRL2820, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

^f Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, France.

^g Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Villeneuve d'Ascq, France.

† F. A. Shaik and C. Lewuillon contributed equally to this work. Y. Touil, L. Lemonnier, and M. C. Tarhan share the last authorship.

Fig. S1
Fig. S2
Fig. S3
Fig. S4
Fig. S5
Fig. S6
Fig. S7
Fig. S8
Fig. S9
Fig. S10

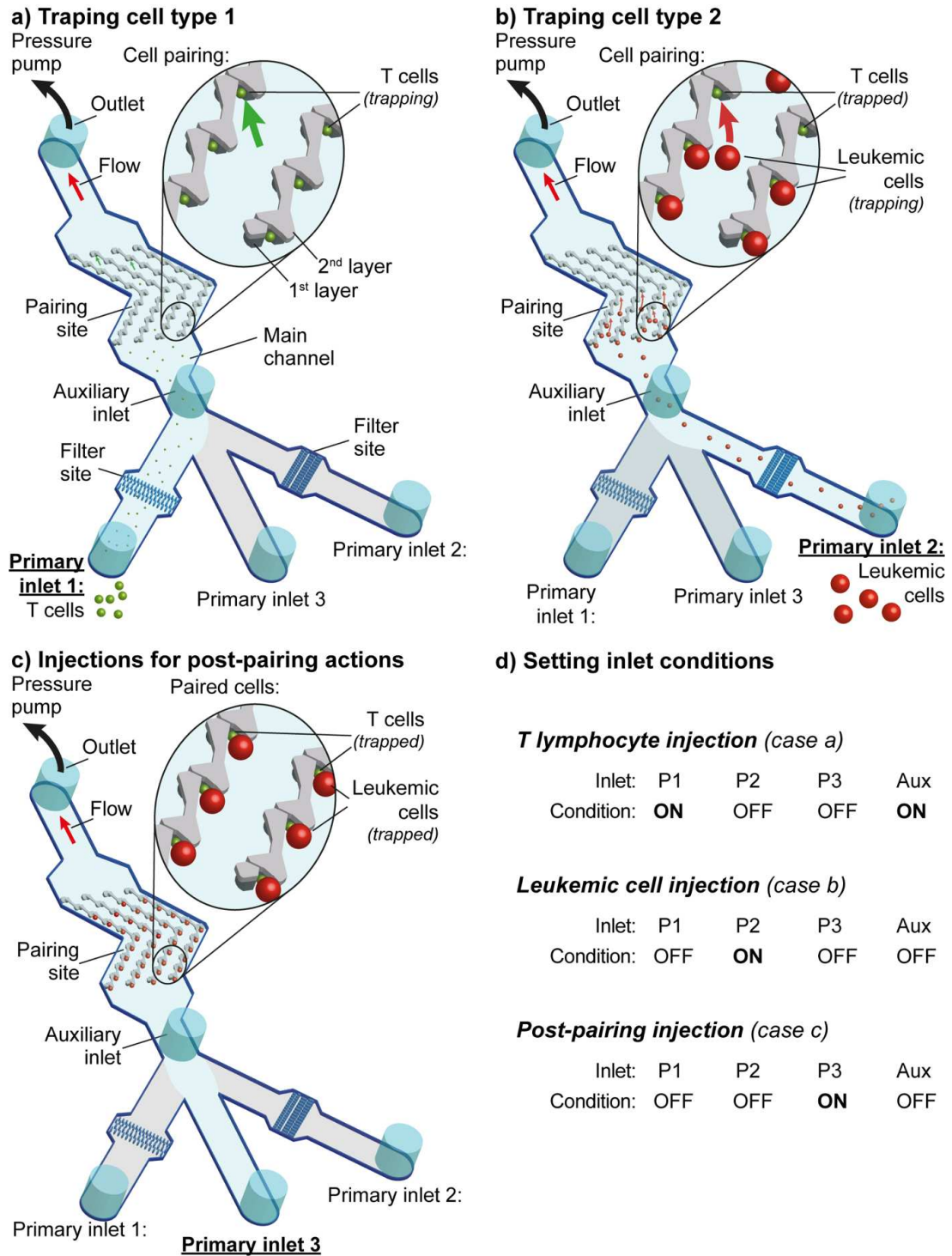


Fig. S1 The inlet flow conditions for three different actions. a) T lymphocytes had dimensions significantly smaller than the channel, and thus, the channel height had to be modified. Hence, T lymphocytes were injected via the primary inlet 1 while keeping auxiliary inlet ON to push cells towards layer 1 for single-cell capturing. b) Leukemic cells fit well with the channel height; thus, no channel height modulation was required. As a result, the primary inlet 2 was used for cell injection while turning the auxiliary inlet OFF. c) The post-pairing actions required additional solutions to be injected. A cell-free inlet, the primary inlet 3, was used to minimize cellular contamination while keeping the auxiliary inlet OFF. d) A summary of the inlet conditions shows the required settings for each case.

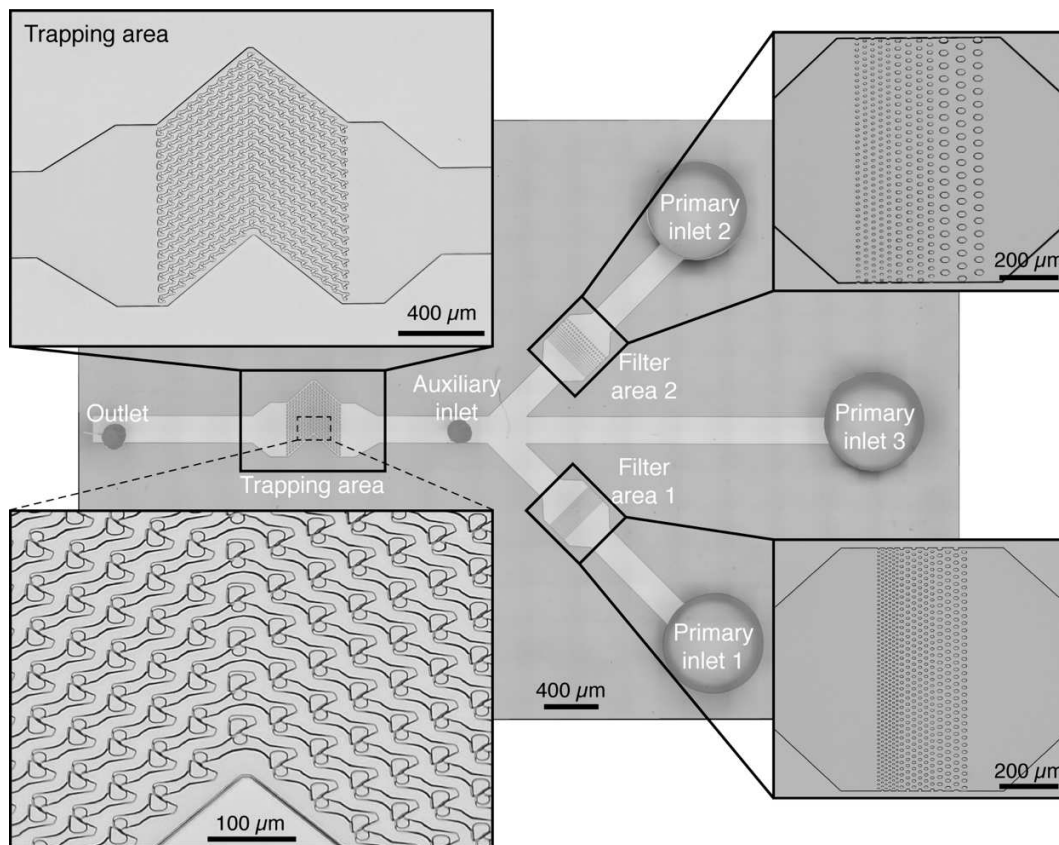


Fig. S2 A view of the device showing the main parts.

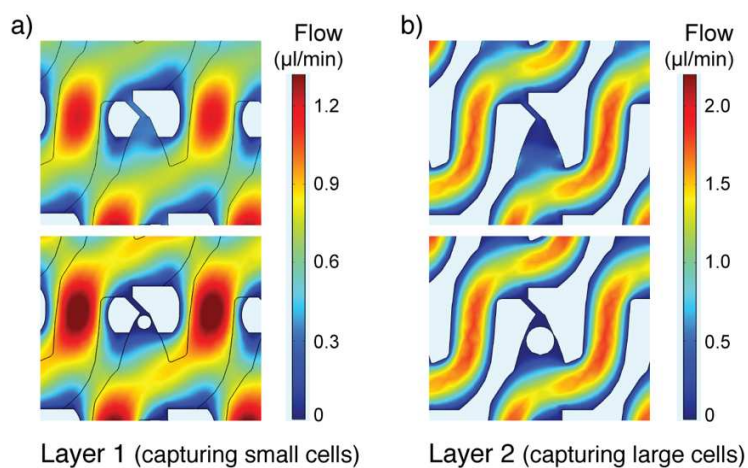


Fig. S3 a) COMSOL simulations show the flow profile around a capture site at layer 1 for small cells. A captured cell blocks the narrow opening and prevents more cells from being captured. The following cell flows around the capture site. b) Similar simulations demonstrate the effect of a large cell captured at layer 2.

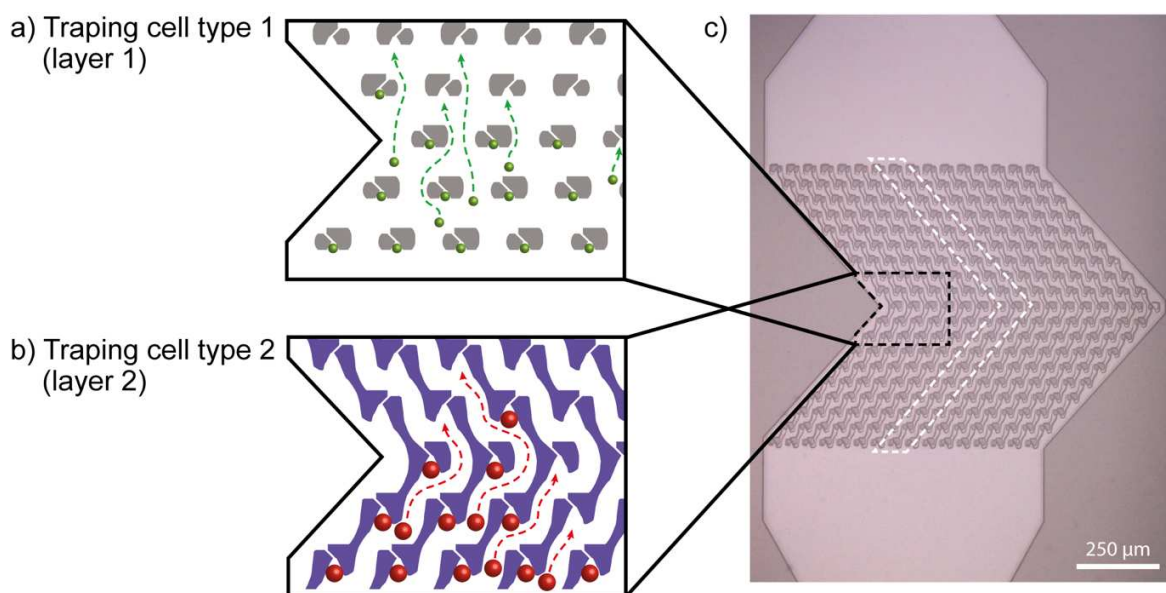


Fig. S4 a) Cell type 1 is trapped at layer 1. b) Cell type 2 follows the >-shaped walls fabricated at layer 2. c) A general view of the trapping area shows both layers as the >-shaped array of pairing traps.

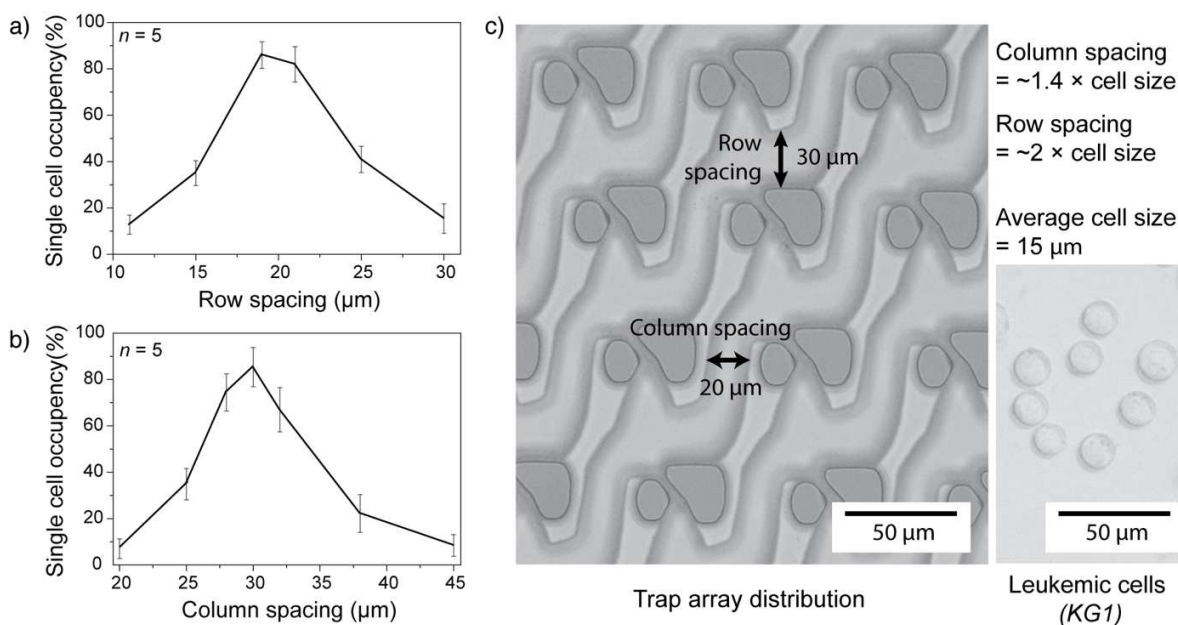


Fig. S5 Different designs were tested experimentally to optimize the pairing site array geometry. a) The row spacing was chosen as 20 μm and b) the column spacing as 30 μm. c) Brightfield images show how the trapping area geometry and larger cells (KG1) compared to each other.

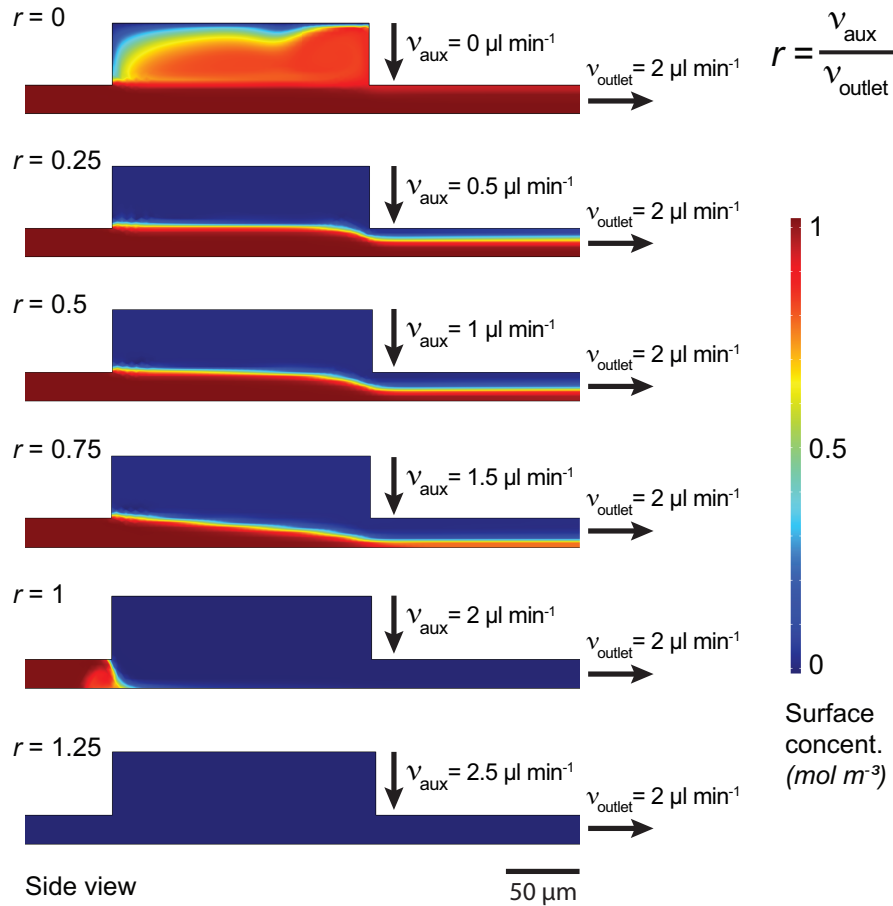


Fig. S6 Simulations show the effect of the auxiliary and outlet flow ratio (r). For $r = 0$, the trap area receives the exact solution injected at the primary inlet. Increasing the flow ratio (r) results in a decreased height of the injected solution. When r reaches 1, the channel is blocked, and the injected solution cannot reach the trapping area. For $r > 1$, the auxiliary flow pushes the injected solution back. In this case, the trapping area is separated from the inlet area, and the active sub-channel is cleaned.

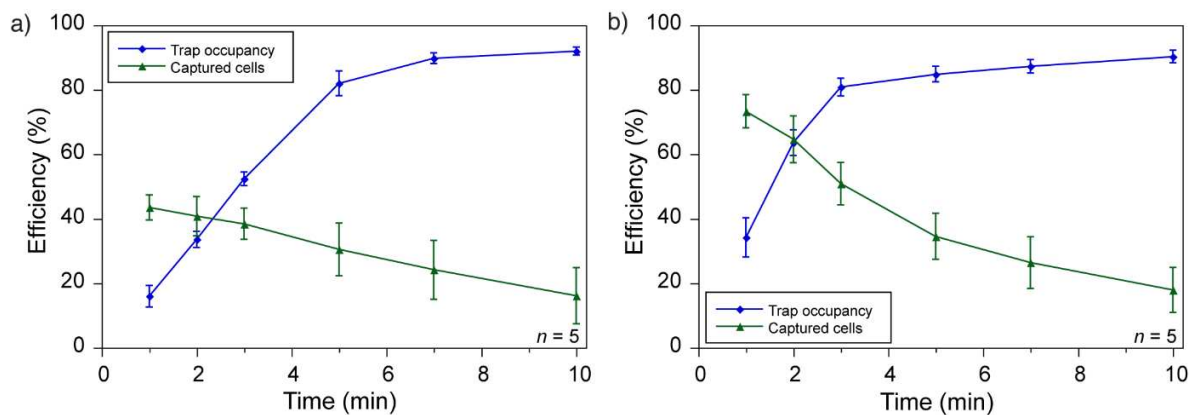


Fig. S7 a) The captured cell efficiency (captured cells per all cells injected in the channel) of T lymphocytes is relatively lower as the trap design was done according to the larger cells, *e.g.*, KG1 and blasts. Around 30% of the T lymphocytes could be captured to reach a single-cell trap occupancy level of 80% in 5 minutes. b) As the trap geometry in the array was designed according to KG1, a higher cell capturing efficiency (>50%) was obtained when compared with T lymphocytes to reach a single-cell trap occupancy level of 80% in a shorter time (3 minutes).

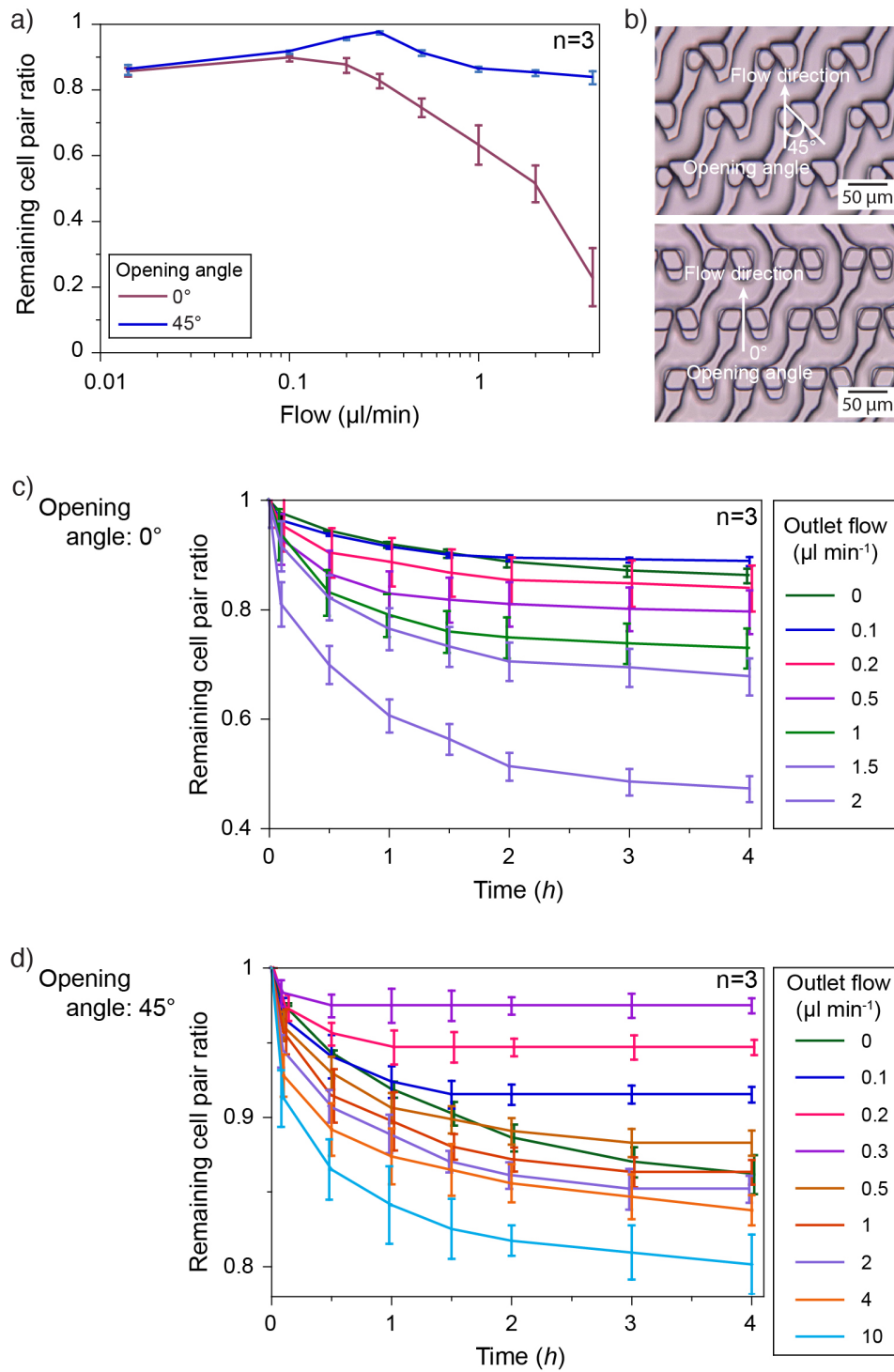


Fig. S8 a) Long incubation performance of the method was demonstrated with the remaining cell pair ratio (*i.e.*, the number of cell pairs at time t by the number of cell pairs at $t = 0$) for (b) two different trap geometry. The performance was tested at $t = 0.5, 1, 1.5, 2, 3,$ and 4 h for an opening angle of (c) 0° and (d) 45° .

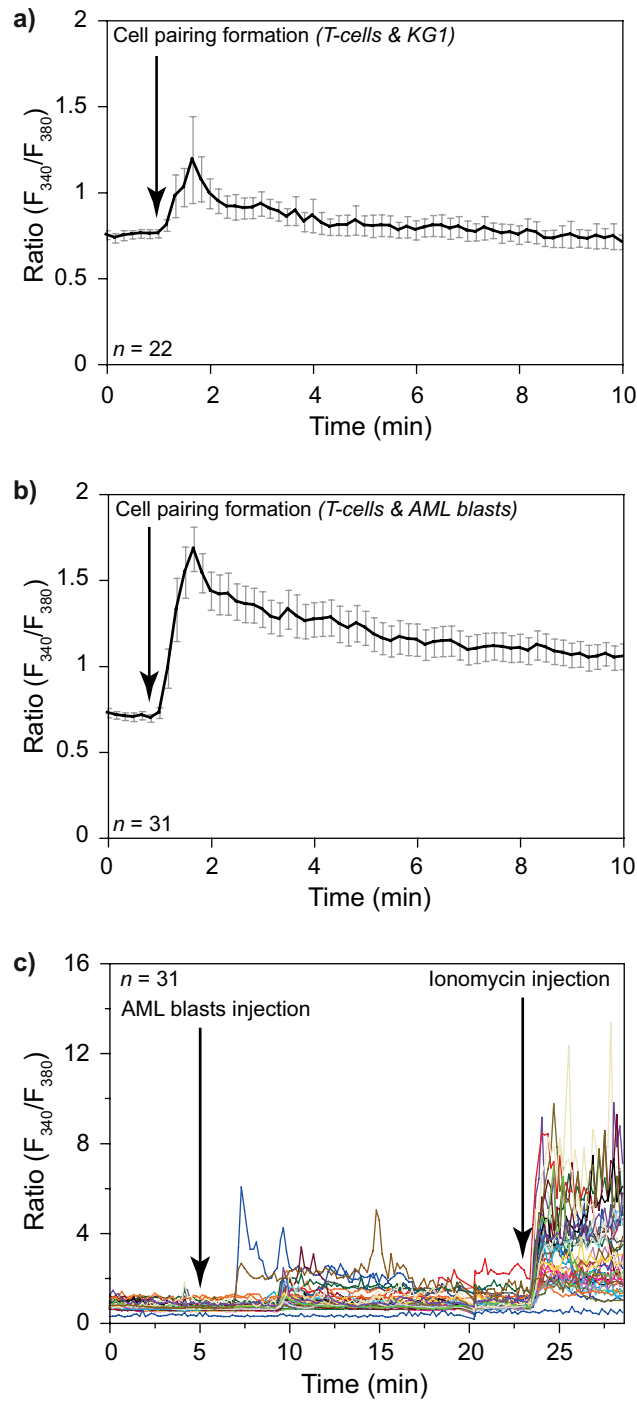


Fig. S9 Other demonstrations of the Ca^{2+} imaging experiments showed in Figure 5. (a) corresponds to T lymphocytes - KG1 pairs and (b) corresponds to pairs of T lymphocytes and AML blasts from healthy donors. Error bars correspond to the standard error. c) An allogenic condition was obtained by pairing primary human $CD8^+$ T lymphocytes from healthy donors and primary AML blasts. Positive control was performed by adding ionomycin at the end of the experiment to check T cells viability and responsiveness to stimuli.

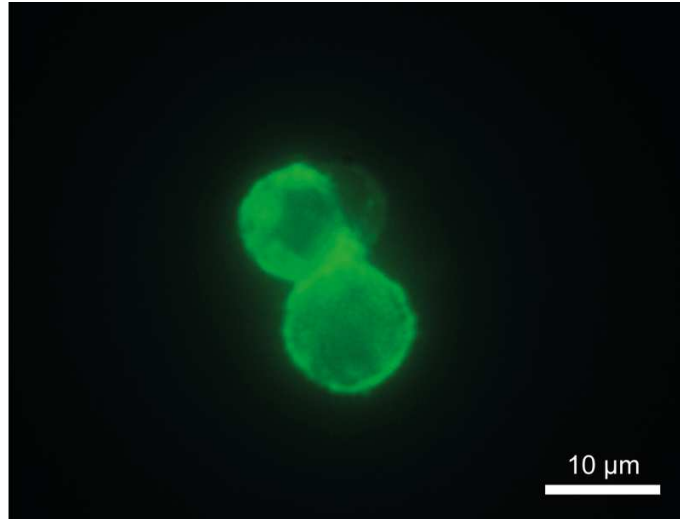


Fig. S10 A demonstration of post-pairing actions where cells were fixed, permeabilized, and had actin filaments stained with Phalloidin-488.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

1. Collecte des cellules leucémiques et LT de patients

LAM et donneurs sains et immunophénotypage

Les expérimentations sont réalisées à partir d'échantillons de donneurs sains fournis par l'Établissement Français du Sang ainsi qu'à partir d'échantillons prélevés chez des patients au stade du diagnostic de la LAM (tableau 8). Ces échantillons sanguins ont été prélevés au niveau du sang périphérique et une purification des PBMC a été réalisée.

N° de patient	Sexe	Age au diagnostic	FAB	ELN	Mutations
LAM#1	F	47	LAM 5	N.D	FLT3-ITD, FLT3-TKD, NPM1, DNMT3a, SMC1a
LAM#2	M	69	LAM 4	N.D	MLL ; IDH2 ; WT1 t(7 ;21) impliquant le gène RUNX1
LAM#3	M	19	LAM 4	N.D	FLT3-ITD,BCO2, RUNX1 sur WT1
LAM#4	M	74	N.D	Adverse	LAM post SMD, TP53
LAM#5	M	50	LAM 4	N.D	Inv(16), BCORL1, FLT3-TKD, Kit, NRAS
LAM#6	F	30	LAM 3	N.D	T (15;17) PML-RAR α
LAM#7	M	34	LAM 4	N.D	FLT3-ITD+, RUNX1, WT1
LAM#8	M	50	LAM 1	N.D	caryotype 46,XY[20], DNMT3A, IDH2 et NPM1
LAM#9	M	62	LAM5a	N.D	caryotype : t(9 ;11) (p22,q23) de valeur pronostique intermédiaire, trisomie 8 et un isochromosome 9p, fusion MLL
LAM#10	F	73	N.D	Adverse	FLT3, IDH2, NPM1, SRbF2
LAM#11	F	56	Inclassable	N.D	N.D
LAM#12	M	35	LAM 4	N.D	Inv(16)(p13q22) / CBFB-MYH11 ; FLT3-TKD(domain TKD1)
LAM#13	F	56	N.D	Adverse	TP53, DNMT3a, JAK2, Tet2, SA2B3
LAM#14	F	67	N.D	Inclassable	Monosomie 7, FLT3-ITD, IDH2

Tableau 8 : Caractéristiques des patients LAM au diagnostic.

Avant d'étudier la formation de la synapse immunologique entre les différents types cellulaires, le phénotypage des cellules leucémiques et LT de chaque patient LAM a été réalisé, de même que l'étude du statut de différenciation des LT sains et LAM.

1.1 Immunophénotypage des cellules leucémiques

La caractérisation des différentes sous-populations des cellules leucémiques (cellules souches, cellules non souches, cellules exprimant PD-L1 ou non, ...) a nécessité le marquage des PBMC de patients atteints de LAM au diagnostic avec des anticorps couplés à des fluorochromes. Selon la méthode utilisée par Haubner et son équipe (Haubner *et al.* 2019), les cellules leucémiques sont phénotypées et triées simultanément en fonction de l'expression des marqueurs membranaires suivants : CD34, CD38, CD33, HLA-DR, TIM-3 et PD-L1 afin d'affiner la sélection des sous-populations d'intérêt.

À l'aide de la cytométrie en flux, nous avons donc analysé le profil d'expression des antigènes de surface des cellules leucémiques des échantillons primaires de patients LAM au moment du diagnostic (n=14).

La figure 1A montre des graphes bi-paramétriques reflétant la différence d'expression de CD33 et CD34 chez deux patients LAM au diagnostic. On observe que la proportion de population CD33⁺ CD34⁺ varie entre les patients LAM. En effet, le patient LAM#12 montre une population CD33⁺ CD34⁺ représentée à 51,1% tandis que chez le patient LAM#13, la sous-population CD33⁺ CD34⁺ représente un pourcentage de 13,3%.

Les figures 1B et C montrent, quant à elles, la différence d'expression de CD34 et CD38 dans la population CD33⁺ (B) et CD33⁻ (C) chez le même patient LAM. Dans la population CD33⁺, la population CD34⁺ CD38⁻ est présente à 0,11%, tandis que dans la population CD33⁻, elle est présente à 0,32%.

Pour les 14 patients LAM nous avons, dans un premier temps, quantifié l'expression des marqueurs membranaires CD33, CD34 et CD38 et on observe que la population CSL CD33⁺ CD34⁺ CD38⁻ est minoritaire car elle représente $2,6 \pm 1,8\%$ de la population totale des cellules leucémiques, tandis que la population CD33⁺ CD34⁺ représente $19,2 \pm 6,4\%$ de la population totale. La population cellules non souches CD33⁺ CD34⁻, quant à elle, représente $33,6 \pm 8,2\%$ de la population totale (figure 1D).

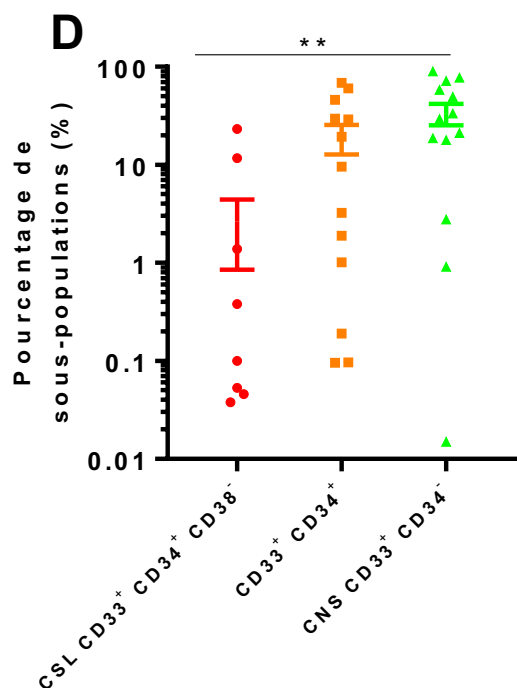
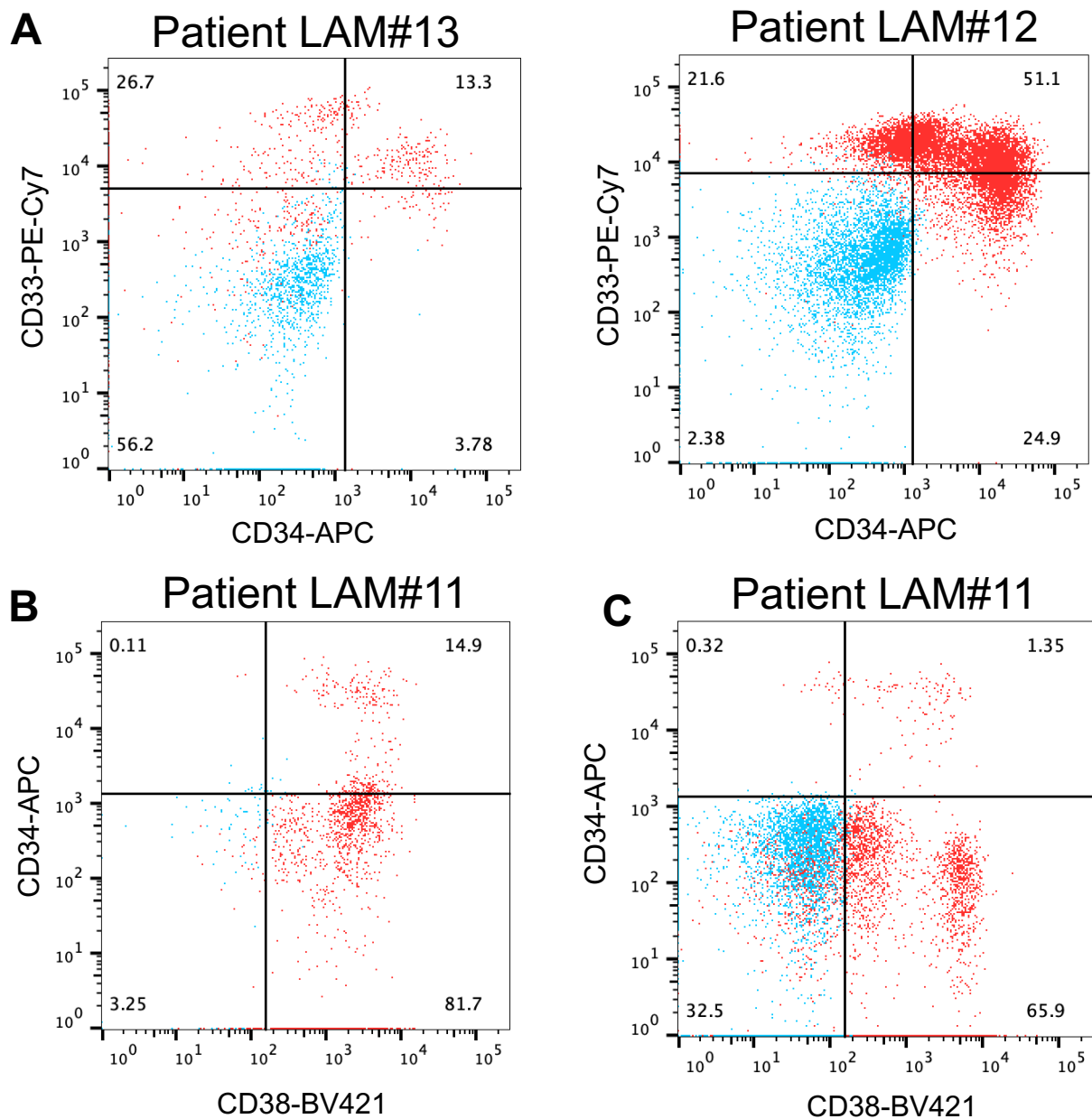


Figure 1 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic. (A) Graphes bi-paramétriques de l'intensité de fluorescence des cellules leucémiques marquées à l'aide des anticorps anti-CD33 et anti-CD34 couplés aux fluorochromes PECy7 et APC, respectivement pour deux patients différents (rouge). Graphes bi-paramétriques de l'intensité de fluorescence des cellules leucémiques marquées à l'aide des anticorps anti-CD34 et anti-CD38 couplés aux fluorochromes APC et BV421 respectivement au sein de la population CD33⁺ (B) ou CD33⁻ (C) (rouge). Les seuils de positivité de cytométrie ont été déterminés en fonction des isotypes de chaque anticorps (bleu). (D) Pourcentage des sous-populations indiquées au sein des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic. Chaque point représente un échantillon de patient (n=14). Les valeurs *p* sont issues de tests ANOVA univariés comparant les différentes moyennes ** *p*<0,01.

Nous avons ensuite analysé l'expression de PD-L1 en cytométrie en flux. La figure 2 montre un exemple de graphes bi-paramétriques montrant la différence d'expression de CD33 et PD-L1 chez deux patients LAM différents. Chez le patient LAM#12, la population CD33⁺ PD-L1⁺ est présente à 0,18%, tandis que chez le patient LAM#13 elle est de 0,41%.

En outre, nous observons qu'au sein de la population leucémique des patients LAM (n=14), la sous-population CD33⁺ PD-L1⁻ représente 51±9,1% comparée à la sous-population CD33⁺ PD-L1⁺ qui, elle, ne représente que 1,7±1,4% (figure 3B).

Nous avons ensuite traité les cellules de patients LAM à l'IFN γ afin de mimer leur interaction avec les LT qui, lorsqu'ils sécrètent cette cytokine à proximité des cellules leucémiques permettent, entre autre, l'augmentation de l'expression de PD-L1 par ces cellules (Payne *et al.* 2016). La figure 3A montre un exemple de différence d'expression de PD-L1 en condition contrôle (26,4%, rouge) comparée à la condition après traitement à l'IFN γ (35,9%, bleu) pour un patient LAM. Effectivement, nous avons pu observer que, comme attendu, un traitement de 24h à l'IFN γ (25ng/mL) sur les cellules leucémiques de patients LAM (n=5) induit une diminution de la population CD33⁺ PD-L1⁻ qui représente 28±11% et une augmentation de la population CD33⁺ PD-L1⁺ (7,4±5%) (figure 3B).

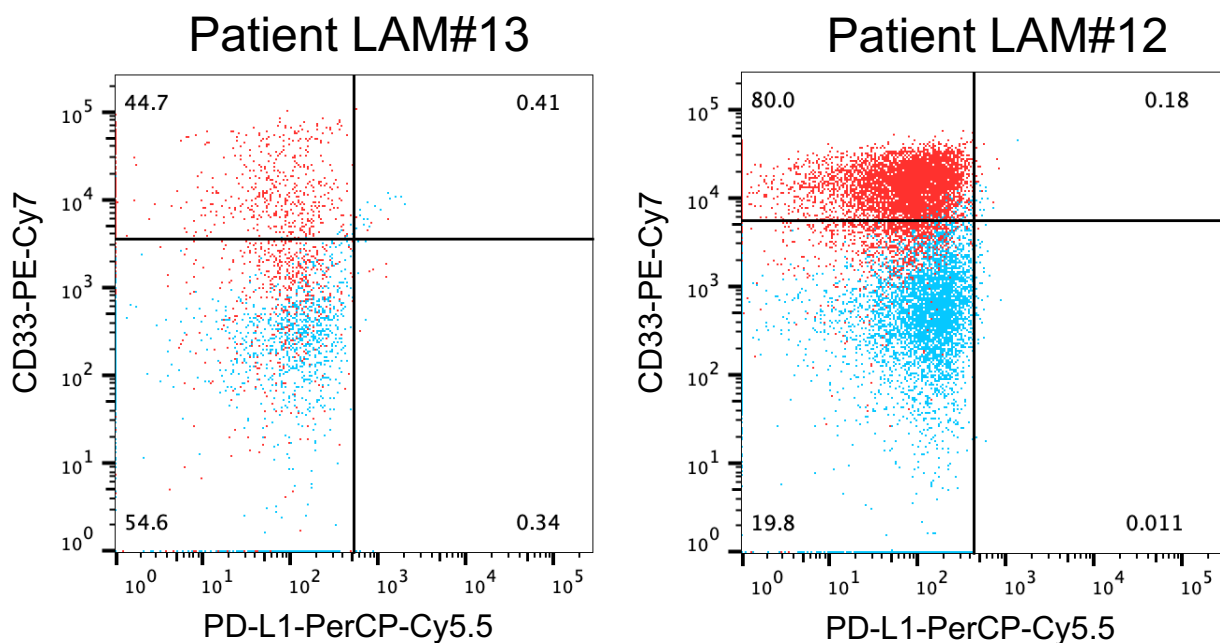


Figure 2 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires CD33 et PD-L1 des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic. Graphes bi-paramétriques de l'intensité de fluorescence des cellules leucémiques marquées à l'aide des anticorps anti-CD33 et anti-PD-L1 couplés respectivement aux fluorochromes PECy7 et PerCP-Cy5.5 pour deux patients différents (rouge). Les seuils de positivité de cytométrie ont été déterminés en fonction des isotypes de chaque anticorps (bleu).

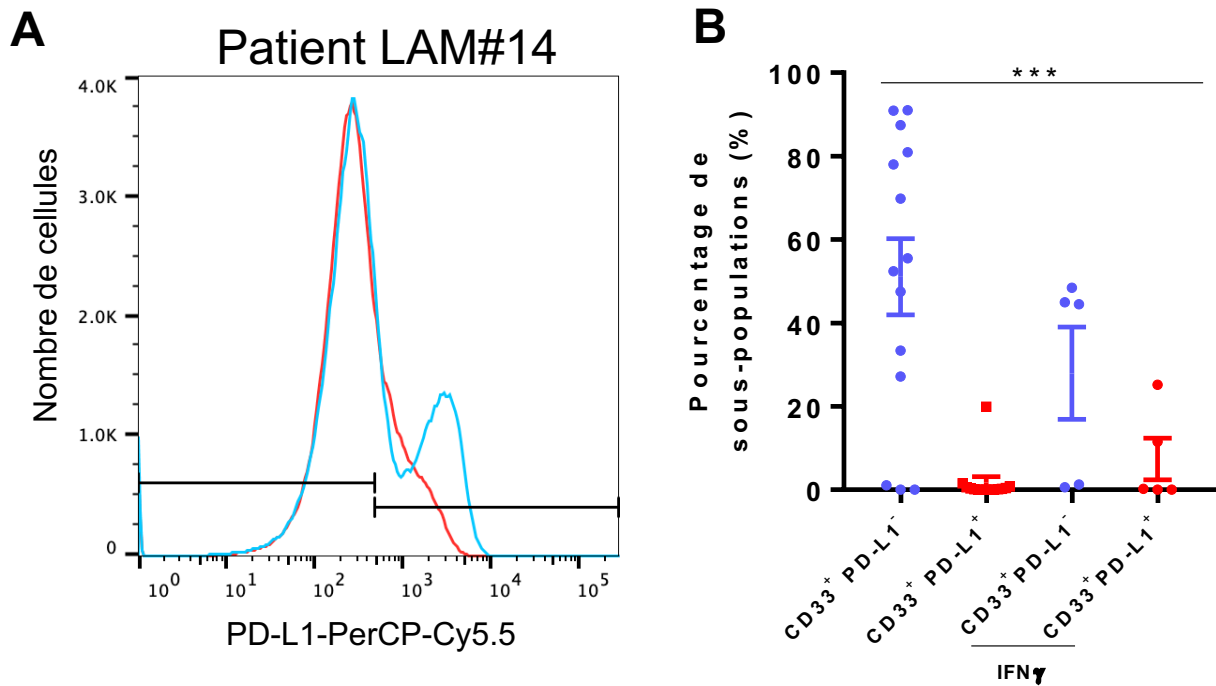


Figure 3 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires CD33 et PD-L1 des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic après traitement à l'IFN γ . (A) Le marqueur de surface PD-L1 est détecté à l'aide de l'anticorps couplé au fluorochrome PerCP-Cy5.5 en condition contrôle (26,4%, rouge) ou après un traitement de 24h à l'IFN γ (35,9%, bleu) pour un patient LAM. Le seuil de positivité de l'anticorps déterminé par l'isotype est représenté par la barre noire. (B) Pourcentage des sous-populations indiquées au sein des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic. Chaque point représente un échantillon de patient en condition contrôle (n=14) ou après un traitement de 24h à l'IFN γ (25ng/mL) (n=5). Les valeurs p sont issues de tests ANOVA univariés comparant les différentes moyennes *** $p < 0,001$.

D'autre part, lorsque l'on analyse à l'aide du ratio d'intensité moyenne de fluorescence (ratio IMF) la présence des marqueurs de surface PD-L1, CD33, HLA-DR et TIM-3 au sein de la population totale (figure 4A) et de la population CD34⁺ CD38⁻ (figure 4B), on observe une plus faible expression de ces marqueurs au sein de la population CD34⁺ CD38⁻ comparée à leur expression au sein de la population totale.

De plus, lorsque l'on rapporte le niveau d'expression de ces mêmes marqueurs (ratio « relatif » d'IMF) au sein des populations CD34⁺ CD38⁻ (figure 4C) et CD34⁺ (figure 4D) en fonction de l'expression des marqueurs de surface au sein de la population non souche CD34⁻, on observe une plus forte expression de PD-L1, CD33, HLA-DR et TIM-3 par les cellules leucémiques non souches.

On observe une hétérogénéité inter-patients pour les populations CD33⁺ CD34⁺ et CD33⁺ PD-L1⁺ et, de même, la population CSL CD34⁺ CD38⁻ varie au sein des populations CD33⁺ et CD33⁻ d'un même patient.

Un immunophénotypage des cellules leucémiques de patients montre que la population CSL CD34⁺ CD38⁻ est minoritaire par rapport aux populations CD34⁺ et CD34⁻.

La population CD33⁺ PD-L1⁺ est minoritaire par rapport à la population CD33⁺ PD-L1⁻, mais un traitement à l'IFN γ (25ng/mL) augmente la population CD33⁺ PD-L1⁺ et diminue la population CD33⁺ PD-L1⁻.

Les sous-populations CD34⁺ CD38⁻, CD34⁺ et CD34⁻ expriment différemment PD-L1, CD33, HLA-DR et TIM-3 comparées à la population totale, ce qui valide l'importance d'étudier ces sous-populations et notamment de comparer les statuts souche et non souche des cellules leucémiques.

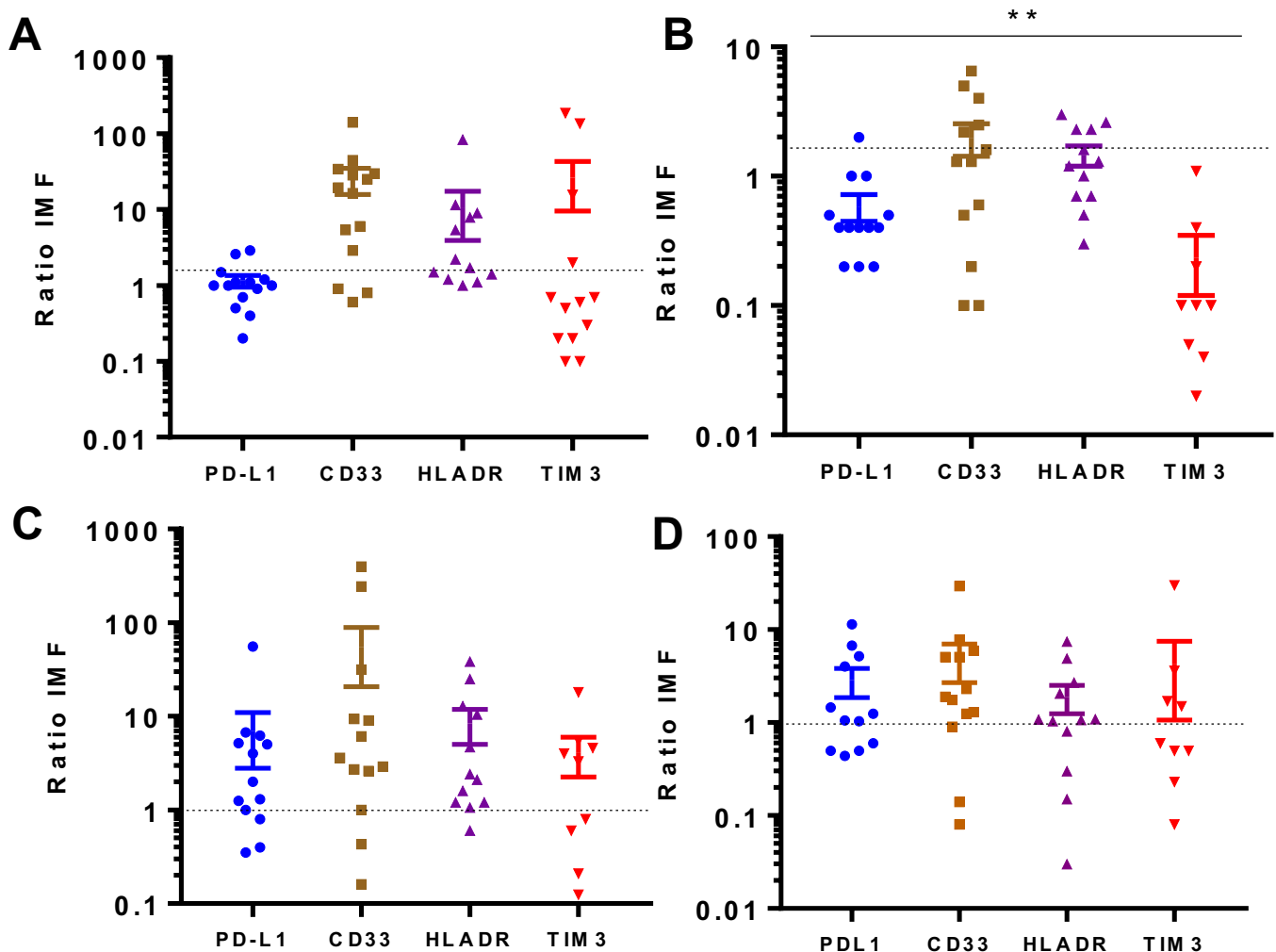


Figure 4 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires des cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic. Ratio d'intensité moyenne de fluorescence (IMF) reflétant la présence des marqueurs de surface (A) de la population totale et (B) des CSL CD34⁺ CD38⁻ en fonction du seuil de positivité de 1,5 déterminé par les isotypes et représenté par la ligne en pointillés. Ratio d'IMF reflétant la présence des marqueurs de surface des cellules non souches CD34⁻ relative à leur présence au sein des populations CD34⁺ CD38⁻ (C) et CD34⁺ (D) représentées par une barre à 1. Chaque point représente un échantillon de patient (n=14). Les valeurs *p* sont issues de tests ANOVA univariés comparant les différentes moyennes ** *p*<0,01.

1.2 Immunophénotypage des LT sains et de patients LAM

Afin de caractériser les différentes sous-populations des LT et déterminer leur stade de différenciation (activés, mémoires, exprimant PD-1 ou non, ...), nous avons utilisé des anticorps couplés à des fluorochromes se liant aux marqueurs membranaires suivants : CD3, CD8, PD-1, CD69, CD25, CD57, CD28, CD45RA et CD27. Le phénotypage des LT à l'aide de ces anticorps nous permet ainsi de mieux sélectionner les sous-populations d'intérêt.

i. Discrimination des LT CD3⁺ CD8⁺ selon leur expression de PD-1

Le profil d'expression des marqueurs de surface des LT de donneurs sains et LAM au diagnostic a été étudié à l'aide de la cytométrie en flux. Les LT sont avant tout phénotypés en fonction de l'expression des marqueurs membranaires CD3⁺ CD8⁺ et PD-1⁺ ou PD-1⁻ afin de discriminer les cellules en fonction de PD-1. La figure 5 montre un exemple d'immunophénotypage de CD8 et PD-1 au sein de la population CD3⁺ chez des PBMC de patient LAM ou d'individu sain. À titre d'exemple, la population CD3⁺ CD8⁺ PD-1⁺ est présente à 1,43% chez le patient LAM#6, tandis qu'elle est de 0,34% chez un donneur sain (figure 5A et B).

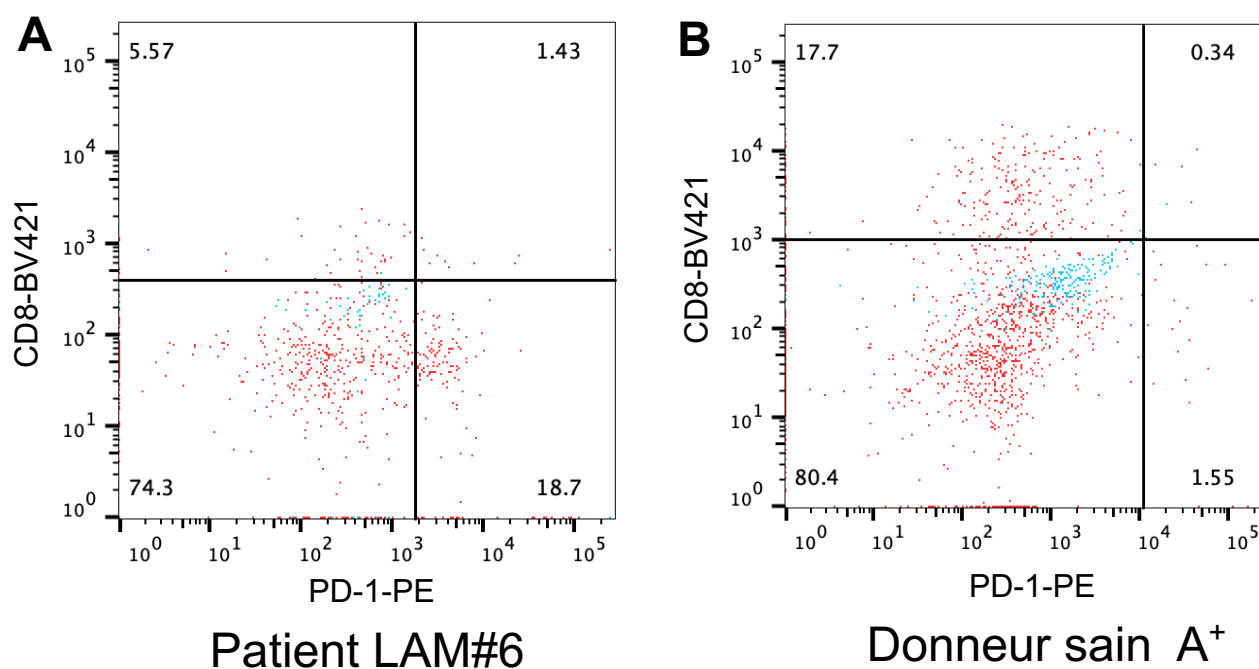


Figure 5 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires CD8 et PD-1 des LT. Graphes bi-paramétriques de l'intensité de fluorescence des cellules (A) de patient LAM au diagnostic et (B) de donneur sain marquées à l'aide des anticorps anti-CD8 et anti-PD-1 couplés respectivement aux fluorochromes BV421 et PE pour deux patients différents (rouge). Les seuils de positivité de cytométrie ont été déterminés en fonction des isotypes de chaque anticorps (bleu).

Concernant l'ensemble des patients LAM étudiés, la proportion de LT LAM CD3⁺ CD8⁺ PD1⁺ est de 1,3±0,6% comparée à la proportion CD3⁺ CD8⁺ PD1⁻ qui est de 1,9±0,8% (n=14). Une activation de 3 jours aux billes CD3/CD28 et à l'IL-2 (0,1µg/mL) et de 4 jours supplémentaires à l'IL-2 après le retrait des billes a permis d'augmenter la population CD3⁺ CD8⁺ PD1⁺ de 4,4±3,3% et de diminuer la population CD3⁺ CD8⁺ PD1⁻ de 1,6±0,7% (n=3) (figure 6A).

Nous avons également phénotypé des LT de donneurs sains (n=10) afin de comparer l'expression des marqueurs de surface CD3, CD8 et PD-1 avec les LT de patients LAM. Sans activation, la proportion de LT sains CD3⁺ CD8⁺ PD1⁺ est de 15,4±8,9% comparée à la proportion CD3⁺ CD8⁺ PD1⁻ qui est de 21,2±7,2%.

La même activation de 3 jours avec des billes CD3/CD28 et de l'IL-2, suivie de 4 jours supplémentaires à l'IL-2 après le retrait des billes permet d'obtenir une population CD3⁺ CD8⁺ PD1⁺ de 24±6,6% et PD1⁻ de 27,5±8,8% (n=11) (figure 6B).

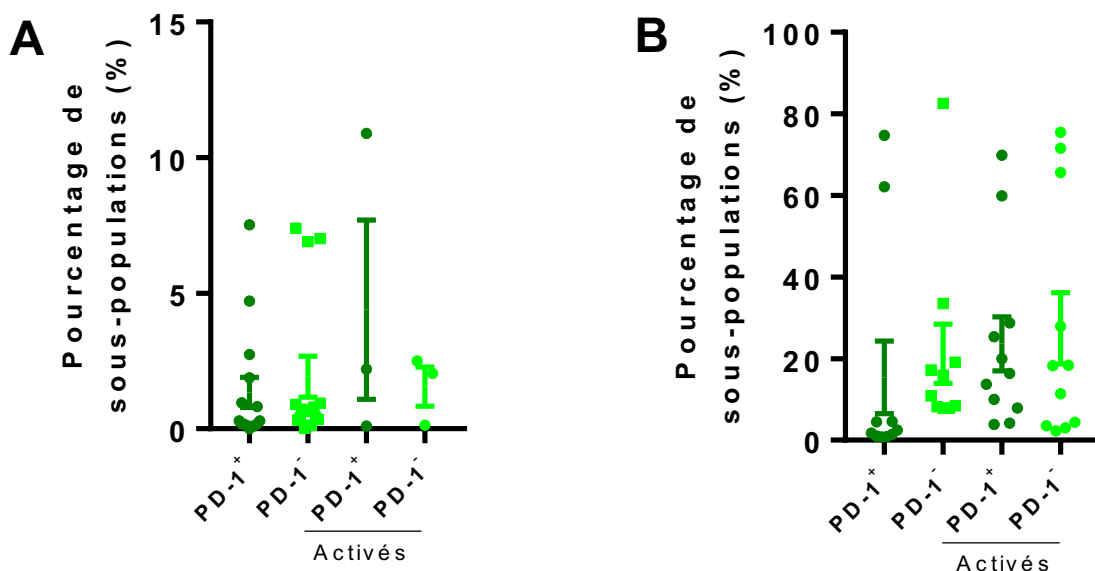


Figure 6 : Analyse par cytométrie en flux du marqueur de surface PD-1 au sein des LT CD3⁺ CD8⁺. Pourcentage des sous-populations PD-1⁺ et PD-1⁻ avant et après activation des LT (A) leucémiques de patients LAM au diagnostic (n=14 et n=3 après activation) et (B) de donneurs sains (n=10 pour les deux conditions). Chaque point représente un échantillon de patient.

ii. Les statuts de différenciation des LT

Nous avons ensuite analysé le statut de différenciation des LT issus de donneurs sains et LAM au sein des populations CD3⁺ CD8⁺ et PD-1⁺ ou PD-1⁻. Pour cela, basés sur l'étude de Le Dieu *et al.* (Le Dieu *et al.* 2009), les anticorps couplés aux fluorochromes suivants ont été utilisés en cytométrie en flux dans le but de discriminer les 5 statuts de différenciation suivants :

- **Activés** CD25⁺ CD69⁺

- **Naïfs** CD45RA^{high} CD27⁺
- **Mémoires** CD45RA^{low} CD27⁺
- **Effecteurs** CD45RA^{high} CD27⁻
- **Effecteurs mémoires** CD45RA⁻ CD27⁻

Au sein des populations CD3⁺ CD8⁺ PD1⁺ et PD1⁻ des LT de patients LAM, il y a respectivement 5,1% vs 16,1% de LT effecteurs, 7,7% vs 36,6% de LT naïfs, 2,5% vs 1,9% de LT mémoires et 84,7% vs 45,5% de LT effecteurs mémoires (figure 7A). On observe également 6% vs 0,5% de LT activés (n=11).

Concernant les LT sains (n=9), au sein des populations CD3⁺ CD8⁺ PD1⁺ et PD1⁻, il y a respectivement 17,6% vs 32,7% de LT effecteurs, 1,9% vs 44,1% de LT naïfs, 0,3% vs 2,7% de LT mémoires et 80,2% vs 32,4% de LT effecteurs mémoires (figure 7B). Les LT activés sont représentés à 0,03% et 0,001% au sein des populations PD-1⁺ et PD-1⁻, respectivement.

Les lymphocytes T des patients LAM présentent une proportion de LT CD3⁺ CD8⁺ PD-1⁺ plus faible que la proportion de PD-1⁻ mais elle est augmentée après une activation *in vitro* à l'aide de billes CD3/CD28 et d'IL-2. Les lymphocytes T CD8⁺ de donneurs sains présentent une population PD-1⁺ également inférieure à la population PD-1⁻ avec ou sans activation.

L'activation *in vitro* des LT de patients LAM et donneurs sains semble donc augmenter l'expression de PD-1.

La proportion de la population de LT PD-1⁺ est plus importante chez les LT sains que chez les LT de patients LAM.

Après un phénotypage du statut de différenciation des LT, on observe qu'il y a une forte proportion de LT effecteurs au sein des LT CD8⁺ PD-1⁻ de patients LAM et de donneurs sains. Il existe une majorité de LT naïfs au sein de la population LT CD8⁺ PD-1⁻ chez les donneurs sains et patients LAM. Les LT CD8⁺ PD-1⁺ de donneurs sains et de patients LAM présentent une majorité de LT effecteurs mémoires avec une très faible représentation de LT naïfs.

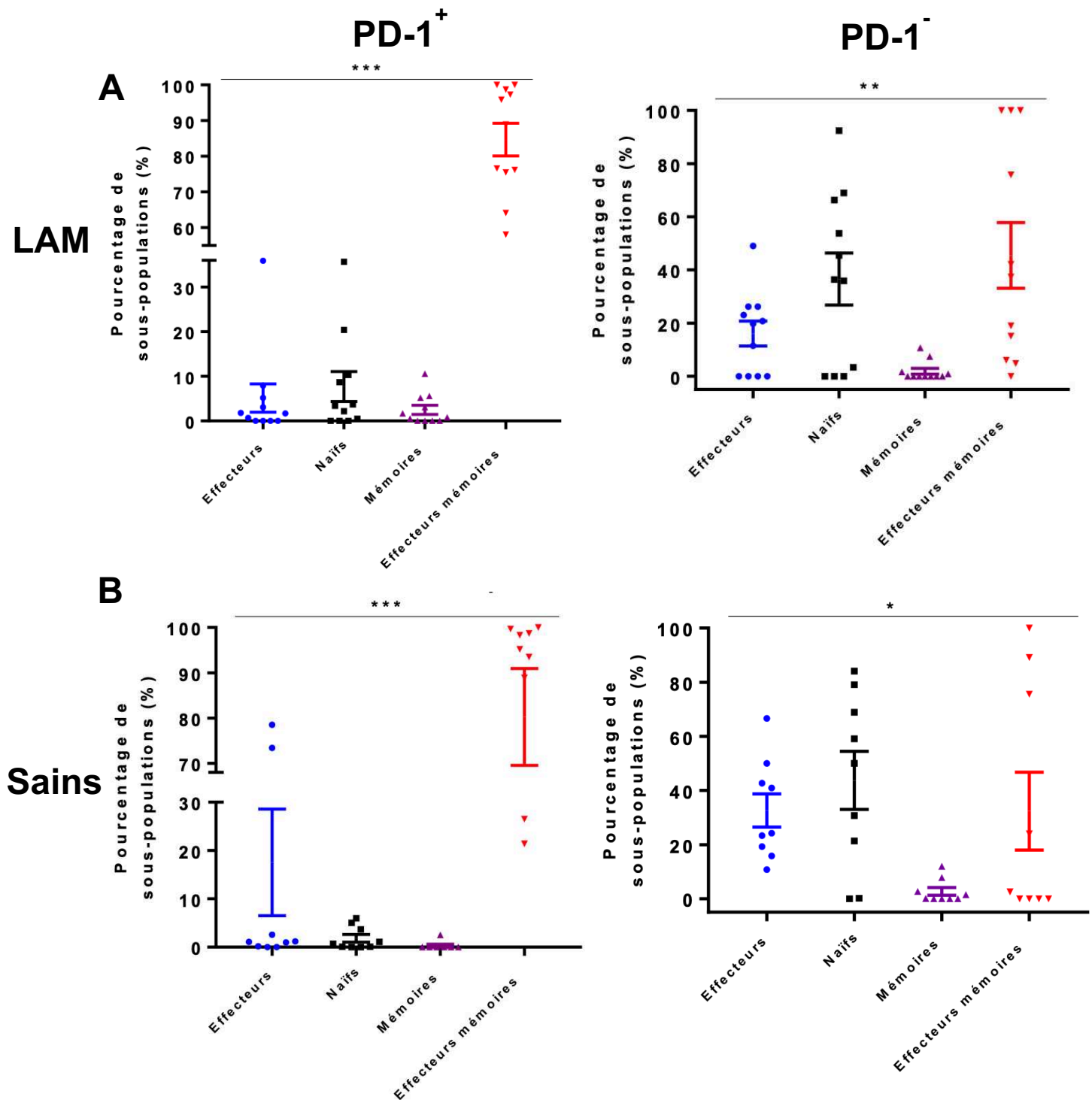


Figure 7 : Analyse par cytométrie en flux des marqueurs extracellulaires des LT. Pourcentage des sous-populations indiquées au sein des LT (A) de patients LAM au diagnostic et (B) de donneurs sains au sein des populations PD-1⁺ ou PD-1⁻. Chaque point représente un échantillon de patient (n=14 pour les patients LAM et n=9 pour les donneurs sains). Les valeurs *p* sont issues de tests ANOVA univariés comparant les différentes moyennes * *p*<0,5 ** *p*<0,1 *** *p*<0,001.

2. Étude de l'activité calcique des cellules isolées en imagerie calcique à l'aide de la microfluidique

Les LT de donneurs sains subissent un tri magnétique afin d'isoler les LT CD8⁺ et sont ensuite activés avec de l'IL-2 et des billes CD3/CD28 pendant 3 jours puis avec de l'IL-2 seul pendant 4 jours supplémentaires après retrait des billes. Les LT de patients LAM, quant à eux, sont triés à l'aide du trieur FACS ARIA en fonction de l'expression des marqueurs membranaires CD3⁺ CD8⁺ et PD-1 afin de discriminer les cellules en fonction de PD-1.

Ce panel de tri ne comporte pas les anticorps couplés à des fluorochromes permettant de discriminer les LT selon leur statut de différenciation car nous avons observé, grâce au phénotypage des échantillons primaires de patients LAM au diagnostic, que les LT CD3⁺ CD8⁺ représentent une population très minoritaire. De ce fait, à l'issue des tris cellulaires, nous obtenons parfois trop peu de cellules pour réaliser les expériences en imagerie calcique. De même, la présence en faible quantité des sous-populations PD-1⁻ et surtout PD-1⁺ ne permet pas systématiquement de discriminer ces deux sous-populations et, selon les patients, nous avons parfois été contraints de trier uniquement les LT CD3⁺ CD8⁺.

Nous avons, dans un premier temps, étudié la signalisation calcique des LT isolés en microfluidique en l'absence de formation de synapse immunologique. Il s'agit de capturer uniquement des LT de donneurs sains ou de LAM triés dans les microsystèmes de microfluidique et de les observer en microscopie après qu'ils aient été chargés avec la sonde Fura2-AM pour analyser leur homéostasie calcique et ainsi comparer l'activité des canaux calciques des LT sains à celle des LT de patients LAM.

L'analyse fonctionnelle de l'activité des canaux SOCs permet d'étudier l'homéostasie calcique des LT isolés. À l'aide de la sonde Fura2-AM, une cinétique de 13 minutes est réalisée au cours de laquelle sont ajoutés de la thapsigargine au bout de 2 minutes, puis du Ca²⁺ extracellulaire au bout de 9 minutes. La thapsigargine est un inhibiteur des pompes SERCA et permet l'augmentation du calcium intracellulaire par déplétion des stocks calciques réticulaires. L'ajout de calcium extracellulaire permet, quant à lui, l'évaluation de l'entrée capacitive de calcium par différents canaux membranaires, notamment les SOCs.

2.1 Étude de l'implication des canaux SOCs dans l'entrée capacitive de Ca²⁺ de LT CD8⁺ de donneurs sains et de patients LAM

L'homéostasie calcique des LT isolés a été étudiée en présence ou en l'absence de l'agent inhibiteur synta66 ciblant les canaux calciques membranaires SOCs.

En présence de l'inhibiteur synta66, un plus faible stock calcique réticulaire ($0,2 \pm 0,04$ vs $0,3 \pm 0,05$ en condition contrôle, figure 8A) ainsi qu'une plus faible entrée capacitive de Ca²⁺ ($0,1 \pm 0,07$ vs $0,7 \pm 0,2$ en condition contrôle, figure 8B et C) sont observés chez les LT sains.

Concernant les LT de patients LAM, le stock calcique réticulaire semble être augmenté après un traitement au synta66 ($0,3 \pm 0,1$ vs $0,1 \pm 0,02$ en condition contrôle, figure 8D), tandis que l'entrée capacitive de Ca^{2+} semble être diminuée ($0,2 \pm 0,1$ vs $0,3 \pm 0,1$ en condition contrôle, figure 8E et F).

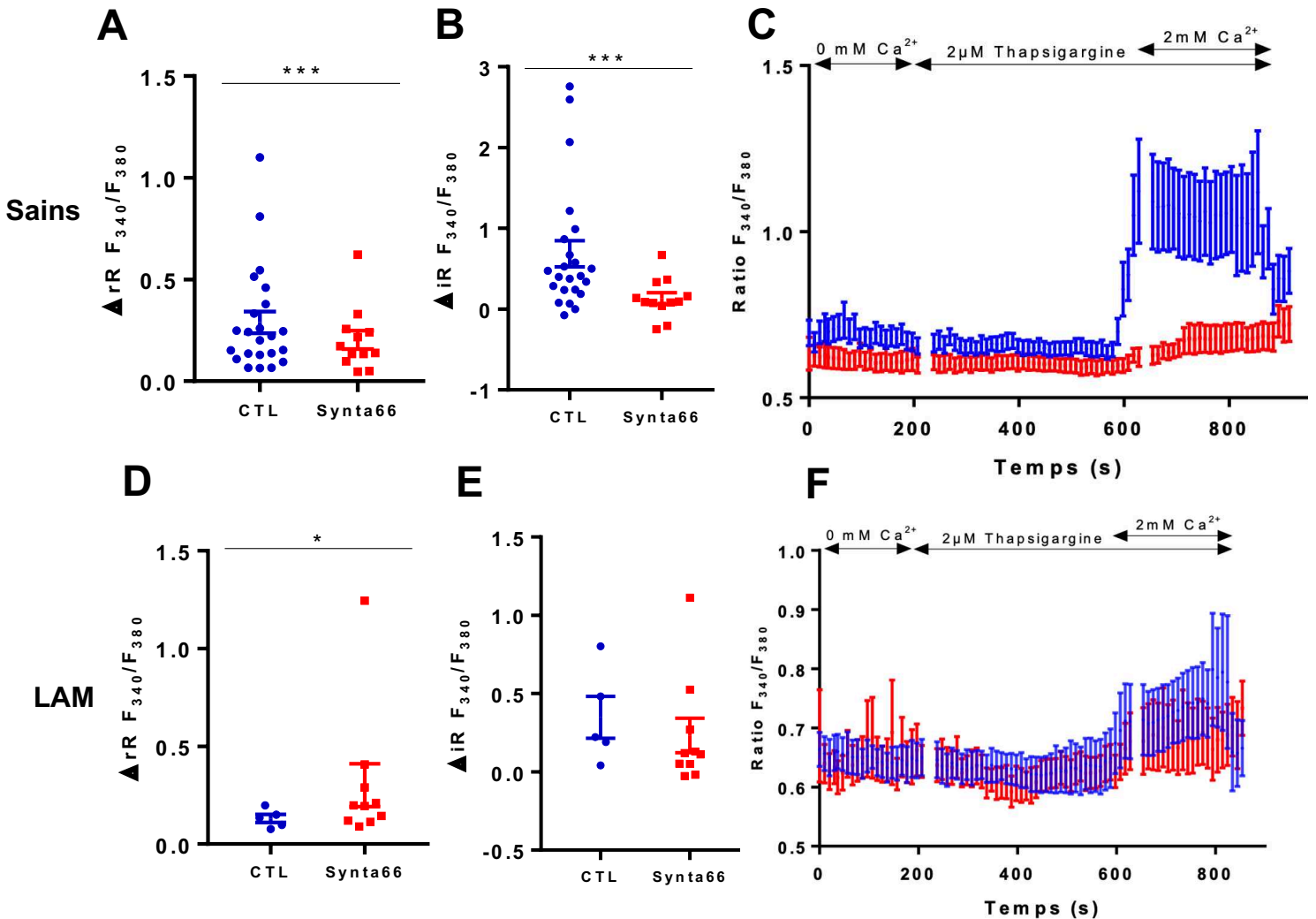


Figure 8 : Analyse de l'activité des canaux SOC dans l'homéostasie calcique de LT isolés en imagerie calcique. (A et D) Le rapport F_{340}/F_{380} (valeur maximale post-thapsigargine - valeur médiane basale) reflète le stock calcique réticulaire au sein de LT $CD3^+ CD8^+$ de donneurs sains et LAM respectivement en réponse à l'application de thapsigargine ($2 \mu M$). (B et E) Le rapport F_{340}/F_{380} (valeur maximale post- Ca^{2+} - valeur médiane basale post-thapsigargine) reflète l'entrée capacitive de Ca^{2+} au sein de LT $CD3^+ CD8^+$ de donneurs sains et LAM respectivement en réponse à l'application de Ca^{2+} extracellulaire ($2 mM$). (C et F) Cinétiques de la concentration cytosolique de Ca^{2+} de LT de donneurs sains et LAM respectivement. Les valeurs représentent la moyenne de l'intensité de fluorescence \pm SEM d'au moins 50 cellules. Les cellules ont été traitées pendant 24h à l'agent inhibiteur des canaux SOC synta66 ($n=12$ pour les LT sains et $n=10$ pour les LT LAM, couleur rouge) ou ont été incubées avec un milieu contrôle ($n=23$ pour les LT sains et $n=5$ pour les LT LAM, couleur bleue). Pour les figures A, B, D et E, chaque point représente un échantillon de patient. Les valeurs p sont issues de tests t de Student comparant les différentes moyennes *** $p < 0,001$, * $p < 0,5$.

L'inhibiteur des canaux calciques synta66 induit une diminution du stock calcique réticulaire des LT sains mais induit une augmentation de ce stock calcique pour les LT de patients LAM. Cette variation entre les LT sains et LT de patients LAM semble montrer un rôle différent du Ca^{2+} dans l'homéostasie calcique des LT sains et LAM.

Par ailleurs, le traitement semble induire une plus faible entrée capacitive de Ca^{2+} pour les LT sains et de patients LAM, ce qui montre bien une implication des canaux SOC dans l'entrée capacitive de Ca^{2+} . Cette diminution semble tout de même moins marquée chez les LT LAM que les LT sains, ce qui laisse supposer une possible implication d'autres canaux que les canaux SOC.

2.2 *Activité des canaux SOC de LT CD8⁺ de donneurs sains et de patients LAM*

Lorsque l'on compare l'activité des canaux calciques des LT sains vs les LT de patients LAM, on observe que le stock calcique réticulaire est diminué chez les cellules de patients LAM ($0,1 \pm 0,02$ (n=5)) comparées aux cellules de donneurs sains ($0,3 \pm 0,05$ (n=23)) (figure 9A). Concernant l'entrée capacitive de Ca^{2+} , elle se trouve également diminuée chez les cellules de patients LAM comparées aux cellules de donneurs sains ($0,3 \pm 0,1$ vs $0,7 \pm 0,2$, respectivement) (figure 9B).

Le stock calcique et l'entrée capacitive de Ca^{2+} des LT LAM CD3⁺ CD8⁺ PD1⁺ et PD1⁻ ont également été analysés et, bien que non significatifs à cause d'un nombre insuffisant d'échantillons de patients LAM testés à ce jour, on remarque que le stock calcique est de 0,2 vs 0,1 pour les LT LAM PD1⁺ et PD1⁻ respectivement (figure 10A), tandis que l'entrée capacitive de Ca^{2+} est de 0,2 vs 2,3 respectivement (figure 10B et C).

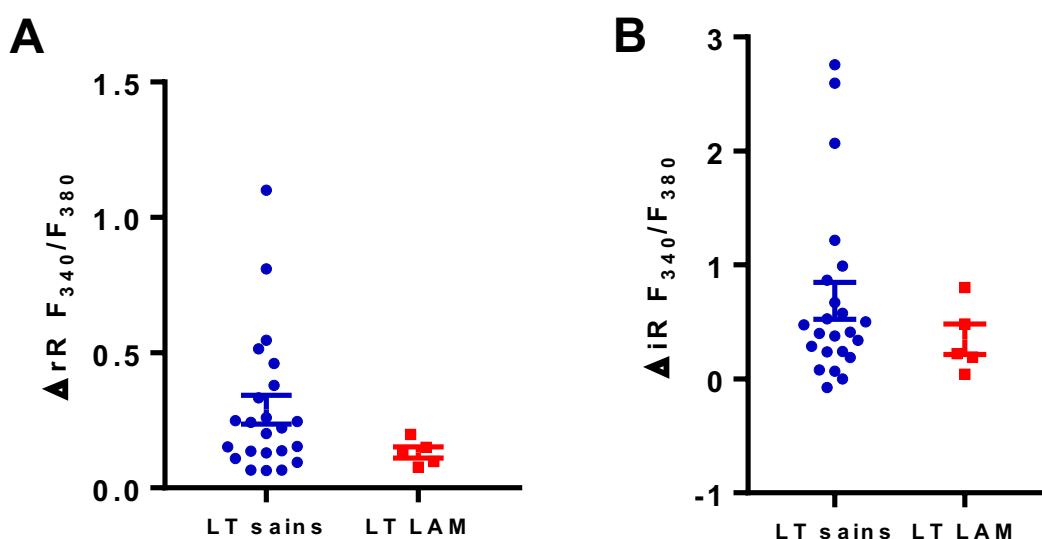


Figure 9 : Analyse de l'activité des canaux SOCs dans l'homéostasie calcique de LT isolés en imagerie calcique. Le rapport F340/F380 reflète (A) le stock calcique réticulaire (valeur maximale post-thapsigargine - valeur médiane basale) et (B) l'entrée capacitive de Ca^{2+} (valeur maximale post- Ca^{2+} - valeur médiane basale post-thapsigargine) au sein de LT CD3^+ CD8^+ de donneurs sains (n=23, bleu) et LAM (n=5, rouge) en réponse à l'application de thapsigargine (2 μM) suivie de Ca^{2+} extracellulaire (2 mM). Chaque point des figures A et B représente un échantillon de patient.

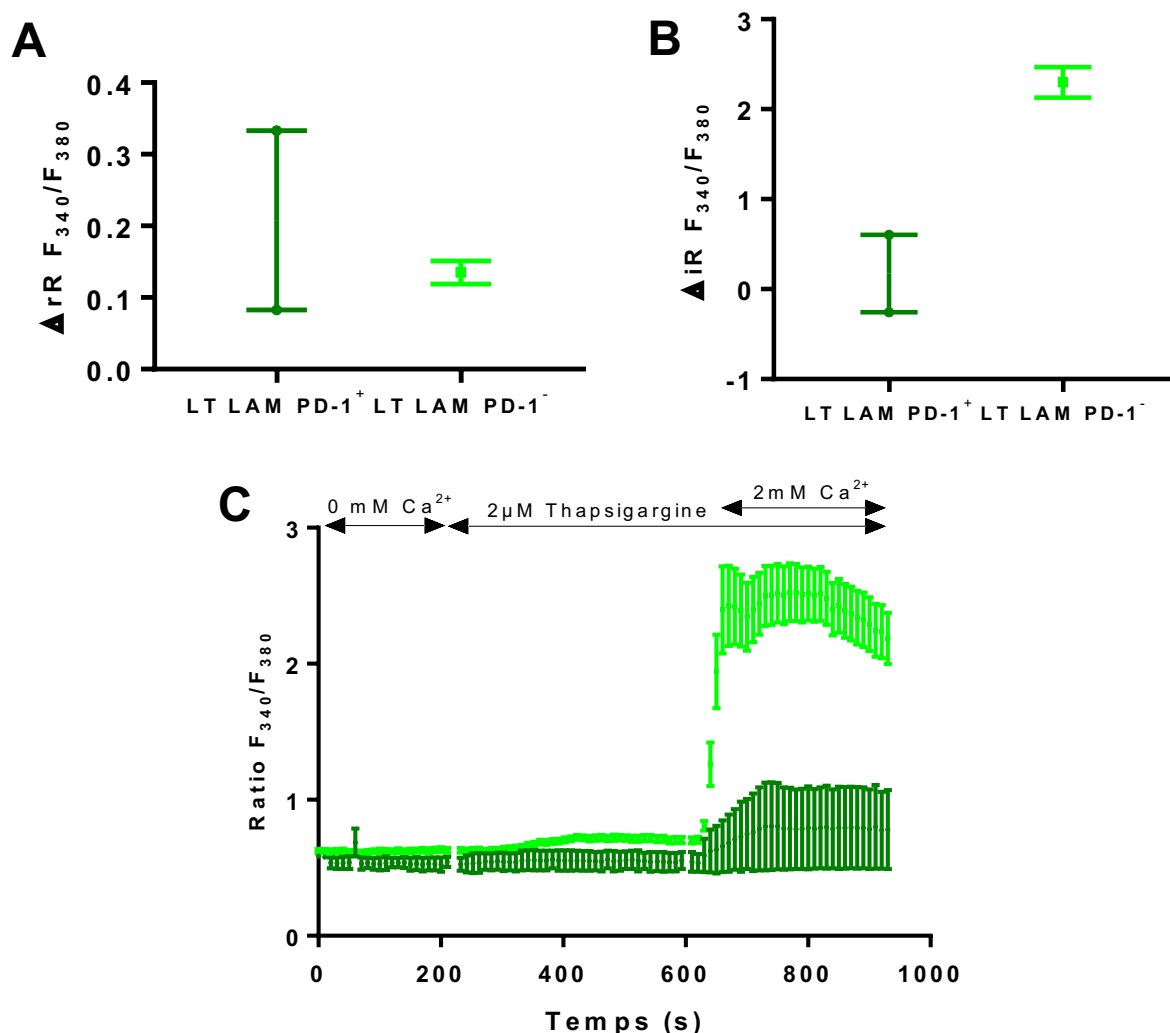


Figure 10 : Analyse de l'activité des canaux SOCs dans l'homéostasie calcique de LT isolés en imagerie calcique. Le rapport F340/F380 reflète (A) le stock calcique réticulaire (valeur maximale post-thapsigargine - valeur médiane basale) et (B) l'entrée capacitive de Ca^{2+} (valeur maximale post- Ca^{2+} - valeur médiane basale post-thapsigargine) au sein de LT CD3^+ CD8^+ de patients LAM PD-1^+ (n=2, vert foncé) et PD-1^- (n=1, vert clair) au diagnostic en réponse à l'application de thapsigargine (2 μM) suivie de Ca^{2+} extracellulaire (2 mM). Chaque point représente un échantillon de patient. (C) Cinétique de la concentration cytosolique de Ca^{2+} . Les valeurs représentent la moyenne de l'intensité de fluorescence +/- SEM d'au moins 50 cellules.

On observe que le stock calcique réticulaire et l'entrée capacitive de Ca^{2+} sont diminués chez les LT de patients LAM comparés aux LT de donneurs sains. Il

semblerait donc que l'activité des canaux calciques SOC's soit diminuée chez les LT de patients LAM comparée à celle de LT de donneurs sains.

Concernant les LT de patients LAM, on remarque que le stock calcique réticulaire est plus élevé pour les PD-1⁺ mais que l'entrée capacitive de Ca²⁺ est plus élevée chez les LT LAM PD-1⁻, ce qui laisse supposer une activité des canaux SOC's amoindrie mais un niveau calcique basal plus élevé chez les LT LAM PD-1⁺.

2.3 Résultats préliminaires sur l'activité des canaux SOC's des cellules leucémiques isolées

Nous avons évalué l'activité calcique des canaux SOC's de cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic en condition contrôle comparée à un traitement au synta66. En condition contrôle, le stock calcique et l'entrée capacitive de Ca²⁺ des cellules leucémiques sont de 0,2±0,02 et 0,8±0,08 (n=58 cellules) respectivement, tandis qu'un traitement au synta66 induit un stock calcique réticulaire et une entrée capacitive de Ca²⁺ de 0,1±0,03 et 0,5±0,03 respectivement (n=33 cellules) (figure 11).

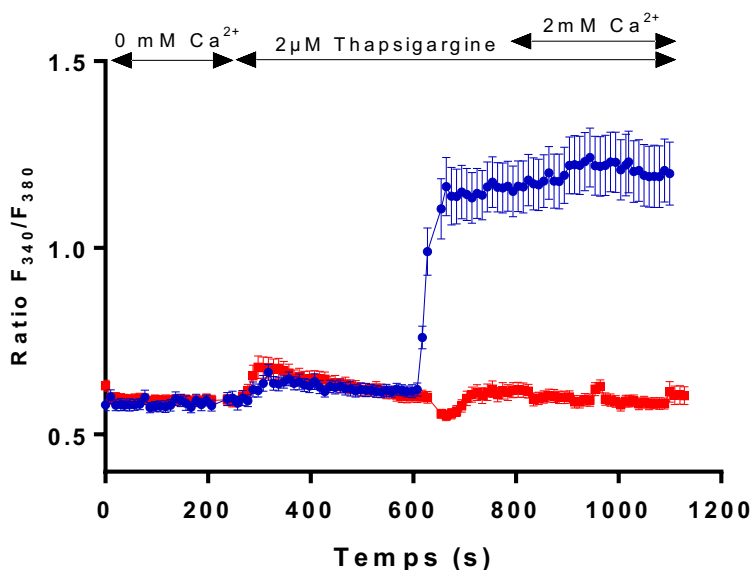


Figure 11 : Analyse de l'activité des canaux SOC's dans l'homéostasie calcique de cellules leucémiques isolées en imagerie calcique. Cinétique de la concentration cytosolique de Ca²⁺. Les valeurs représentent la moyenne de l'intensité de fluorescence +/- SEM d'au moins 50 cellules. Les cellules ont été traitées pendant 24h à l'agent inhibiteur des canaux SOC's synta66 (rouge) ou ont été incubées avec un milieu contrôle (bleu).

De la même manière que pour les LT, les canaux SOC's semblent également être impliqués dans l'entrée capacitive de Ca²⁺ des cellules leucémiques.

3. Étude de l'activité calcique des cellules leucémiques et LT de patients LAM et de LT de donneurs sains après la

formation de synapses immunologiques en imagerie calcique à l'aide de la microfluidique

3.1 Réponse calcique des LT suite à la formation de synapses immunologiques avec des cellules leucémiques

Afin d'évaluer la réponse calcique au cours de la formation de la synapse immunologique, les LT CD8⁺ (après tri ou activation) ont été préalablement chargés avec la sonde calcique ratiométrique Fura-2AM et également avec des superantigènes afin de favoriser la formation de la synapse immunologique avec les cellules leucémiques. Les cellules leucémiques, quant à elles, ont été triées avec un panel similaire à celui utilisé pour leur phénotypage en cytométrie en flux. Cependant, à l'instar du tri des LT, pour certaines expérimentations les sous-populations d'intérêt des cellules leucémiques étaient trop faiblement représentées. Même si la technologie de microfluidique nous permet d'étudier des sous-populations rares avec peu de cellules, obtenir moins de 10 000 cellules à l'issue du tri entrave la réalisation des expérimentations de formation de la synapse immunologique. En effet, suite au tri, les cellules subissent une succession de centrifugations, lavages et marquages pour l'analyse fonctionnelle de leur activité. Une perte significative de cellules complique la réalisation de tests fonctionnels avec certaines populations rares. Il était donc parfois nécessaire de trier les cellules leucémiques avec un nombre réduit de marqueurs extracellulaires, et ceci de manière patient-dépendant. Les sous-populations sont donc parfois moins bien discriminées selon le patient.

Après avoir trié les cellules leucémiques et LT de patients LAM et activé les LT de donneurs sains, il est question de former des synapses immunologiques avec, soit des LT CD8⁺ de donneurs sains activés (condition allogénique), soit des LT du même patient LAM (condition autologue) triés à l'aide du trieur. Les cellules leucémiques ont été marquées avec la sonde membranaire Dil afin de les discriminer des LT lors de l'analyse des images enregistrées en temps réel pendant la formation de la synapse immunologique.

Les cellules sont ensuite injectées dans le dispositif de microfluidique qui permet de mettre en contact les LT CD8⁺ avec les cellules leucémiques. Nous nous assurons qu'il y ait bien un LT CD8⁺ en contact avec une cellule leucémique dans un même piège afin de déterminer le nombre de paires de cellules pour une expérimentation donnée. Un contact entre les deux cellules peut induire la formation d'une synapse immunologique afin de permettre au LT CD8⁺ de lyser la cellule leucémique. Les événements précoces de la formation de la synapse immunologique induisent une activité des canaux SOCs du LT et

c'est pourquoi étudier l'homéostasie calcique des LT nous permet de valider la formation de la synapse immunologique.

Nous monitorons donc pendant une vingtaine de minutes le contact entre les deux cellules afin de valider la formation de la synapse immunologique par une augmentation de l'intensité de fluorescence de la sonde calcique Fura-2AM qui reflète l'augmentation de concentration calcique cytosolique par les canaux SOCs chez le LT.

i. Les LT forment des synapses immunologiques avec les cellules leucémiques

Au sein des dispositifs de microfluidique, nous décidons donc de mettre en contact, soit en condition allogénique des LT de donneurs sains avec des cellules leucémiques, soit en condition autologue des LT LAM avec des cellules leucémiques du même patient afin de comparer l'activité calcique des LT suite à la formation de la synapse immunologique.

Après la mise en contact des LT CD8⁺ sains et des LT CD8⁺ LAM avec des cellules leucémiques, le pourcentage de formation de paires de cellules et de synapses immunologiques avec des LT sains est de $50,8 \pm 6,7\%$ (n=18) et $15,7 \pm 2,3\%$ (n=22) respectivement contre $55,7 \pm 9\%$ et $29 \pm 9,2\%$ respectivement avec des LT LAM (n=13) (figure 12A).

De plus, bien que cela soit non significatif à cause du nombre réduit d'échantillons de patients testés à ce jour, nos résultats préliminaires semblent montrer de plus faibles pourcentages de formation de paires de cellules et de synapses immunologiques avec des LT LAM PD1⁺ (20,5% et 11,5% respectivement) comparés aux pourcentages de formation de paires de cellules et de synapses immunologiques avec des LT LAM PD1⁻ (76,2% et 65,6% respectivement).

ii. Activité calcique des LT suite à la formation de synapses immunologiques

La réponse calcique suite à la formation de la synapse immunologique est de $1,5 \pm 0,3$ pour les LT LAM (n=13) vs $1,8 \pm 0,2$ pour les LT sains (n=13) (figure 12B et C).

Bien que ce soit non significatif à cause d'un nombre insuffisant d'échantillons de patients testés à ce jour, il semblerait que la réponse calcique soit plus faible pour les LT LAM PD1⁺ ($1 \pm 0,3$ (n=2)) comparée à celle des LT LAM PD1⁻ (1,7).

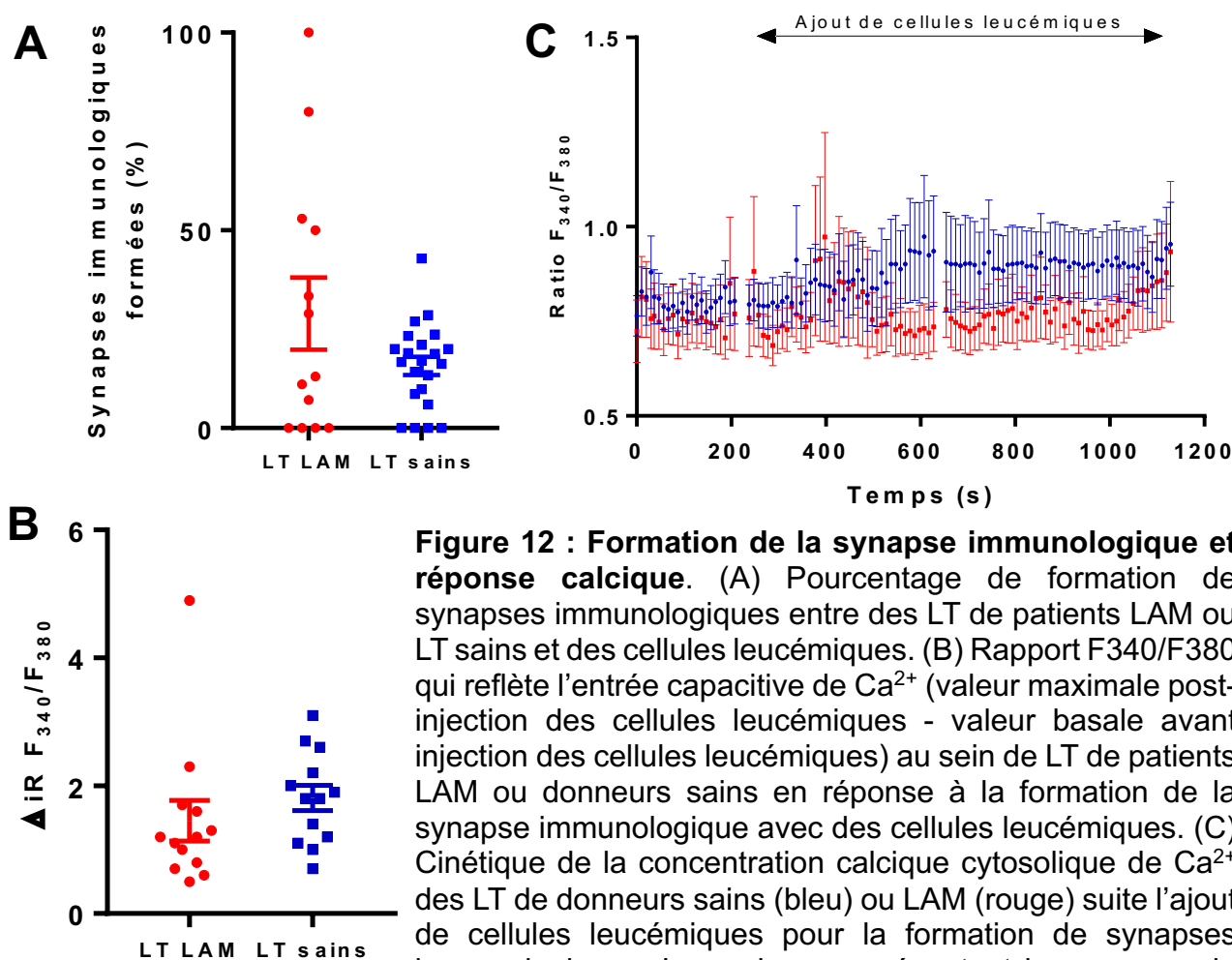


Figure 12 : Formation de la synapse immunologique et réponse calcique. (A) Pourcentage de formation de synapses immunologiques entre des LT de patients LAM ou LT sains et des cellules leucémiques. (B) Rapport F_{340}/F_{380} qui reflète l'entrée capacitive de Ca^{2+} (valeur maximale post-injection des cellules leucémiques - valeur basale avant injection des cellules leucémiques) au sein de LT de patients LAM ou donneurs sains en réponse à la formation de la synapse immunologique avec des cellules leucémiques. (C) Cinétique de la concentration calcique cytosolique de Ca^{2+} des LT de donneurs sains (bleu) ou LAM (rouge) suite l'ajout de cellules leucémiques pour la formation de synapses immunologiques. Les valeurs représentent la moyenne de l'intensité de fluorescence +/- SEM. Chaque point représente un échantillon de patient LAM (n=13) ou de donneur sain (n=13).

Les LT de patients LAM forment plus de synapses immunologiques comparés aux LT de donneurs sains. Par contre, la réponse calcique semble diminuée au sein des LT de patients LAM comparée à celle des LT de donneurs sains.

La formation de synapses immunologiques reste plus faible avec les LT LAM PD-1⁺ comparée à celle des LT LAM PD-1⁻. Aussi, il semble que la réponse calcique soit plus faible au sein des LT qui expriment PD-1.

3.2 Impact d'un traitement à l'Ara-C des cellules leucémiques sur la formation de synapses immunologiques et la réponse calcique des LT

Nous avons ensuite évalué la capacité des LT de donneurs sains à former une synapse immunologique effective avec des cellules leucémiques isolées de patients LAM au diagnostic ayant subi un traitement *in vitro* à l'Ara-C 0,1 μ M pendant 72h.

En effet, les cellules ayant résisté à ce traitement pendant 72h sont considérées comme des cellules leucémiques résistantes et nous permettent ainsi d'étudier la formation de la synapse immunologique et la réponse calcique des LT face à des cellules plus persistantes comparées à des cellules non traitées considérées comme non persistantes.

i. L'Ara-C diminue la formation de synapses immunologiques actives

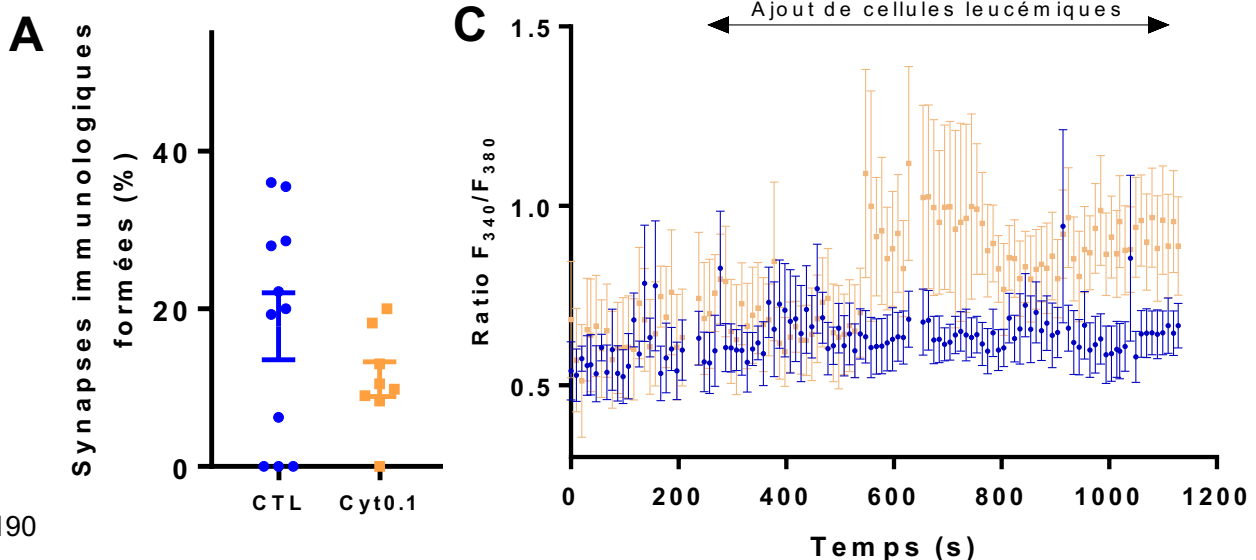
En condition contrôle, les pourcentages de paires de cellules et de synapses immunologiques formées sont de $51,6 \pm 8,2\%$ et $17,8 \pm 4,2\%$ respectivement (n=11).

Suite à un traitement à l'Ara-C $0,1\mu\text{M}$, les pourcentages de paires de cellules et de synapses immunologiques formées sont de $39,5 \pm 9,2\%$ et $11,1 \pm 2,2\%$ respectivement (n=8) (figure 13A).

ii. Les cellules leucémiques traitées à l'Ara-C induisent une réponse calcique différente de la part des LT

La réponse calcique représentée par la variation de l'intensité de fluorescence de la sonde ratiométrique Fura-2AM des LT de donneurs sains est de $1,3 \pm 0,2$ lorsqu'ils sont mis en contact avec des cellules leucémiques non traitées à l'Ara-C (n=11). Après un traitement des cellules leucémiques à l'Ara-C $0,1\mu\text{M}$, la réponse calcique des LT sains mis en contact avec ces cellules leucémiques est de $2 \pm 0,4$ (n=7) (figure 13B et C).

Il y a moins de synapses immunologiques formées suite à un traitement à l'Ara-C $0,1\mu\text{M}$ qu'en condition contrôle. Cependant, on observe une plus forte réponse calcique de la part des LT sains lorsqu'ils sont mis en contact avec des cellules leucémiques traitées à l'Ara-C. Il y a donc une différence de réponse calcique en fonction des cellules leucémiques traitées ou non à l'agent chimiothérapeutique Ara-C, et donc en fonction des cellules persistantes ou non.



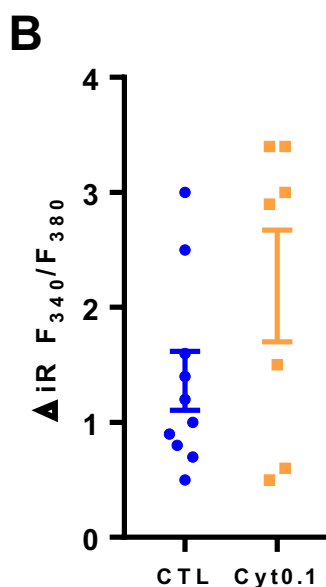


Figure 13 : Impact de l'Ara-C sur la formation de la synapse immunologique et la réponse calcique des LT. (A) Pourcentage de formation de synapses immunologiques entre des LT de donneurs sains et des cellules leucémiques. (B) Rapport F340/F380 qui reflète l'entrée capacitive de Ca^{2+} (valeur maximale post-injection des cellules leucémiques - valeur basale avant injection des cellules leucémiques) au sein de LT de donneurs sains en réponse à la formation de la synapse immunologique avec des cellules leucémiques. (C) Cinétique de la concentration calcique cytosolique de Ca^{2+} des LT de donneurs sains suite l'ajout de cellules leucémiques contrôles (bleu, n=11) ou traitées (beige, n=8) pour la formation de synapses immunologiques. Les valeurs représentent la moyenne de l'intensité de fluorescence +/- SEM. Les cellules leucémiques ont été traitées pendant 72h à l'Ara-C 0,1 μ M ou avec un milieu contrôle. Chaque point représente un échantillon de patient pour les figures A et B.

3.3 Résultats préliminaires sur la réponse calcique des cellules leucémiques traitées à l'Ara-C durant la formation de la synapse immunologique

Nos premières expérimentations consistaient à étudier l'homéostasie calcique des LT avec la sonde ratiométrique Fura-2AM tout en discriminant les cellules leucémiques avec le marqueur membranaire Dil qui ne nous permettait toutefois pas d'étudier leur homéostasie calcique simultanément.

Nous avons donc voulu améliorer notre technique d'étude de la synapse immunologique en imagerie calcique à l'aide de la microfluidique en utilisant 2 sondes calciques avec 2 fluorescences différentes afin d'étudier simultanément l'homéostasie calcique des 2 types cellulaires. Il était donc nécessaire de trouver une sonde calcique compatible avec la sonde Fura-2AM actuellement utilisée pour les LT et nous permettant de discriminer les deux types cellulaires.

Nous avons d'abord testé la sonde calcique Rhod4 mais sa constante de dissociation était finalement trop élevée et ne permettait pas de détecter les changements subtiles de concentration calcique intracellulaire des cellules leucémiques. Nous avons donc finalement testé la sonde Fluo4 qui a une constante de dissociation plus faible et qui permet ainsi de détecter plus finement les changements de concentration calcique.

La sonde Fluo4 est non ratiométrique et est donc moins précise que la sonde Fura-2AM. La variation de l'intensité de fluorescence de cette sonde, qui représente la variation de l'activité calcique cytosolique des cellules leucémiques, doit être divisée par le bruit de fond

de l'enregistrement représenté par la première seconde d'enregistrement. De ce fait, un ratio est obtenu comme pour la sonde Fura-2AM.

Pour 3 expérimentations différentes, nous avons pu enregistrer l'activité calcique cytosolique des LT de donneurs sains et des cellules leucémiques en simultanément.

Comme pour les expérimentations précédentes, les pourcentages de paires de cellules et de synapses immunologiques formées sont respectivement de $74,7 \pm 12,4\%$ et $25,7 \pm 5\%$ en condition contrôle et $41,1 \pm 20,7\%$ et $9,6 \pm 5,3\%$ en condition de traitement à l'Ara-C $0,1 \mu\text{M}$ des cellules leucémiques ($n=3$ pour chaque conditions) (figure 14A).

La réponse calcique, qui correspond à la valeur maximale d'intensité de fluorescence après ajout des cellules leucémiques, est de $1 \pm 0,2$ en condition contrôle pour les LT de donneurs sains (figure 14B) et de $8,4 \pm 3,9$ pour les cellules leucémiques (figure 14C).

Après un traitement à l'Ara-C $0,1 \mu\text{M}$ des cellules leucémiques, la réponse calcique est de $2,3 \pm 1$ pour les LT de donneurs sains (figure 14B et D) et de $32,6 \pm 28,1$ pour les cellules leucémiques traitées (figure 14C et E).

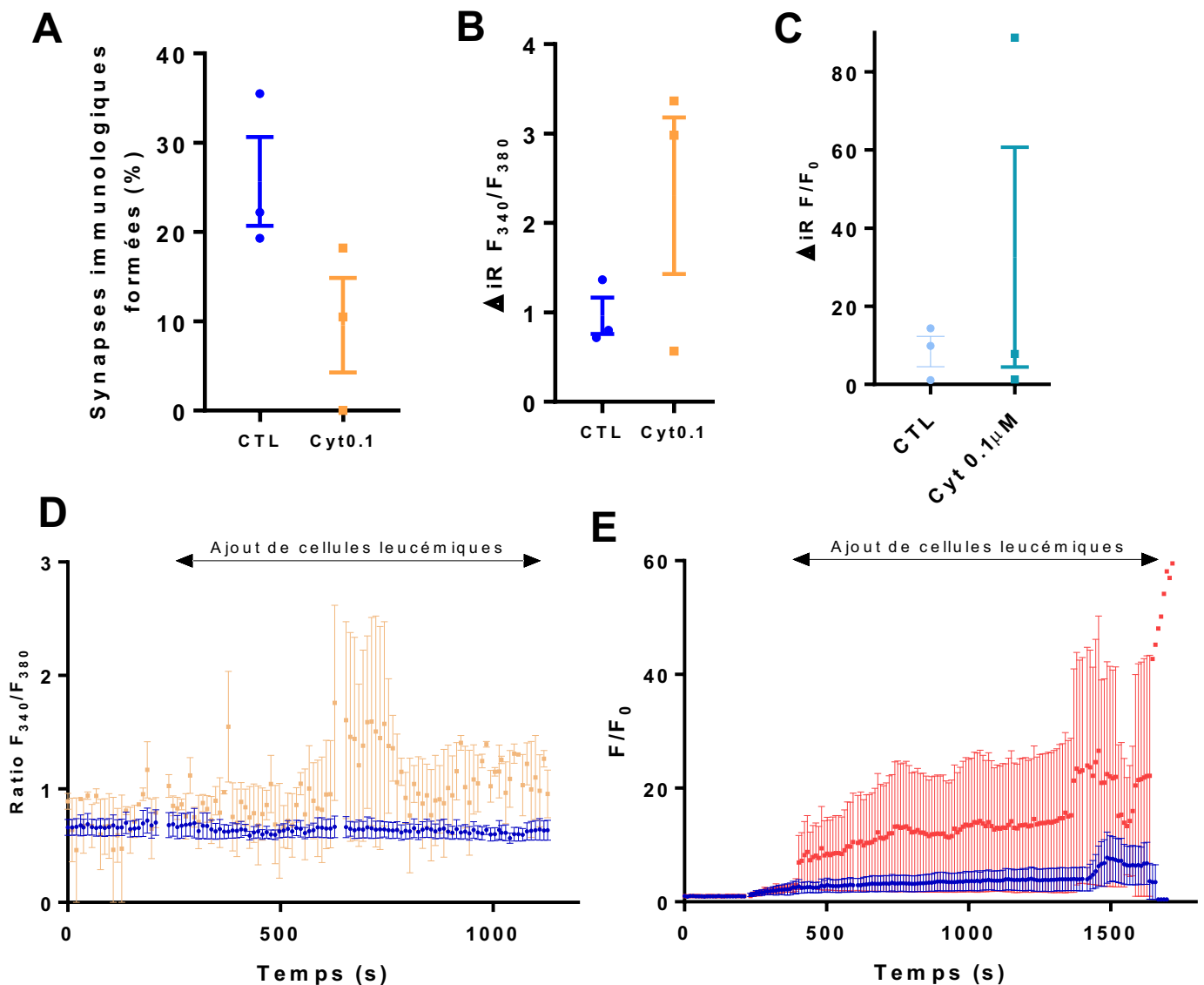


Figure 14 : Impact de l'Ara-C sur la formation de la synapse immunologique et la réponse calcique des cellules leucémiques. (A) Pourcentage de formation de synapses immunologiques entre des LT de donneurs sains et des cellules leucémiques. Rapport F340/F380 (B) ou F/F0 (C) qui reflète l'entrée capacitive de Ca^{2+} (valeur maximale post-injection des cellules leucémiques - valeur basale avant injection des cellules leucémiques) au sein des LT de donneurs sains ou des cellules leucémiques de patients LAM respectivement en réponse à la formation de la synapse immunologique. Cinétique de la concentration calcique cytosolique de Ca^{2+} des LT de donneurs sains (D) ou des cellules leucémiques (E) suite l'ajout de cellules leucémiques contrôles (bleu n=11) ou traitées (orange pour la figure D et rouge pour la figure E, n=8) pour la formation de synapses immunologiques. Les valeurs représentent la moyenne de l'intensité de fluorescence +/- SEM. Les cellules leucémiques ont été traitées pendant 24h à l'Ara-C 0,1 μ M ou avec un milieu contrôle. Chaque point représente un échantillon de patient (n=3) pour les figures A, B et C.

On observe plus de synapses immunologiques formées en condition contrôle où les cellules leucémiques n'ont pas été traitées à l'agent chimiothérapeutique Ara-C 0,1 μ M.

Nous avons pu montrer la même tendance d'activité calcique entre les LT de donneurs sains et les cellules leucémiques avec deux stratégies différentes de détection de la variation de concentration de Ca^{2+} cytosolique à l'aide des sondes Fura-2AM et Fluo4. Un traitement à l'Ara-C 0,1 μ M semble induire une plus grande entrée de calcium dans la cellule.

4. Étude de la lyse cytotoxique et de la sécrétion d'IFN γ par les LT lors de la formation de synapses immunologiques avec les cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic

L'analyse des événements cellulaires qui suivent la mobilisation calcique suite à la formation de la synapse immunologique tels que la lyse cytotoxique et la sécrétion de cytokines par les LT n'a pas été mise au point à ce jour pour être étudiée simultanément avec la signalisation calcique au sein des dispositifs de microfluidique en imagerie calcique.

Nous avons donc réalisé des expériences de formation de la synapse immunologique pour étudier en parallèle en cytométrie en flux la lyse cytotoxique et, à l'aide d'ELISA, la sécrétion de cytokines.

4.1 Les LT de donneurs sains et LAM induisent une lyse cytotoxique

Les cellules leucémiques ont préalablement été incubées avec un marqueur membranaire dans le but de les discriminer des LT. Les LT et cellules leucémiques ont ensuite été mis en contact au ratio 5 :1 par centrifugation et incubés pendant 1h à 37°C avec la sonde P2D2/Pantoxilux qui émet de la fluorescence lorsqu'elle est métabolisée par les granzymes B et caspases sécrétées par les LT CD8⁺ lors de la lyse cytotoxique.

Grâce à la cytométrie en flux, une sélection a été réalisée sur les cellules leucémiques en fonction de leur marqueur membranaire et l'activation du phénomène de lyse cytotoxique a été observée au sein des cellules leucémiques grâce à la sonde Pantoxilux.

La lyse cytotoxique de LT sains est de 69%, 65%, 54,8% et 88,6% selon les conditions LT non activés ou activés pendant 3 jours, 7 jours et 14 jours respectivement (tableau 9).

Pour ce qui est des LT de patients LAM, la lyse cytotoxique est réalisée à 63,9% ou 54,7% pour les LT PD1⁺ et PD1⁻ respectivement (tableau 10).

Les LT de donneurs sains ont une efficacité de lyse similaire pour les conditions non activés ou activés durant 3 jours avec des billes CD3/CD28 et de l'IL-2. Les LT de donneurs sains activés pendant 7 jours semblent être ceux réalisant une lyse moins efficace comparés aux LT activés pendant 14 jours qui semblent être les LT réalisant une meilleure lyse.

Concernant les LT de patients LAM, il semble qu'il n'y ait pas de différence de capacité de lyse entre les LT LAM PD-1⁺ et PD-1⁻.

4.2 Évaluation de la sécrétion d'IFN γ par les LT CD8⁺ de donneurs sains et LAM

i. Les LT de donneurs sains

Le surnageant des LT sains a été collecté avant et après leur activation afin d'étudier la différence de sécrétion d'IFN γ .

On observe que le pic de sécrétion d'IFN γ est atteint chez des LT sains activés pendant 7 jours (6,1 pg/mL), soit le protocole que nous utilisons actuellement pour réaliser nos expérimentations en imagerie calcique. La plus faible sécrétion d'IFN γ est cependant obtenue après 14 jours d'activation (1,5 pg/mL), ce qui est presque équivalent à la sécrétion d'IFN γ par des LT non activés (1,6 pg/mL). La sécrétion d'IFN γ par les LT activés pendant 3 et 10 jours est cependant identique (2,5 pg/mL) (tableau 9).

ii. *Les LT de patients LAM au diagnostic*

Le surnageant des LT de patients LAM au diagnostic a été collecté après tri ou après activation. La sécrétion la plus importante d'IFN γ est réalisée par les LT de patients LAM activés (2,6 pg/mL), contrairement aux LT de patients LAM non activés et LT CD3 $^+$ CD8 $^+$ PD1 $^+$ qui ne sécrètent que 0,8 et 1 pg/mL d'IFN γ respectivement (tableau 10).

iii. *Sécrétion de cytokines durant la formation de la synapse immunologique et de la lyse cytotoxique*

Le surnageant a également été collecté après la lyse cytotoxique entre des cellules leucémiques et des LT de donneurs sains et de LAM CD3 $^+$ CD8 $^+$ PD-1 $^+$ et PD-1 $^-$. La sécrétion d'IFN γ est plus forte lors de la lyse cytotoxique avec des LT de patient LAM CD3 $^+$ CD8 $^+$ PD-1 $^+$ (6,9 pg/mL) et plus faible lors de la lyse cytotoxique avec des LT de donneurs sains activés ou non (0,4 pg/mL pour les deux conditions) (tableau 11).

LT sains	Non activés	J3	J7	J10	J14
% lyse	69	65	54,8	N.D	88,6
IFN γ (pg/mL)	1,6	2,5	6,1	2,5	1,5

Tableau 9 : Pourcentage de lyse cytotoxique (%) et de sécrétion d'IFN γ (pg/mL) par les LT de donneurs sains.

LT LAM	PD-1 $^+$	PD-1 $^-$	Activés	Non activés
% lyse	63,9	54,7	N.D	N.D
IFN γ (pg/mL)	1	N.D	2,6	0,8

Tableau 10 : Pourcentage de lyse cytotoxique (%) et de sécrétion d'IFN γ (pg/mL) par les LT de patients LAM au diagnostic.

Pendant la lyse	PD-1 $^+$	PD-1 $^-$	LT sains non activés	LT sains activés
IFN γ (pg/mL)	6,9	2,9	0,4	0,4

Tableau 11 : Sécrétion d'IFN γ (pg/mL) par les LT de patients LAM au diagnostic et donneurs sains suite à la lyse cytotoxique.

On observe que les LT de donneurs sains activés pendant 7 jours et les LT LAM activés sont les LT qui sécrètent le plus d'IFN γ en condition normale.

Pendant la lyse cytotoxique, ce sont les LT LAM PD1 $^+$ qui semblent sécréter le plus d'IFN γ .

Article n°2

Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure

AVANT-PROPOS

Il avait été montré précédemment que l'activité et l'expression de la protéine ATP binding cassette subfamily B-member 1 (ABCB1) étaient liés à un mauvais pronostic et à la proportion du compartiment des CSL dans les LAM.

Bien que l'importance du rôle du calcium dans les dysfonctionnements liés au cancer soit connue, les mécanismes sont, eux, à ce jour peu compris et notamment dans les LAM (Boyer *et al.* 2019). La principale voie de signalisation permettant l'entrée de calcium dans la cellule est le SOCE qui est modulé par les canaux SOCs ORAI. Il avait d'ailleurs été montré auparavant que ORAI1 modulait le SOCE dans les lignées cellulaires cancéreuses et jouait un rôle dans la prolifération et la chimiorésistance (Park *et al.* 2009).

Des études ont aussi montré une variation de l'expression de NFAT, acteur clé de la voie de signalisation principale modulée par le calcium, dans les cellules primaires de LAM selon leur stade de différenciation et la progression de la maladie : NFAT semble être surexprimé dans les cellules leucémiques primaires lors de la rechute comparée au diagnostic (Li *et al.* 2016).

Nous avons publié l'article « *Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure* » en mai 2022 dans le journal *International Journal of Molecular Sciences*. Cet article, présenté ici, démontre l'implication du canal calcique ORAI1 dans l'entrée capacitive de calcium au sein de lignées cellulaires humaines de LAM et des cellules primaires de patients LAM selon le statut de différenciation, l'activité ABCB1 et la proportion du compartiment des CSL. La contribution de ORAI1 dans l'engagement du cycle cellulaire des cellules de patients LAM et leur résistance à l'apoptose contre le traitement à l'Ara-C est également mise en évidence.

Cette étude a permis de démontrer que les gènes *ORAI1* et *ABCB1* sont surexprimés dans les PBMC de patients LAM comparés à des cellules de donneurs sains. Un séquençage à haut débit de l'ARN réalisé par l'équipe de Tyner *et al.* sur une cohorte d'échantillons de patients LAM au diagnostic (n=439) disponible dans une banque de données publiques (<https://www.cbioportal.org>) (Tyner *et al.* 2018) a été utilisé pour analyser l'expression des gènes d'intérêt. Notre analyse a montré (i) une augmentation de l'expression de *ORAI1* et, à *contrario*, une expression diminuée de *ABCB1* associées aux stades tardifs de la maladie et (ii) une diminution de l'expression de *ORAI1* et une augmentation de l'expression de *ABCB1* dans la classification risques pronostics défavorables de la maladie.

L'analyse de l'expression de gènes liés à la différenciation des LAM (*CD33*) et la régulation du cycle cellulaire (*CDK4* responsable de la transition G0/G1) a ensuite été réalisée. Chez des cellules de patients LAM *ORAI1^{low}* et *ABCB1^{high}*, on observe une plus faible expression de *CD33* et *CDK4*, tandis que chez les échantillons de patients LAM exprimant faiblement *ABCB1*, on observe une surexpression de plusieurs marqueurs de cellules souches leucémiques et une sous-expression de *ORAI1*.

Cet article montre donc qu'il existerait un lien entre une forte expression de *ABCB1* et une sous expression de *ORAI1* avec (i) un stade indifférencié de la LAM, (ii) une plus faible expression de gènes régulateurs de la transition du stade G0 au stade G1 du cycle cellulaire, (iii) une plus forte expression de gènes liés au phénotype cellule souche leucémique et (iv) un mauvais pronostic pour les patients.

Dans un autre temps, cette étude met en évidence le rôle de *ORAI1* dans le SOCE des cellules leucémiques présentant une forte activité *ABCB1* et/ou un enrichissement en marqueurs de cellules souches en ayant recours aux lignées cellulaires humaines de LAM KG1 et U937 présentant des caractéristiques opposées concernant (i) le stade de différenciation, (ii) l'expression de *ABCB1* et (iii) la taille du compartiment des CSL.

Il a été montré par qPCR et cytométrie en flux que la lignée cellulaire LAM immature KG1 surexprime les gènes associés aux CSL et *ABCB1* et est constituée d'une sous-population de CSL *CD34⁺ CD38⁻* importante, contrairement à la lignée cellulaire monocyttaire différenciée U937 qui montre une sous-expression des marqueurs de CSL, une diminution de l'expression du gène *ABCB1* et une faible population *CD34⁺ CD38⁻*.

Nous avons montré que les cellules présentant une forte activité des pompes *ABCB1* (*Rho123^{low}*) ont une absence ou faible expression de la protéine nucléaire Ki67 exprimée durant le cycle cellulaire, ce qui est donc associé à une quiescence ou un cycle ralenti de ces cellules.

Il a également été mis en évidence un enrichissement en gènes marqueurs de cellules souches chez les cellules *Rho123^{low}* des deux lignées cellulaires, dont le gène *ABCB1*. De même, il existe un enrichissement en marqueurs de surface caractéristiques du phénotype de cellules souches *CD34⁺ CD38⁻* dans le compartiment *Rho123^{low}* des deux lignées cellulaires. Le compartiment cellulaire *Rho123^{low}* reflète donc des caractéristiques communes concernant l'activité *ABCB1* et le phénotype CSL.

La contribution de *ORAI1* dans le SOCE a été validée par cytométrie en flux chez les lignées cellulaires KG1 et U937 chargées avec la sonde calcique ratiométrique Indo-AM et, soit traitées au synta66 (un inhibiteur des canaux SOCs), soit transfectées avec un siRNA

dirigé contre *ORAI1* montrant une diminution de l'entrée capacitive de calcium dans la cellule. De plus, il a été observé que le niveau d'expression du canal calcique *ORAI1* se trouve diminué chez les cellules Rho123^{low} des deux lignées, ce qui est corrélé avec une plus faible entrée capacitive de calcium.

La cytarabine est l'agent chimiothérapeutique utilisé en clinique pour le traitement des LAM et nous avons testé son impact sur les lignées U937 et KG1 et cellules primaires afin de déterminer le rôle et la contribution de l'activité de ABCB1 et de la proportion des CSL dans la réponse à ce traitement.

Un traitement de 24h à l'Ara-C inhibe la prolifération des cellules U937 et KG1 de manière dose-dépendante, cependant les cellules KG1, qui présentent une plus forte activité ABCB1 et une plus grosse proportion de CSL, semblent être moins sensibles que les cellules U937 en présentant une accumulation en phase G1 du cycle cellulaire et une faible augmentation de la mort cellulaire.

Le traitement à l'Ara-C augmente la proportion de cellules Rho123^{low} et diminue la proportion de cellules Rho123^{high} de manière dose-dépendante au sein de la lignée U937 mais pas dans la lignée KG1. Les cellules engagées dans la mort cellulaire sont donc celles présentant une faible activité ABCB1, tandis que les cellules CD34⁺ CD38⁻ et Rh123^{low} sont plus résistantes à l'Ara-C.

Chez les cellules chimiorésistantes KG1 Rho123^{low}, un traitement à l'Ara-C induit une augmentation de l'expression du gène *ORAI1* et de l'entrée capacitive de calcium de manière dose-dépendante. Les cellules chimiosensibles U937 Rho123^{high} montrent une diminution de l'expression du gène *ORAI1* ainsi qu'une diminution plus marquée du SOCE. L'augmentation de l'activité des SOCs pourrait donc être liée à des mécanismes de résistance chez les cellules de patients LAM.

Du fait de son lien avec la signalisation calcique, la localisation de NFAT a également été étudiée. NFAT est cytoplasmique au sein des KG1 et l'Ara-C induit la translocation de NFAT au noyau, tandis que parmi les U937 NFAT est majoritairement nucléaire mais montre une prédominance cytoplasmique après un traitement à l'Ara-C.

De manière intéressante, les résultats et différences que nous avons observés entre les lignées KG1 et U937 au niveau de (i) la modulation de l'expression de *ORAI1* et de l'activité du SOCE et (ii) la localisation de NFAT ont également été observés au sein de cellules primaires de patients LAM au diagnostic présentant les mêmes caractéristiques que les cellules KG1 ou U937.

Dans cette étude, nous présentons de nouvelles données soutenant que les canaux calciques ORAI1 interviennent dans l'entrée capacitive de calcium chez les lignées cellulaires LAM humaines et les cellules primaires de patients. Nous montrons qu'ORAI1/SOCE joue un rôle dans la prolifération des cellules de LAM et dans l'engagement du cycle cellulaire G0–G1 selon le phénotype CSL.

Nous démontrons également un lien entre l'expression et/ou l'activité d'*ORAI1* et le stade de différenciation des cellules de LAM, l'activité ABCB1 et le compartiment des CSL. De plus, nos données suggèrent que le traitement à l'Ara-C module le SOCE dans les lignées cellulaires de LAM et les cellules primaires *via* la régulation de l'expression de *ORAI1*.



Article

Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure

Clara Lewuillon ¹, Aurélie Guillemette ¹, Sofia Titah ¹, Faruk Azam Shaik ^{2,3}, Nathalie Jouy ⁴,
Ossama Labiad ¹, Valerio Farfarello ^{5,6}, Marie-Océane Laguillaumie ¹, Thierry Idziorek ¹,
Adeline Barthélémy ¹, Pauline Peyrouze ¹, Céline Berthon ¹, Mehmet Cagatay Tarhan ^{3,7}, Meyling Cheok ¹,
Bruno Quesnel ^{1,†}, Loïc Lemonnier ^{5,6,*} and Yasmine Touil ^{1,*}

- ¹ CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR 9020, UMR-S 1277—Canther—Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Université de Lille, F-59000 Lille, France; clara.lewuillon@inserm.fr (C.L.); aurelie.guillemette@inserm.fr (A.G.); sofia.titah@gmail.com (S.T.); ossama.labiad@inserm.fr (O.L.); marie-oceane.laguillaumie@inserm.fr (M.-O.L.); thierry.idziorek@inserm.fr (T.I.); ade.barthelemy@gmail.com (A.B.); pauline.peyrouze@inserm.fr (P.P.); celine.berthon@chu-lille.fr (C.B.); meyling.cheok@inserm.fr (M.C.); bruno.quesnel@chu-lille.fr (B.Q.)
- ² Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), F-59000 Lille, France; farukaz29@gmail.com
- ³ LIMMS/CNRS-IIS IRL2820, The University of Tokyo, Tokyo 153-8505, Japan; cagatay.tarhan@junia.com
- ⁴ UMS 2014/US41 Plateformes Lilloises En Biologie Et Sante, Université de Lille, F-59000 Lille, France; nathalie.jouy@inserm.fr
- ⁵ Inserm, U1003-PHYCEL-Physiologie Cellulaire, Université de Lille, F-59000 Lille, France; valerio.farfariello@inserm.fr
- ⁶ Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Université de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
- ⁷ CNRS, Centrale Lille, Junia, Université Polytechnique Hauts-de-France, UMR 8520—IEMN—Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie, Université de Lille, F-59000 Lille, France
- * Correspondence: loic.lemonnier@inserm.fr (L.L.); yasmine.touil@inserm.fr (Y.T.)
- † Should be considered joint senior authors.



Citation: Lewuillon, C.; Guillemette, A.; Titah, S.; Shaik, F.A.; Jouy, N.; Labiad, O.; Farfarello, V.; Laguillaumie, M.-O.; Idziorek, T.; Barthélémy, A.; et al. Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5555. <https://doi.org/10.3390/ijms23105555>

Academic Editor: Michio Asahi

Received: 15 April 2022

Accepted: 13 May 2022

Published: 16 May 2022

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



Copyright: © 2022 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/>).

Abstract: Acute myeloid leukemia (AML) is a hematological malignancy with a high risk of relapse. This issue is associated with the development of mechanisms leading to drug resistance that are not yet fully understood. In this context, we previously showed the clinical significance of the ATP binding cassette subfamily B-member 1 (ABCB1) in AML patients, namely its association with stemness markers and an overall worth prognosis. Calcium signaling dysregulations affect numerous cellular functions and are associated with the development of the hallmarks of cancer. However, in AML, calcium-dependent signaling pathways remain poorly investigated. With this study, we show the involvement of the ORAI1 calcium channel in store-operated calcium entry (SOCE), the main calcium entry pathway in non-excitable cells, in two representative human AML cell lines (KG1 and U937) and in primary cells isolated from patients. Moreover, our data suggest that in these models, SOCE varies according to the differentiation status, ABCB1 activity level and leukemic stem cell (LSC) proportion. Finally, we present evidence that ORAI1 expression and SOCE amplitude are modulated during the establishment of an apoptosis resistance phenotype elicited by the chemotherapeutic drug Ara-C. Our results therefore suggest ORAI1/SOCE as potential markers of AML progression and drug resistance apparition.

Keywords: calcium; SOCE; AML; ORAI1; ABCB1; leukemic stem cells; NFAT; Ara-C

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a complex hematological malignancy characterized by defective maturation of myeloid primitive cells (blasts). Because AML disease displays genetic, epigenetic and subclonal heterogeneity, it leads to high phenotypic variability,

decreasing therapeutic efficiency. Current intensive chemotherapy combining cytarabine (Ara-C) with anthracycline molecules induces complete remission (<5% blasts in the bone marrow) in 70% of patients. Moreover, patients can now benefit (i) from targeted therapies, as well as in cases of unfavorable prognostic factors or even refractory disease, and (ii) from allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplants or donor lymphocyte transfusion. Despite these tremendous efforts to improve therapeutic efficiency, AML related to relapse leading to death still occurs in more than 50% of cases within 5 years, and these numbers increase up to 80% for subjects over 80 years of age [1]. Mechanisms of anti-leukemia drug resistance that could explain treatment failures have, however, not yet been fully elucidated.

We have previously shown the clinical significance of ATP binding cassette subfamily B-member 1 (ABCB1), also known as permeability glycoprotein and multidrug resistance (P-gp or MDR1), in a cohort of patients with de novo AML [2]. ABCB1 activity and expression were linked to a worse prognosis and leukemic stem cell (LSC) compartment proportion. However, we showed that ABCB1 does not directly mediate chemotherapy resistance and can represent a bystander effect related to other chemoresistance mechanisms [2]. Deciphering these mechanisms related to the ABCB1 phenotype and underlying chemoresistance in AML is crucial to better eradicate disease relapse, which is particularly frequent in this hematological malignancy.

Dysregulation in calcium signaling and/or homeostasis affects numerous cellular functions and has been shown to be involved in cancer initiation and progression. Altered calcium signaling can lead to cancer development via its impact on various processes, including gene transcription, regulation of cell cycle engagement, proliferation, differentiation and apoptosis, all of which potentially contribute to the development of resistance to cancer therapies [3].

One of the main calcium entry pathways into cells is store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), also known as capacitative calcium entry, mediated by store-operated channels (SOCs). SOCE involves the activation of plasma membrane ORAI calcium channels [4]. We and others have previously shown that ORAI1 mediates SOCE in cancer cell lines and plays a role in proliferation and chemoresistance [5–7].

Alterations in calcium signaling have been extensively studied in solid cancers [3]. In hematological malignancies such as myeloid leukemia, few studies have reported data regarding dysregulation in calcium signaling pathways and the associated cellular functions [8]. In AML, the roles of ORAI calcium channels have rarely been investigated [8], in contrast to the calcium/calcineurin/Nuclear factor of Activated T cells (NFAT) pathway, one of the main signaling pathways activated by calcium [9]. It has been reported that primary AML cells exhibit variable NFAT expression according to the stage of differentiation and disease progression [9]. Indeed, NFAT was shown to be overexpressed in primary leukemic blasts at disease relapse compared with diagnosis [10]. Interestingly, inhibition of NFAT nuclear translocation increased the sensitivity of AML cells to chemotherapy drugs from patients bearing the internal tandem duplication of the FLT3 receptor (FLT3ITD), a frequent and disease driver mutation, thus emphasizing a potential link between calcium signaling and chemoresistance [11].

Here, we demonstrate for the first time, to our knowledge, the involvement of ORAI1 in SOCE in human AML cell lines and primary cells according to their differentiation status, ABCB1 activity and LSC compartment proportion. We also show the contribution of ORAI1 (i) to AML cell cycle engagement and (ii) to apoptosis resistance against Ara-C treatment.

2. Results

2.1. *ORAI1 and ABCB1 Gene Expression Varies in AML Patients at Diagnosis According to the Differentiation Stage and Prognosis of the Disease*

2.1.1. ORAI1 and ABCB1 Are Overexpressed in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Isolated from AML Patients

We first analyzed *ORAI1* and *ABCB1* gene expression by RT-qPCR in PBMCs isolated from nine AML patients (Table S1) at the time of initial diagnosis (>80% of leukemic cells)

compared with PBMCs from healthy donors. We found that *ORAI1* gene expression was increased in leukemic cells compared with normal cells (normal PBMCs $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.4$ vs. 3.91 for leukemic cells, $p = 0.032$) (Figure 1a). In the same manner, *ABCB1* gene expression was also significantly increased in leukemic blasts compared with normal PBMCs (normal PBMCs $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.14$ vs. 3.86 for leukemic cells, $p = 0.0063$) (Figure 1b).

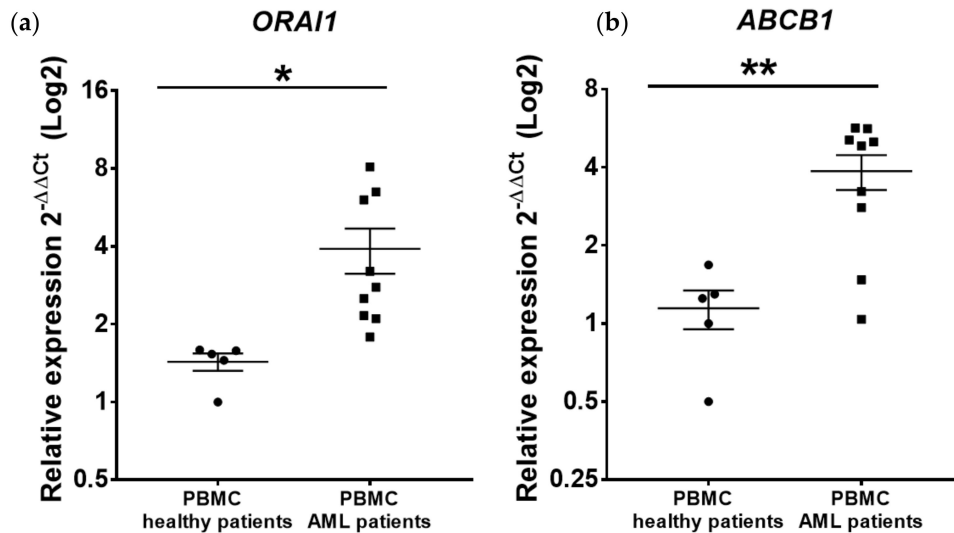


Figure 1. Expression of *ORAI1* and *ABCB1* in human AML primary cells compared with healthy primary PBMCs. qRT-PCR detection of *ORAI1* (a) and *ABCB1* (b) gene expression in AML primary cells isolated from 9 patients at disease diagnosis compared with normal primary PBMCs isolated from 5 healthy donors. The expression levels of *ORAI1* and *ABCB1* relative to beta-2 microglobulin (*B2M*) for each sample were normalized to the *ORAI1* and *ABCB1* levels in healthy PBMCs. The relative expression ratio for each gene was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with healthy PBMCs.

2.1.2. *ORAI1* and *ABCB1* Gene Expression Varies with the Stage of AML Differentiation and Prognostic Classification

In addition to the fresh AML primary samples collected by our laboratory, we analyzed RNA-seq datasets from a cohort of human AML samples at diagnosis ($n = 439$, [12]) available in the public domain (<https://www.cbioportal.org>) for *ORAI1* and *ABCB1* gene expression. We first compared AML patient samples according to the stage of leukemic cell differentiation (French–American–British (FAB) classification), i.e., from the M0 undifferentiated stage to the M5 monocytic differentiated stage. We observed an increase in *ORAI1* expression associated with late stages of AML differentiation (one-way ANOVA ($F(5.79) = 18.07$, $p < 0.0001$)) (Figure 2a), while in an opposite manner, *ABCB1* expression was downregulated in a more advanced stage of differentiation (one-way ANOVA ($F(5.76) = 4.2$, $p = 0.002$)) (Figure 2b).

AML patients were then classified as favorable ($n = 117$), intermediate ($n = 143$) and adverse risk ($n = 157$) based on the 2017 European Leukemia Net (ELN) risk stratification (Figure 2c). We analyzed *ORAI1* and *ABCB1* gene expression in these three ELN classes, and we observed a significant increase in *ABCB1* in AML patient samples with adverse risk (one-way ANOVA ($F(2.414) = 21.16$, $p < 0.0001$)), while *ORAI1* gene expression was downregulated in this ELN class (one-way ANOVA ($F(2.414) = 7.547$, $p = 0.0006$)) (Figure 2d,e).

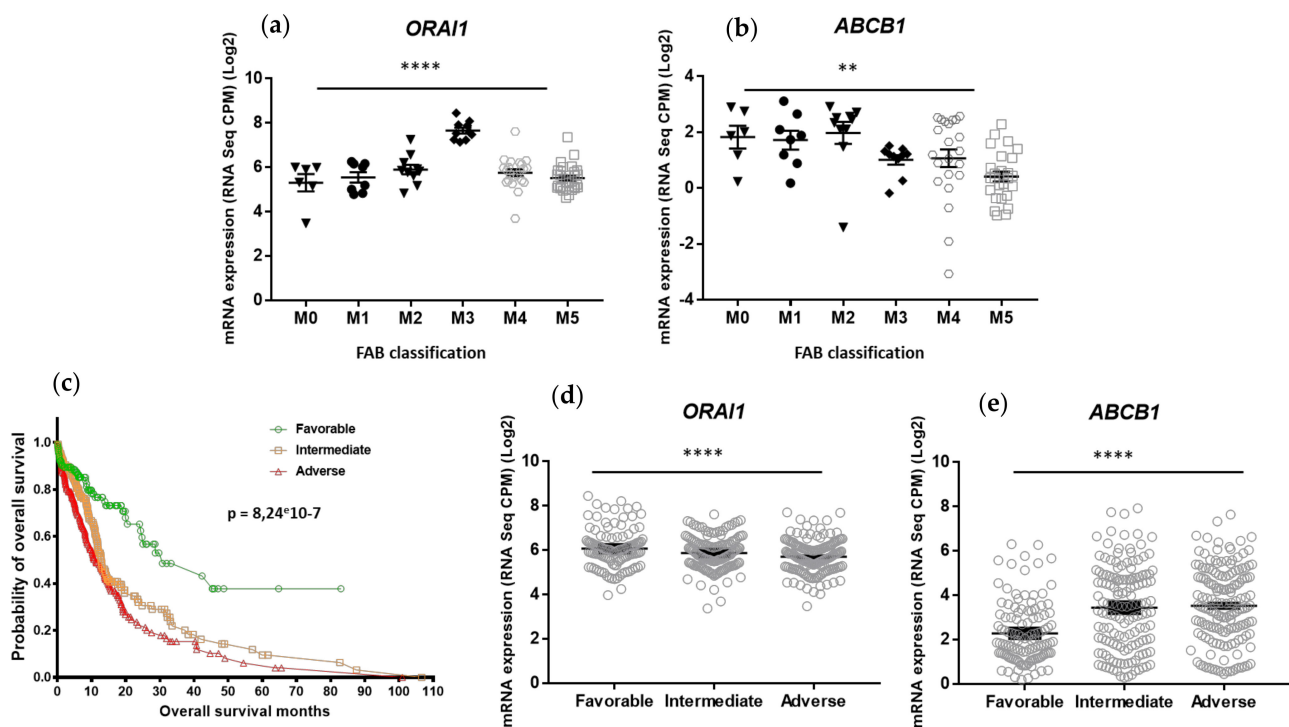


Figure 2. Differential expression patterns of *ORAI1* and *ABCB1* in AML primary cells isolated from patients at the time of disease diagnosis, according to the FAB classification and ELN 2017 risk stratification. (a–e) RNA-seq data were generated by Tyner et al. [12] from samples derived from patients with AML at disease diagnosis. RNA-Seq data were obtained from public domain AML datasets (<https://www.cbioportal.org>, accessed on 15 March 2022). Data were extracted as described by [13,14] for *ORAI1* and *ABCB1* expression in AML primary cells according to the FAB classification (a,b). Overall survival of 439 adult patients with de novo AML according to ELN2017 risk stratification (favorable, intermediate, adverse). The p value is based on the log rank test. (c). Data were extracted for *ORAI1* (d) and *ABCB1* (e) expression according to ELN2017 risk stratification. Normalized expression values are presented as CPM; p values are from one-way ANOVA tests comparing the different means (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

2.1.3. AML with High *ABCB1* and Low *ORAI1* Gene Expression Shows Reduced Expression of CD33 (Differentiation Marker) and CDK4/CDK6 (G0–G1 Transition Phase Regulators)

We next analyzed the expression of genes related to AML differentiation (*CD33*) and to cell cycle regulation, more specifically to G0–G1 transition phase regulators (*CDK4* and *CDK6*), in AML patient samples discriminated by their level of expression of *ORAI1* (*ORAI1^{low}* and *ORAI1^{high}*, $n = 219$ and $n = 220$, respectively) (Figure 3a) or *ABCB1* (*ABCB1^{low}* and *ABCB1^{high}*, $n = 220$ and $n = 219$, respectively) (Figure 3e) genes. We found that both *ABCB1^{high}* and *ORAI1^{low}* AML were associated with lower expression of *CD33* (Log (2) = 6.661 vs. 5.761, $p < 0.0001$ and Log (2) = 6.436 vs. 6.003, $p = 0.0007$, respectively) and *CDK4* (Log (2) = 5.658 vs. 5.464, $p = 0.0211$ and Log (2) = 5.698 vs. 5.424, $p = 0.0011$, respectively) genes (Figure 3). Regarding the *CDK6* gene, only *ORAI1^{low}* AML displayed lower expression than *ORAI1^{high}* AML (Figure 3d,h). Interestingly, *ABCB1^{high}* AML samples displayed an overexpression of several leukemic stem cell markers previously identified and established as the 17-gene stemness signature [15] (Table S2) and underexpression of the *ORAI1* calcium channel gene (Log (2) = 3.471 vs. 3.741, $p < 0.001$) (Figure 3i).

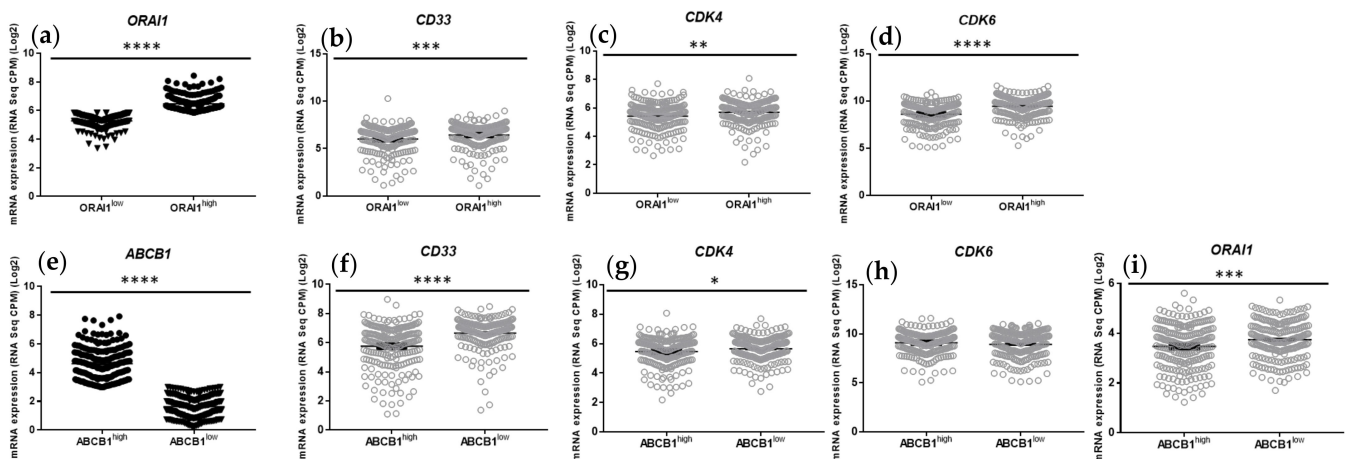


Figure 3. Expression of *CD33*, *CDK4* and *CDK6* in primary AML cells isolated from patients at the time of diagnosis, according to *ABCB1* and *ORAI1* gene expression. (a–i) RNA-seq data were generated by Tyner et al. [12] from samples derived from patients with AML. RNA-Seq data were obtained from public domain AML datasets (<https://www.cbioportal.org>). Data were extracted as described in [13,14] for *ORAI1* and *ABCB1* expression, and 2 groups ($n = 220$ and $n = 219$) of AML patients were discriminated according to high or low levels of *ORAI1* (a) and *ABCB1* (e) expression. Data were extracted for *CD33*, *CDK4* and *CDK6* gene expression in the *ORAI1*^{low} and *ORAI1*^{high} AML and in the *ABCB1*^{low} and *ABCB1*^{high} AML patient subgroups. Normalized expression values are presented as CPM; p values were obtained from Student's t tests between means (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Collectively, these data point out a possible link between the high gene expression of *ABCB1* and the low expression of *ORAI1* with (i) an undifferentiated stage of AML, (ii) lower expression of G0–G1 transition phase regulators, (iii) higher expression of genes related to the leukemic stem cell phenotype and (iv) an overall worse prognosis for patients.

2.2. Involvement of *ORAI1* in SOCE in AML Cell Lines According to *ABCB1* Activity, Stem Cell Phenotype and Cell Cycle Engagement

2.2.1. *ABCB1* Activity Reflects Stemness Markers and Cell Cycle Engagement in AML Cells

We have previously shown in numerous cohorts of AML patients that *ABCB1* gene expression is strongly linked to *ABCB1* activity, the LSC proportion and a worse disease prognosis [2]. Consequently, we next questioned the role of *ORAI1* in SOCE in leukemic cells with higher *ABCB1* activity and/or an enrichment in stemness markers.

Therefore, we investigated whether *ORAI1* contributes to SOCE in two representative AML human cell lines, KG1 and U937, which display opposite features regarding (i) stage of differentiation, (ii) *ABCB1* expression and (iii) LSC size compartment [16,17]. We first analyzed the CD34 + CD38– (i.e., LSC) subpopulation in the KG1 and U937 AML cell lines by qRT–PCR, LSC-associated and *ABCB1* gene expression and flow cytometry. As previously reported, the immature KG1 acute myeloid leukemia cell line overexpressed LSC-associated and *ABCB1* genes and made up an important CD34 + CD38– LSC subpopulation (10.4%). In contrast, the U937 monocytic differentiated leukemia cell line exhibited a downregulation of LSC markers and a decrease in *ABCB1* gene expression (Table 1).

Table 1. Relative expression of LSC genes, *ABCB1* and LSC compartment proportion in KG1 and U937 AML cell lines. RT-qPCR was performed to analyze the relative expression of the indicated genes as described in the Materials and Methods section. The percentage of LSCs (CD34 + CD38[−]) was also analyzed by flow cytometry. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

AML Cell Lines	«LSC» Gene Expression				MDR Gene Expression	Percent of «LSC»
	<i>LAPTMB4</i>	<i>NYNRIN</i>	<i>MMRN1</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>ABCB1</i>	CD34+/CD38 [−]
KG1	1	1	1	1	1	10.4 ± 0.8 ***
U937	Not expressed	Not expressed	0.05 ± 0.01 ***	0.37 ± 0.3 *	0.001 ± 0.0002 ****	0.04 ± 0.01

We next evaluated *ABCB1* activity in both AML cell lines using the functional Rhodamine 123 (Rh123) exclusion assay. The exclusion rate of the Rh123 fluorescent probe was assessed by flow cytometry. With this method, we characterized two distinct cell populations among U937 and KG1 cells (Figure 4a). Cells displaying a high fluorescence intensity (i.e., cells that did not exclude the Rh123 probe) were considered Rh123^{high} cells, reflecting lower *ABCB1* activity. Cells with a lower fluorescence intensity, noted Rh123^{low}, excluded the probe, reflecting higher *ABCB1* activity. A discrete population of Rh123^{low} cells was identified among the differentiated U937 cell line (2.9 ± 0.8%), while a majority of the immature KG1 cells were characterized as Rh123^{low} (99.9 ± 0.05%) (Figure 4a).

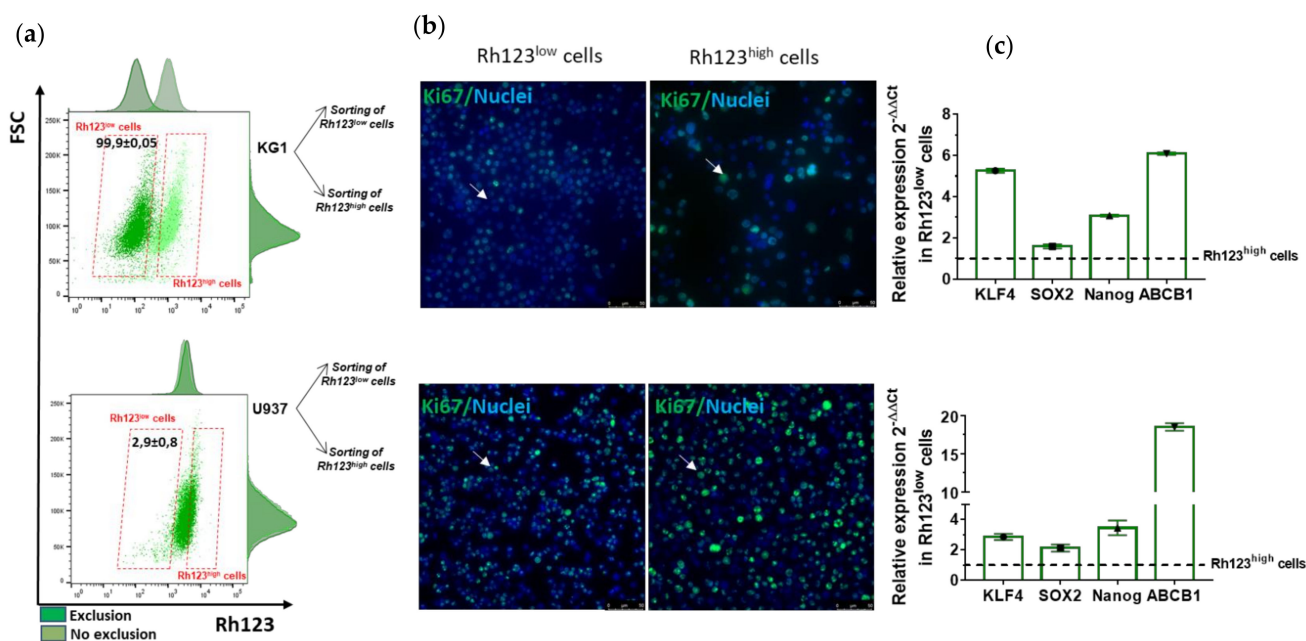


Figure 4. Flow cytometry identification of Rh123^{low} (*ABCB1*^{high}) populations enriched with quiescent cells and stem cell markers in KG1 and U937 AML cell lines. (a) KG1 and U937 leukemic cells were incubated with 0.1 µg/mL Rh123 probe for 20 min. After 60 min of exclusion of the Rh123 probe, the Rh123^{low} cell subpopulation appeared/is highlighted. (b) Ki67 (Alexa Fluor 488, green) and nuclear (Hoechst, blue) staining was then performed on cells sorted by FACS based on Rh123 probe exclusion. Ki67-negative or Ki67-low-expressing cells were considered quiescent cells or slow-cycling cells, respectively. White arrows indicate quiescent cells in the Rh123^{low} compartment and cycling cells in the Rh123^{high} cell compartment. (c) Stemness-associated gene expression was analyzed by RT-qPCR and is shown in the Rh123^{low} cells relative to the expression of the corresponding genes in Rh123^{high} cells. The relative expression ratio for each gene was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The calculated values represent the expression level of each gene relative to the expression of *B2M* used herein as an endogenous control. Histograms present the mean results from three independent experiments.

We and others have previously identified an enrichment of stem-like characteristics (e.g., quiescence and overexpression of stemness genes) in normal hematopoietic cells, tumor cell lines and primary cancer cells using the Rhodamine (Rh123) functional exclusion assay [18,19].

Rh123^{low} and Rh123^{high} U937 and KG1 sorted cells were then subjected to immunostaining and qPCR. Immunocytochemistry revealed a significant difference in the expression level of the nuclear protein Ki67, which is expressed during the cell cycle, between the Rh123^{low} and Rh123^{high} populations in both leukemia cell lines (Figure 4b). The absence or the low fluorescence intensity of the Ki67 protein observed in Rh123^{low} cells was associated with quiescence or slow cycling, respectively. An enrichment of stemness characteristics within KG1 and U937 Rh123^{low} cells was further confirmed by qPCR analysis, which showed a higher expression level of the stemness genes *KFL4*, *SOX2* and *NANOG* (Figure 4c). As expected, *ABCB1* gene expression was highly increased in KG1 and U937 Rh123^{low} cells (Figure 4c).

In addition, we performed flow cytometry immunophenotyping of the Rh123^{low} and Rh123^{high} populations in both cell lines with regard to CD34 and CD38 surface marker expression (Table 2). We observed an enrichment of the CD34 + CD38[−] stem-cell-like phenotype in the Rh123^{low} cell compartment (a 34-fold and 5-fold increase in U937 and KG1 cells, respectively).

Table 2. LSC compartment identified by CD34 + CD38[−] phenotype combined with the Rh123 exclusion assay in KG1 and U937 AML cell lines. Percentage of Rh123^{low} and Rh123^{high} cell compartments associated with or without CD34 and CD38 surface markers analyzed by flow cytometry. Means were compared between KG1 and U937 cells. ** $p \leq 0.01$.

AML Cell Lines	Rh123 ^{high}	Rh123 ^{low}	CD34+/CD38 [−]	Rh123 ^{high} CD34+/CD38 [−]	Rh123 ^{low} CD34+/CD38 [−]
KG1	0.09 ± 0.05 **	99.9 ± 0.05 **	10.4 ± 0.8 **	0.0025 ± 0.02	10.4 ± 0.8 **
U937	97.1 ± 0.8	2.9 ± 0.8	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.003

Collectively, these results showed that the Rh123^{low} cell compartment in both cell lines reflected common characteristics regarding *ABCB1* activity or the LSC phenotype. Importantly, despite all the common features between the Rh123^{low} compartment, we observed a marked difference between the proportions of quiescent Ki67-negative cells, which were more pronounced in the U937 Rh123^{low} population, while the number of slow-cycling cells (Ki67^{low}) was increased in KG1 Rh123^{low} cells (Figure 4).

2.2.2. The Involvement of ORAI1 in SOCE in AML Cell Lines Depends on *ABCB1* Activity and LSC Status

We first assessed the contribution of ORAI1 to SOCE in the U937 and KG1 leukemia cell lines. Both cell lines were either treated with Synta66 (SOC inhibitor) or transfected with siORAI1 (100 nM, 48 h) or siCTL and were then loaded with the fluorescent ratiometric Indo-AM calcium dye. The 13 min kinetics were monitored by flow cytometry, during which thapsigargin (1 μM), an inhibitor of SERCA pumps, was added after 2 min in the absence of extracellular calcium followed by the addition of extracellular Ca²⁺ (2 mM) after 9 min. This protocol with thapsigargin induces depletion of the endoplasmic reticulum (ER) calcium stores and activation of SOCE visualized at the time when calcium is added to the extracellular calcium. As shown in Figures S1 and S2, we monitored over time the ratio of F400/F475 fluorescence intensity reflecting cytosolic calcium levels in both cell lines. Application of the SOC channel inhibitor Synta66 (10 μM) and *ORAI1* silencing in KG1 and U937 cells elicited a marked decrease in SOCE (Figure S1 and S2), thus confirming the involvement of the ORAI1 channel in SOCE in AML cell lines.

We next evaluated the level of expression of the ORAI1 calcium channel in the sorted Rh123^{low} and Rh123^{high} populations. As shown in Figure 5a,b, KG1 and U937 Rh123^{low}

cells, which displayed high ABCB1 expression and activity, exhibited lower levels of ORAI1 expression and activity.

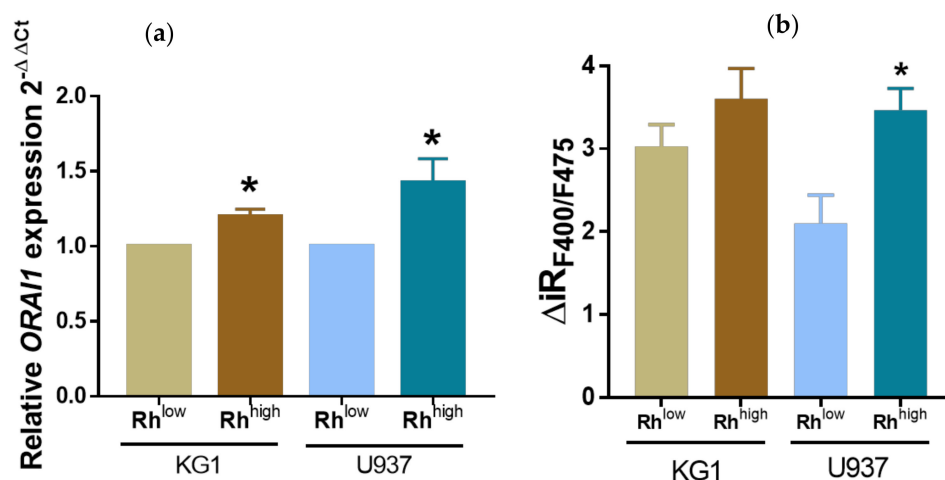


Figure 5. SOCE is downregulated in the KG1 and U937 Rh123^{low} cell subpopulations. (a) Relative *ORAI1* expression in KG1 and U937 Rh123^{low} and Rh123^{high} cell subpopulations determined by RT-qPCR. *ORAI1* relative expression was calculated by the 2^{-ΔΔCt} method. * *p* < 0.05. (b) [Ca²⁺]_i was monitored by flow cytometry, and the F400/F475 ratio reflected calcium capacitive entry in KG1 and U937 Rh123^{low} and Rh123^{high} cell subpopulations. The graphs represent the means of 3 independent experiments. * *p* ≤ 0.05.

The advantage of the multiparameter flow cytometry technique is the possibility of performing a functional assay of rhodamine exclusion while simultaneously monitoring intracellular calcium levels without unnecessary additional sorting experiments. As shown in Figure 5b, we observed a slight decrease in SOCE in KG1 and U937 Rh123^{low} cells compared with Rh123^{high} cells. Application of the SOC channel inhibitor Synta66 (10 μM) led to a dramatic decrease in SOCE amplitude in KG1 and U937 Rh123^{low} and Rh123^{high} compartments. Interestingly, the inhibition elicited by Synta66 was similar in both compartments, indicating similar SOCE properties in the Rh123^{low} and Rh123^{high} populations (Figure S3).

2.2.3. ORAI Is Involved in AML Cell Line Proliferation and Cell Cycle Engagement

While it has been described that SOC inhibitors can induce proliferation defects in cancer cell lines [20], the involvement of SOC channels in AML cell proliferation remains largely unknown [8]. However, the role of [Ca²⁺]_i and associated signaling pathways in cell cycle engagement and/or proliferation of AML primary cells and cell lines has been investigated [8]. Using the SOC channel inhibitor Synta66, we observed a small but significant decrease in KG1 and U937 proliferation after a 24 h treatment compared with control cells (Figure 6a,b) without any significant cell death engagement. Similar to Synta66 application, siRNA against ORAI1 also induced a decrease in proliferation in both AML cell lines (Figure 6c).

SOC inhibition by Synta66 or with the abolition of *ORAI1* expression (siRNA) did not induce any significant change in ABCB1 activity (% of Rh123^{low} cells) or the proportion of CD34 + CD38⁻ leukemic stem cells in either AML cell line (Table S3). We then stained the cells for Ki67/PI simultaneously with CD34 and CD38 surface markers to check cell cycle engagement, particularly the size of the LSC compartment, after treatment with Synta66. Interestingly, we observed a significant increase in the proportion of quiescent CD34 + CD38⁻ leukemic stem cells in the U937 cell line (Figure 6d). In the CD34 + CD38⁻ KG1 cell compartment, the number of Ki67-negative cells was decreased (Figure 6d) due to an accumulation in the G1 phase of the cell cycle (data not shown).

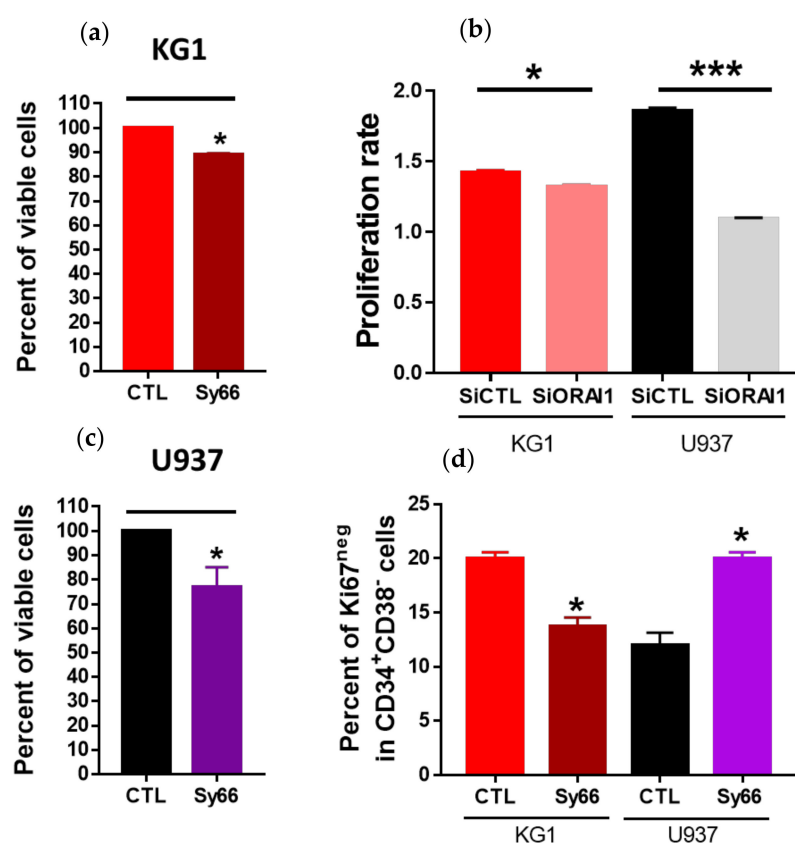


Figure 6. SOCs/ORAI1 are involved in proliferation of KG1 and U937 cells and in the quiescence state of LSC. KG1 (a) and U937 (c) viability (Trypan blue) under control conditions or after 24 h of treatment with synta66 (10 μ M). (b) Proliferation rate of KG1 and U937 cells transfected with control or ORAI1 siRNA. (d) Percentage of Ki67^{neg} cells in CD34⁺CD38⁻ LSCs treated or not treated for 24 h with synta66 (10 μ M). For each experiment, three independent experiments were performed. *** $p \leq 0.001$. * $p \leq 0.05$.

2.3. Cytarabine (Ara-C) Has an Impact on SOCE in AML Cell Lines and Primary Cells Depending on ABCB1 Activity, the LSC Proportion and/or Cell Cycle Engagement

We next evaluated the impact of cytarabine (Ara-C), a chemotherapeutic agent currently used in the treatment of AML, on KG1 and U937 cell lines and primary cells to determine the role and contribution of ABCB1 activity or LSC proportion in the response to this drug.

2.3.1. Effect of Ara-C on the AML Cell Cycle and LSC Proportion

As expected, a 24 h treatment with Ara-C inhibited U937 and KG1 cell proliferation in a dose-dependent manner. U937 cells were more sensitive to the treatment than KG1 cells, with the latter displaying higher ABCB1 activity and a higher proportion of LSCs (Figure S4). We also performed a cell cycle analysis by flow cytometry (Ki67/PI double staining) and observed that KG1 cells accumulated in the G1 phase ($46.2\% \pm 2.1$ vs. $65.8\% \pm 1.4$, CTL and 1 μ M Ara-C, respectively) with a slight increase in cell death ($2.6\% \pm 0.3$ vs. $6.3\% \pm 0.8$ of cells in subG1 with 1 μ M Ara-C) (Figure 7 and Figure S5). U937 cells showed a more significant increase in cell death than KG1 cells after cytarabine treatment ($16.9\% \pm 2.5$ of cells in subG1 at 1 μ M Ara-C compared to $6.3\% \pm 0.8$ for U937 and KG1, respectively). Moreover, we did not observe any change in the percentage of cells in the G0 phase of the cycle after treatment with Ara-C for either cell line (Figure 7 and Figure S5).

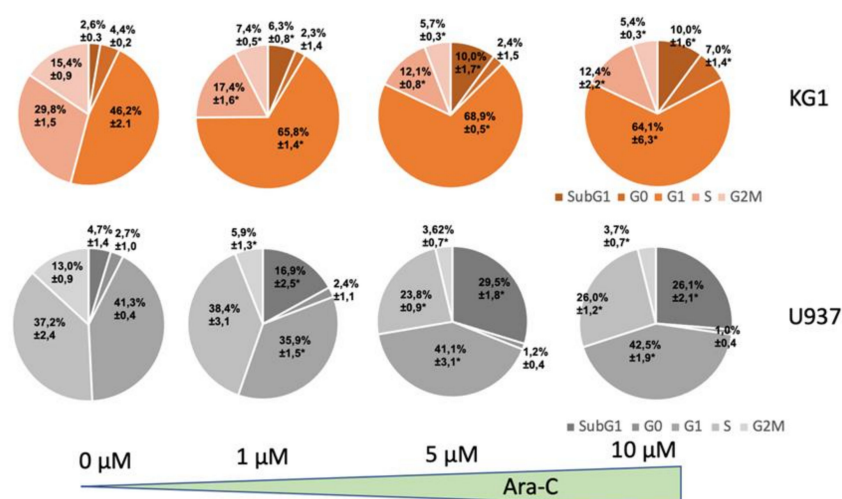


Figure 7. Effect of Ara-C on the KG1 and U937 cell cycle. Cell cycle analysis by flow cytometry of KG1 and U937 AML cell lines with KI67/PI double staining. Cells were either in a control condition or treated with Ara-C at the indicated concentrations for 24 h. Three independent experiments were performed. * $p \leq 0.05$.

Ara-C treatment increased the Rh123^{low} cells and decreased the Rh123^{high} cell compartments in a dose-dependent manner for U937 cells but not for KG1 cells (Table S5). However, the proportion of CD34+ CD38– KG1 cells increased in a dose-dependent manner with this treatment (Table S5). As expected, our cell cycle results (% of cells in SubG1) showed that cells undergoing cell death were cells with low ABCB1 activity (Rh123^{high}), while CD34+ CD38– and Rh123^{low} cells were more resistant to Ara-C.

2.3.2. Effect of Ara-C on SOCE in AML Leukemic Cells

The Effect of Ara-C on SOCE in AML Cell Lines Depends on ABCB1 Activity and the LSC Phenotype

Considering the difference in chemosensitivity and LSC compartment size between KG1 and U937 cells and the potential role of SOC activity in these features, our next goal was to functionally study the impact of Ara-C on SOCE in both cell lines according to ABCB1 activity. To assess SOCE in viable cells only, we measured SOCE by flow cytometry in cells treated or not with Ara-C and stained with a viability dye.

In the more chemoresistant KG1 Rh123^{low} cells (high ABCB1 activity), Ara-C exposure induced a slight increase in capacitative calcium entry in a dose-dependent manner, without any significant impact on the basal calcium level (Figure 8 and Figure S6). In contrast, the more chemosensitive U937 Rh123^{high} cells (low ABCB1 activity) displayed a marked decrease in SOCE with a slight increase in basal calcium levels after Ara-C treatment. Increased SOC activity could therefore be linked to resistance mechanisms mobilized by AML leukemic cells. Surprisingly, when we assessed SOC activity in the minority cell compartment among KG1 and U937 cells regarding the ABCB1 activity level (i.e., KG1 Rh123^{high} and U937 Rh123^{low} cells), these cells displayed either no change (KG1) or a decrease (U937) in SOCE following Ara-C treatment (Figure 8 and Figure S6).

We next evaluated *ORAI1* gene expression in KG1 and U937 cells following Ara-C exposure. We observed a significant increase in *ORAI1* expression in KG1 cells and a significant decrease in U937 cells (Figure 9), in agreement with the observed Ara-C functional effects on SOCE in both leukemia cell lines.

Because the calcineurin–NFAT signaling pathway is closely associated with SOCE and ORAI channels in several models, we next evaluated NFAT localization in both KG1 and U937 AML cell lines treated or not treated with Ara-C for 24 h. Under control conditions, NFAT was predominantly localized in KG1 cytoplasm and in U937 nuclei, as shown in Figure 9. After Ara-C exposure, KG1 exhibited a translocation of NFAT to the nucleus

(Figure 9). Conversely, U937 cells treated with Ara-C displayed a predominant cytoplasmic distribution of NFAT (Figure 9).

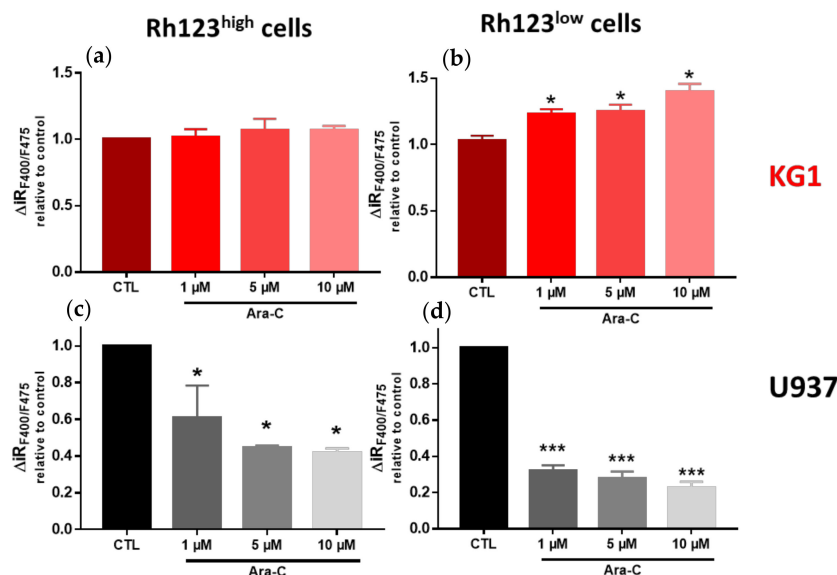


Figure 8. Effect of Ara-C on SOCE in Rh123^{high} and Rh123^{low} KG1 and U937 cell subpopulations. Cells were treated for 24 h with Ara-C at the indicated concentrations. For each condition, three independent experiments were performed. Flow cytometric analysis of the impact of Ara-C on SOC channel activity in the Rh123^{high} (a,c) and Rh123^{low} (b,d) KG1 and U937 cell subpopulations. The delta of the F400/F475 ratio reflects the capacitative Ca²⁺ entry in the Rh123^{high} and Rh123^{low} cell subpopulations. * $p \leq 0.05$; *** $p < 0.001$.

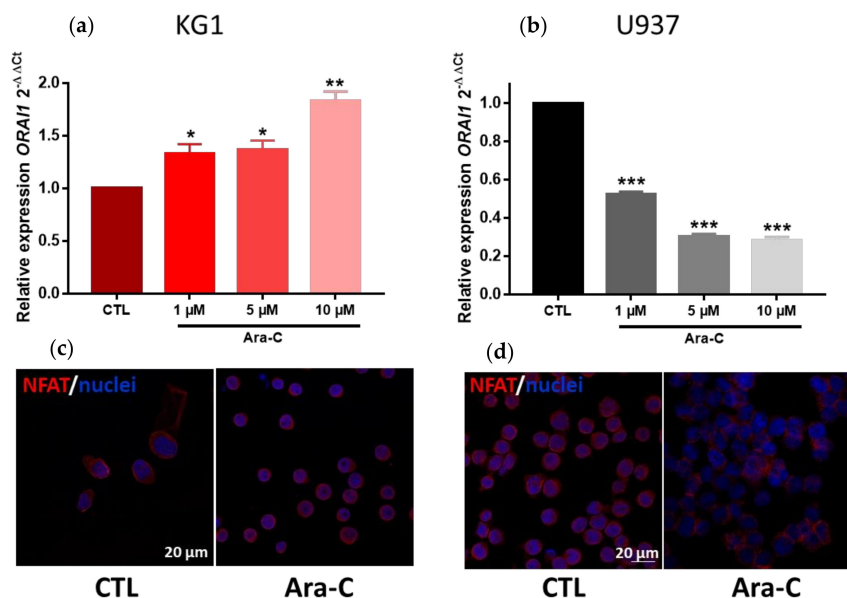


Figure 9. Effect of Ara-C on *ORAI1* expression and NFAT localization. Relative expression of the calcium channel *ORAI1* in KG1 (a) and U937 (b) leukemic cell lines. *ORAI1* expression was analyzed by RT-qPCR. The relative expression ratio for *ORAI1* was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Confocal microscopy showing NFAT expression and localization (Alexa Fluor 488, red) and nuclei (Hoechst, blue) in control and Ara-C-treated (5 μM) KG1 (c) or U937 (d) cells. The scale bar is indicated.

Ara-C Affects SOCE in Primary AML Cells from Patients According to ABCB1 Activity and LSC Phenotype

We first performed a Rh123 exclusion assay and CD34 + CD38[−] immunophenotyping in AML primary cells from nine patients (Table S1) to screen their ABCB1 activity and LSC compartment proportion. We next evaluated the Ara-C effect on high ABCB1 activity and LSC-enriched AML primary cells (AML patient #1) compared with lower ABCB1 activity and poorly LSC-enriched AML cells (AML patient #2) (Table S6).

As expected, Ara-C exposure induced a slight decrease in AML#1 primary cell viability and a more pronounced decrease in AML#2 cells (Figure S7). Similarly, cell death was significantly higher in AML#2 Ara-C-treated cells than in AML#1 cells (48 vs. 20% of subG1, respectively) (Figure S7).

In the more chemoresistant and LSC-enriched AML#1 Rh123^{low} cells (high ABCB1 activity), Ara-C treatment provoked a slight increase in capacitive calcium entry (Figure 10). Conversely, the more chemosensitive AML#2 cells (low ABCB1 activity) displayed a significant decrease in SOCE subsequent to Ara-C treatment (Figure 10).

We then evaluated *ORAI1* gene expression in AML#1 and AML#2 primary cells following Ara-C exposure, and we observed, in agreement with the Ara-C effect on SOCE, a significant increase in AML#1 cells with high ABCB1 activity and a significant decrease in AML#2 primary cells (Figure 10).

Interestingly, we observed similar SOCE and *ORAI1* expression modulation in primary cells and KG1/U937 cell lines according to their respective ABCB1 activity, LSC status and differentiation stage.

To verify NFAT localization, we performed immunocytochemistry staining, and we observed results similar to those obtained with KG1 and U937 cell lines, namely, a predominant redistribution of NFAT in the nucleus of AML#1 cells and in the cytoplasm of AML#2 cells after Ara-C treatment, as shown in Figure S8.

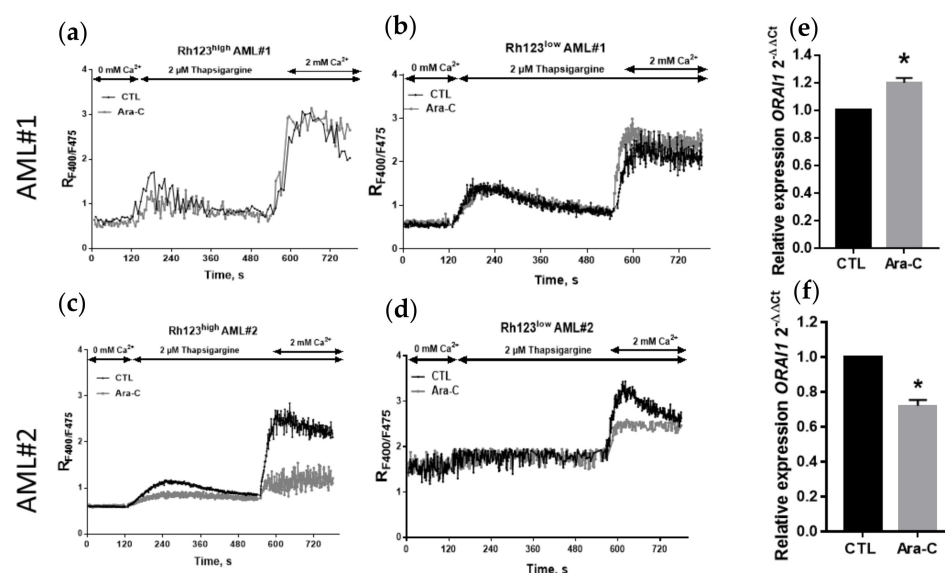


Figure 10. Effect of Ara-C on SOCE and *ORAI1* expression in AML#1 and AML#2 primary cells according to ABCB1 activity. Cells were treated or not for 24 h with 5 μ M Ara-C. Three independent experiments were performed. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ analyzed by flow cytometry (Indo-AM) upon SOC activation in AML#1 and AML#2 Rh123^{high} (a,d,c) and Rh123^{low} (b,d) primary cells. Each point represents the mean of 3 independent experiments including between 1000 and 10,000 cells. Relative expression of *ORAI1* in AML patient #1 and #2 cells (e,f). *ORAI1* expression was analyzed by RT-qPCR. The relative expression ratio was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. * $p < 0.05$.

3. Discussion

In this study, we present new data supporting that ORAI1 calcium channels mediate SOCE in human AML cell lines and primary cells from patients. We show that ORAI1/SOCE plays a role in AML cell proliferation and in G0–G1 cell cycle engagement according to the LSC phenotype. We also demonstrate a link between ORAI1 expression and/or activity and AML cell differentiation stage, ABCB1 activity and the LSC compartment. Furthermore, our data suggest that Ara-C treatment modulates SOCE in AML cell lines and primary cells via ORAI1 expression regulation. Using KG1 and U937 AML cell lines, two models with distinct ABCB1 activity and LSC compartment proportions, we observed opposite responses to Ara-C treatment with regard to ORAI1 expression and SOCE modulation. The more chemoresistant ABCB1^{high} and LSC-enriched KG1 AML cells displayed an increase in SOCE and ORAI1 expression following Ara-C treatment, while the chemosensitive ABCB1^{low} and poorly LSC-enriched U937 cells exhibited the opposite responses. Interestingly, we observed similar behaviors in primary AML cells obtained from patients at the time of diagnosis and presenting the same opposite features.

We have previously shown the clinical significance of ABCB1 in a cohort of patients with *de novo* AML and highlighted the link between ABCB1 expression and activity with LSC gene expression and risk stratification [2]. However, ABCB1 was not directly linked to drug resistance, prompting us to propose a bystander effect of these particular MDRs in chemoresistance mechanisms. Interestingly, in this study, we present new data obtained from public datasets [12], corresponding to the RNA-Seq analyses of a cohort of 439 AML patients at diagnosis, linking high ABCB1 expression and low ORAI1 expression with (i) an undifferentiated stage of AML, (ii) a lower expression of CDK4 and CDK6 (i.e., G0–G1 transition phase regulators), (iii) a higher expression of genes related to the LSC phenotype and (iv) an overall worse prognosis of the disease. In addition, we analyzed the genetic phenotypes associated to the different ABCB1 and ORAI1 expression levels. We observed in the ABCB1^{high} group a significant increase in AML subgroups bearing RUNX1, TP53 and GATA2 mutations, and a decrease in AML patients presenting NPM1 and FLT3-ITD mutations. In the ORAI1^{low} group, NPM1 and FLT3-ITD mutations were seldom observed, while AML bearing the RUNX1 mutation was over-represented. These observations were in agreement with ELN 2017 risk stratification: FLT3-ITD and NPM1 mutations are associated with good prognosis, while TP53, GATA2 and RUNX1 are correlated with an adverse risk.

We functionally confirmed these observations not only in the two representative AML cell lines KG1 and U937 but also in primary cells (AML#1 and AML#2) isolated from leukemia patients at the time of diagnosis based on their expression levels of ABCB1 and LSC-associated markers. In agreement with our results obtained by screening a public dataset, the slow-cycling immature KG1 AML and AML#1 primary cells displayed high ABCB1 activity and an enrichment of their LSC compartment while underexpressing ORAI1. In contrast, fast-cycling differentiated U937 and AML#2 primary cells exhibited lower ABCB1 activity and a discrete number of LSCs while overexpressing ORAI1.

More precisely, we identified two distinct cell subpopulations among KG1 and U937 cells in regard to ABCB1 activity, namely, the Rh123^{low} and Rh123^{high} populations. The Rh123^{low} cell compartment in each cell line shared common characteristics regarding ABCB1 activity and the LSC phenotype characterized herein by expression markers (e.g., SOX2, KLF4, NANOG), surface markers (CD34 + CD38-) and Ki67 expression levels. Interestingly, we observed that ORAI1 expression was downregulated in Rh123^{low} cells compared with their Rh123^{high} counterparts. Emerging roles of Ca²⁺ in cancer stem cell (CSC) population maintenance and stemness have been reported, and some studies have proposed a link between ORAI1 and the regulation of the CSC compartment [21]. For instance, it has been shown that ORAI1 and SOCE, through NFAT activation, promote stemness in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. Specifically, the ALDH^{high} CSC population expressed more ORAI1 proteins, and a study showed that ectopic expression of ORAI1 in nontumorigenic immortalized oral epithelial cells resulted in increased proliferation, self-renewal, and tumor-initiating capacities [22]. These data therefore con-

tradict our observations in the Rh123^{low} population, which was enriched in LSCs and expressed less ORAI1. However, similar to our results, it has been reported that SOCE inhibition triggers glioblastoma stem cells to adopt a quiescent state, suggesting that the transition from proliferation to quiescence involves the remodeling of Ca²⁺ signaling [23]. In our study, while the proportion of LSCs was not altered by SOCE modulation through ORAI1 silencing, LSCs were more engaged in quiescence in U937 CD34 + CD38[−] LSC stem cells. In hematopoietic stem cells (HSCs), two elegant studies on how intracellular calcium levels dictate cell fate (i.e., quiescence or cycling state) have shown opposite results [8]. Bonora et al. demonstrated an increase in the intracellular Ca²⁺ concentration during the switch from the G0 to G1 state and that cycling HSCs display active NFAT and TET2 degradation [24]. Conversely, Fukushima et al. proposed that the intracellular Ca²⁺ concentration decreases during the G0 to G1 transition, leading to an increase in CDK4/6 activity, and that the calmodulin (CaM)/CaM kinase (CaMK) pathway is involved in HSC quiescence [25]. These apparently contradictory results could be explained by the difficulty in discriminating between different stages of “activation” of normal and cancer stem cells. In addition, symmetric and asymmetric CSC divisions could also increase the level of complexity to understand the regulation of CSCs/LSCs by calcium signaling. Combined with the heterogeneity of responses observed in different organs and tissues, these reports emphasize the need to better understand calcium remodeling during the transition between the different activation stages of LSCs.

While alterations in calcium signaling have been extensively studied in solid cancers, only a few studies have explored the dysregulation of calcium-dependent signaling pathways in AML, and none have investigated calcium-dependent resistance mechanisms [8]. Regarding the molecular nature of SOCE in AML, to our knowledge, only one study has proposed that ORAI1 and ORAI2 mediate SOCE in the HL60 AML cell line while demonstrating their role in proliferation and migration [26]. In the present study, we are the first group to provide evidence of the involvement of ORAI1 in AML cell lines and in primary cells according to the AML differentiation state, ABCB1 activity and LSC compartment. Moreover, our results reveal the upregulation of ORAI1 and SOCE in chemoresistant ABCB1^{high} KG1 AML cells and in ABCB1^{high} AML primary cells after Ara-C exposure. However, Ara-C had the opposite effect in chemosensitive ABCB1^{low} U937 cells and ABCB1^{low} AML primary cells by inducing the downregulation of ORAI1 and SOCE. Several hypotheses can be formulated to explain these apparently contradictory results. First, the cell cycle engagement state of the two Rh123^{low} cell compartments from the KG1 and U937 cell lines is different. As previously mentioned, we observed a marked difference between the proportions of quiescent Ki67-negative cells, which were more pronounced in the U937 Rh123^{low} population, while the number of slow-cycling cells (Ki67^{low}) was increased in KG1 Rh123^{low} cells. The difference in proportion in “true” quiescent G0 cells could explain the different behaviors in regard to SOCE modulation in response to Ara-C treatment. Moreover, the difference in basal ORAI1 expression levels between the two cell lines (significantly lower in KG1 than in U937 cells) may also explain the opposite response to Ara-C exposure regarding SOCE modulation. Nevertheless, further investigations are needed to better understand these differences between the two cell lines.

In a recent work, Borella et al. showed that lercanidipine, a CaV1.2 calcium channel inhibitor, combined with the chemotherapeutic agent Ara-C significantly decreased AML growth in a preclinical model, and that this effect was far more robust than when each molecule was applied separately [27]. These data emphasize the possible clinical value of calcium channel inhibition to increase AML chemosensitivity. However, based on our results, the basal level of ORAI1 channel expression, LSC size compartment, G0 quiescent state and ABCB1 activity could represent additional mechanisms of chemoresistance in AML that should also be considered when studying this issue.

The data presented herein clearly demonstrate that ORAI1 is expressed in both AML cell lines and in primary cells isolated from AML patients. We have shown the overexpression of ORAI1 in these leukemic cells compared with normal primary cells (PBMCs)

isolated from healthy patients. These results suggest that AML cells, through ORAI1 up-regulation, may acquire additional characteristics, such as apoptosis resistance. Previous studies have reported contradictory roles for SOCE and ORAI1 in apoptosis regulation. While it has been shown that SOCE and ORAI1 contribute to apoptosis induction by diverse stress-associated stimuli [6,28], other studies have demonstrated their prosurvival and antiapoptotic roles [29]. Our results in AML cells are, however, similar to our previous observations in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells, where ORAI1 also mediates SOCE and exhibits prosurvival and antiapoptotic roles in cell lines exposed to chemotherapy drugs. In this study on PDAC, we also demonstrated that drugs used in clinics (5-FU, gemcitabine) increase SOCE via the upregulation of ORAI1 and STIM1 [5]. Our data therefore show that in these two cancer models (i.e., AML and PDAC), the ORAI1 expression level is significantly higher than that in “normal” cells and is modified when cells are exposed to chemotherapy drugs.

It has been suggested that calcium channels display functional specificity in the activation of Ca^{2+} -dependent transcription factors and the induction of gene expression. In this context, numerous studies have associated ORAI1-mediated Ca^{2+} entry with NFAT nuclear translocation and NFAT-dependent gene expression [30]. The precise role of NFAT in AML is still poorly documented. Nevertheless, it has been shown that the differentiation status of AMLs could impact NFAT expression levels [9]. A study on leukemic blasts isolated from AML patients was performed to determine the expression level (RNA-Seq) of NFAT isoforms according to differentiation status (FAB classification). NFATc2/c3 isoforms were found to be overexpressed at the early stage of differentiation. Moreover, it has been shown that NFAT inhibition increases the sensitivity to chemotherapy of primary AML leukemic blasts with an FL3-ITD mutation [11]. Interestingly, NFAT overexpression was observed in AML primary cells from patients during relapse compared with samples at the diagnostic stage [9]. While these data point to a possible role of NFAT in AML chemoresistance and AML progression, a majority of these studies only described *NFAT* gene expression without examining NFAT protein levels and intracellular distribution. In our study, ABCB1^{high}- and LSC-enriched chemoresistant cells (KG1 and AML#1 cells) displayed a preferential cytoplasmic localization of NFAT, while the ABCB1^{low} and LSC-enriched chemosensitive cells (U937 and AML#2 cells) presented a mostly nuclear distribution. Interestingly, Ara-C exposure induced NFAT translocation to the nucleus in ABCB1^{high} cells and cytoplasmic redistribution in ABCB1^{low} cells. These observations are in perfect agreement with the effect of Ara-C on SOCE in these cells, thus strongly suggesting a close functional link between SOCE activity and NFAT regulation in AML cells.

There is growing evidence that NFAT signaling cooperates with mutations of the *Fms*-related tyrosine kinase receptor 3 (FLT3) receptor in AML. Internal tandem duplication of the FLT3 receptor (FLT3ITD) is present in approximately 25% of AML cases and confers particularly poor outcomes for patients compared with other AML subtypes [31]. While NFAT was found to negatively regulate genes that control cell cycle entry, such as *Cdk4* and *Cdk6*, in normal myeloid cells, this activity was dependent on Flt3 ligand (Flt3-L) signaling and phospholipase PLC γ 1-dependent calcium influx. Understanding the relationship between FLT3-L and NFAT activity could therefore be of utmost interest within the context of leukemia. Further investigations are thus required to better characterize the contribution of NFAT to the proliferation and quiescence of leukemic cells and LSCs and its possible role in chemoresistance.

In summary, our study presents for the first time the contribution of ORAI1, SOCE and the associated NFAT transcription factor in human AML cell lines and primary cells according to ABCB1 activity, LSC compartment and Ara-C chemoresistance. Further studies are needed to better understand the precise contribution of the ORAI1/SOCE/NFAT axis to LSC/leukemic cell cycle engagement and the specific mechanisms of apoptosis regulation by SOCE and ORAI1 to potentially reveal novel strategies targeting these proteins and improving current AML treatment efficiency.

4. Materials and Methods

Cell culture. KG1 and U937 cell lines were purchased from the ATCC® (CCL-246™ and CRL-1593.2™, respectively). These cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 1% penicillin streptomycin antibiotic cocktail (Gibco) and fetal bovine serum (FBS) (Gibco) at different concentrations according to the cell line needs (20 and 10% FBS for the KG1 and U937 cell lines, respectively). Cells were treated at the indicated concentrations with Ara-C (provided by Lille Hospital) or Synta66 (Sigma–Aldrich, Burlington, MA, USA).

Patient samples. Healthy and AML patient blood samples were processed as previously described [32] to collect peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Briefly, blood was first diluted in PBS (Gibco) and then gently added to human Pancoll solution (Pan Biotech, Aidenbach, Germany). After centrifugation, PBMCs were collected and used for experiments or frozen in 90% SVF and 10% DMSO solution in liquid nitrogen until use. After thawing, the cells were treated with DNase (Qiagen, Germantown, MD, USA) at a final concentration of 50 µg/mL and in RPMI supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic cocktail.

Rhodamine 123 (Rh123) exclusion assay, ABCB1 activity. The Rh123 exclusion assay was performed as previously described [19]. Briefly, cells were adjusted to a concentration of 10⁶ per milliliter and loaded with 0.1 µg/mL Rh123 (Sigma–Aldrich, λ_{ex} 488 nm and λ_{em} 531 nm) in RPMI 1640 medium for 20 min at 37 °C in the dark for probe inclusion. After removing Rh123 from the medium, an exclusion step was performed at 37 °C for an additional 60 min. A positive control (cells with maximal Rh123 intensity) was obtained by keeping cells on ice or treating them with 0.1 µM verapamil (Sigma) to prevent Rh123 exclusion. Debris and cell doublets were excluded from the analysis, and cells were gated according to the positive control presenting the highest fluorescence intensity level. Cells with fluorescence intensity equal to the positive control were considered Rh123^{high} (lowest ABCB1 activity). Cells with the lowest Rh123 intensity were considered Rh123^{low} (highest ABCB1 activity). Acquisition was performed on an LSR-Fortessa X20 flow cytometer (BD Biosciences, Haryana, India).

Calcium influx assay by flow cytometry. Cells were loaded with the ratiometric dye indo-1-AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as a Ca²⁺ indicator. One million cells per milliliter were loaded with 0.7 µM indo-1-AM in the corresponding medium for 30 min at 37 °C in the dark and then washed. The evolution of the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) was measured every 5 s as the F400 nm/F475 nm (RF400/F475) ratio of fluorescence with a flow cytometer UV light. Baseline [Ca²⁺]_i was acquired in a 0 mM Ca²⁺ solution containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM glucose, and 10 mM HEPES (pH 7.4). After 120 s, the cells were treated with 1 µM of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) inhibitor thapsigargin (Focus Biomolecules). After 420 s of treatment with thapsigargin, a Ca²⁺-containing solution was added to the cells (final [Ca²⁺]_e 2 mM). Fluorescence was monitored with an LSR-Fortessa X20 flow cytometer, and median fluorescence values (*n* = 1000–10,000 cells for each time point) were extracted for further analysis. The Ca²⁺ release (ΔrRF400/F475) and capacitative calcium entry (also noted SOCE for store-operated calcium entry) (ΔiRF400/F475) were calculated as previously described [20]. Graphs were plotted using GraphPad Prism software.

Immunophenotyping. After rinsing, the cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies (all from Biolegend, San Diego, CA, USA) for 30 min at room temperature (RT) in PBS with 10% SVF. Antibodies were used at a 1:100 dilution (except for the PE-Cy7-conjugated CD33 antibody used at a 1.25:1000 dilution), and matching isotype antibodies were used at the same final concentration. Then, the cells were rinsed and resuspended in PBS before being analyzed by flow cytometry. Compensation beads (Invitrogen) were used to establish a matrix of compensation. Gating was determined based on negative control cell staining with corresponding isotype antibodies. Depending on the protocol, two panels of antibodies were used. If combined with Rh123 exclusion and calcium

influx assays, allophycocyanin (APC)-conjugated CD34 and phycoerythrin (PE)-conjugated CD38 antibodies were used. If combined with the calcium influx and cell viability assays, APC-conjugated CD34, PE-conjugated TIM3, PE-Cy7-conjugated CD33 and Brilliant Violet 421 (BV421)-conjugated CD38 antibodies were used. To assess their viability, cells were loaded with a DyeTM 750/777 Fixable Viability Staining Kit for 30 min at RT and protected from light.

Proliferation assay. Proliferation status was determined by nuclear Ki67 protein staining with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Ki67 antibody (Abcam, Cambridge, UK). Cells were first fixed with a 4% paraformaldehyde solution (Sigma–Aldrich) for 10 min at RT and then washed and incubated for 30 min at RT with 0.1% Triton X100 (Sigma–Aldrich) and 10% SVF solution supplemented with PBS. After washing, the cells were incubated with APC-conjugated CD34, BV421-conjugated CD38, PE-Cy7-conjugated CD33, PE-conjugated TIM3 antibodies (all from Biolegend) and FITC-conjugated Ki67 antibody (Abcam) in 0.1% Triton X100 and 10% SVF solution in PBS for 30 min at 4 °C in the dark. Cells were stained with the antibodies used at a 1:100 dilution (except for the PE-Cy7-conjugated CD33 used at a 1.25:100 dilution) or with matching isotypes at the same final concentration. Cells were then placed on ice before flow cytometry analysis.

Cell cycle analysis. Cells were adjusted to a concentration of 10^6 per milliliter to be fixed and permeabilized with 70% ethanol (Sigma) for 30 min at -20 °C. Cells were stained for 30 min at RT in the dark with 50 μ g/mL propidium iodide (Sigma–Aldrich) and 5 μ g/mL RNase (Qiagen) in PBS. To determine the percentage of cells in the G0 phase of the cell cycle, cells were preincubated with the FITC-conjugated Ki67 antibody (Abcam) at a 1:100 dilution or with matching isotype at the same final concentration in PBS with 10% SVF for 30 min at 4 °C in the dark. Then, the cells were kept on ice until analysis by flow cytometry.

Cell sorting. Subsequently, for the Rh123 exclusion assay, U937 and KG1 cells were washed and resuspended to a concentration of 5×10^6 cells per milliliter in culture cell medium without phenol red and 1% SVF (Sigma–Aldrich). Rh123^{low} and Rh123^{high} cells were sorted on a FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences). Gating was determined based on the positive control loaded with the Rh123 probe without the exclusion step. After sorting, the cells were kept at 37 °C before being used in further experiments.

Flow cytometry data analysis. Data were analyzed using FlowJo software (TreeStar). Live cells were discriminated from dead cells using a viability probe (DyeTM 750/777). Cell subpopulations were discriminated according to their rhodamine exclusion and/or cell-surface marker expression. Calcium mobilization was analyzed in the different gated subpopulations.

Immunocytochemistry. Cells were immobilized on 0.01% poly-lysine (Sigma–Aldrich)-coated coverslips at a concentration of 10^6 cells per coverslip for 10 min (or 24 h if treated) at 37 °C before being fixed with a 4% PAF solution (Sigma–Aldrich) for 10 min at RT. After washing, the cells were treated with a 0.1% Triton X-100 saturation/permeabilization solution for 10 min at RT. PBS-Tween (0.1% of Tween in PBS, Merck) was used to wash the cells for 5 min before incubating them in blocking buffer (1% BSA in PBS, Sigma–Aldrich) for 60 min at RT. Primary polyclonal rabbit anti-human NFAT antibody (1:100 dilution, Abcam) was directly added to the blocking buffer for 60 min at RT. After washing with PBS-T, FITC-conjugated Ki67 (1:100 dilution, Abcam) and Alexa Fluor 568 donkey anti-rabbit secondary antibody (1:2000 dilution, Invitrogen, Waltham, MA, USA) were subsequently added for another 60 min at RT. Negative controls were performed by replacing the primary antibody and fluorochrome-conjugated antibody with irrelevant antibodies of the same isotype. To visualize nuclei, 10 μ g/mL Hoechst (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added for 10 min at RT. The coverslips were mounted on microscope slides with Fluoroshield mounting medium (Abcam). For confocal microscopy, cell images were obtained using a confocal laser scanning microscope (LSM 700, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) with a Plan Apochromat 40 \times /1.3 numerical aperture oil immersion objective (Hoechst,

Frankfurt, Germany, λ_{ex} 343 nm, λ_{em} 483 nm, NFAT λ_{ex} 568 nm, λ_{em} 605 nm and Ki67 λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 532 nm). Images were analyzed with Zeiss LSM Image Browser software.

siRNA-mediated gene knockdown. To evaluate the role of the ORAI1 calcium channel in SOCE, five million KG1 or U937 cells were transfected by electroporation in transfection buffer (LONZA Amaxa[®] Cell Line Nucleofactor[™] Kit V, Basel, Switzerland) with 100 nM control or ORAI1-specific siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) to downregulate ORAI1 expression. After passing the cells through the Amaxa Nucleofactor[™] II electroporator, they were cultured in 6-well plates. Forty-eight hours post-transfection, the cells were collected, and *ORAI1* expression was assessed by qRT-PCR. The gene silencing efficiency was approximately 90% and 95% for KG1 and U937 cell lines, respectively (Figure S9).

RNA Extraction, qRT-PCR. RNA extraction was performed following the manufacturer's protocol (Qiagen RNeasy Mini Kit). RNA was transcribed into cDNA using random hexamers and the High Capacity Reverse Transcription kit from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). All qRT-PCRs were performed using TaqMan fluorescent probes (human *ORAI1*, *MMRN1*, *LAPTM4B*, *NYNRIN*, *KLF4*, *SOX2*, *NANOG*, *DNMT3B*, *ABCB1* and *BETA-2 MICROGLOBULIN* or *B2M*) provided by Applied Biosystems, Bedford, MA, USA. Duplex qPCR was performed, and discrimination of the genes of interest from the reference gene was allowed owing to 2 distinct fluorophore dyes, FAM and VIC probes for the genes of interest and the reference gene, respectively. The relative expression ratio for each gene was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The calculated values represent the expression level for each gene relative to the expression of *B2M*, which was used as the endogenous control. No expression denotes no detection in 50 ng of cDNA.

Analysis of public datasets. RNA-seq datasets of human AML samples at diagnosis ($n = 439$) [12] are available in the public domain (<https://www.cbioportal.org>, accessed on 15 March 2022). The RNA-seq expression unit used was counts per million reads mapped (CPM). Raw data were extracted and analyzed as previously described [13,14].

Statistical analyses. All results are expressed as the means \pm SEM of at least 3 independent experiments with 3 replicates each. For public dataset analysis, the number of patient samples is indicated. Comparisons between means were assessed using the Student's *t* test for unpaired data or one-way ANOVA. For the Student's *t* test, if unequal variance was observed, then Welch's correction was applied. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant. Asterisks denote * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. The leukemic stem cell (LSC) score was determined as described previously [15].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23105555/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, L.L. and Y.T.; methodology, C.L., A.G., S.T., F.A.S., O.L., N.J., V.F. and M.-O.L.; software, C.L., A.G. and S.T.; validation, C.L. and A.G.; formal analysis, C.L., A.G., S.T. and Y.T.; resources, C.B., T.I., M.C.T., P.P., A.B. and M.C.; writing—original draft preparation, C.L., L.L. and Y.T.; writing—review and editing, B.Q., L.L. and Y.T.; visualization, C.L. and Y.T.; supervision, B.Q., L.L. and Y.T.; project administration, Y.T.; funding acquisition, L.L., B.Q. and Y.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from Contrat de Plan Etat-Région CPER Cancer 2015–2020, INSERM, CNRS, Ligue contre le cancer (Septentrion), Ligue nationale contre le cancer, Fondation ARC, the University of Lille and the Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL). C.L. and M.-O.L. are financed by Lille Hospital and by the Hauts de France Region. F.A.S. is financed by the Institut de Recherche sur Le Cancer de Lille (IRCL).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Etablissement Français du Sang (EFS), Lille Hospital, Tumorothèque C2RC (protocol code: CSTMT079 and PLER/2021/005, date of approval, 01 January 2022), Oregon Health & Science University (OHSU), University of Utah, University of Texas Medical Center (UT Southwestern), Stanford University,

University of Miami, University of Colorado, University of Florida, National Institutes of Health (NIH), Fox Chase Cancer Center and University of Kansas (KUMC). Samples from public datasets [12] were sent to the coordinating center (OHSU; IRB#9570; #4422; NCT01728402; date of approval 18 February 2022).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: Data are available in a publicly accessible repository that does not issue DOIs. Publicly available datasets were analyzed in this study. These data can be found here: <https://www.cbioportal.org>, accessed on 15 March 2022.

Acknowledgments: We would also like to thank Emilie Floquet and Pascaline Segard for their technical assistance.

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

References

- Döhner, H.; Estey, E.; Grimwade, D.; Amadori, S.; Appelbaum, F.R.; Büchner, T.; Dombret, H.; Ebert, B.L.; Fenaux, P.; Larson, R.A.; et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **2017**, *129*, 424–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Boyer, T.; Gonzales, F.; Barthélémy, A.; Marceau-Renaut, A.; Peyrouze, P.; Guihard, S.; Lepelletier, P.; Plesa, A.; Nibourel, O.; Delattre, C.; et al. Clinical Significance of ABCB1 in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Study. *Cancers* **2019**, *11*, 1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Patergnani, S.; Danese, A.; Bouhamida, E.; Aguiari, G.; Previati, M.; Pinton, P.; Giorgi, C. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Park, C.Y.; Hoover, P.J.; Mullins, F.M.; Bachhawat, P.; Covington, E.D.; Raunser, S.; Walz, T.; Garcia, K.C.; Dolmetsch, R.E.; Lewis, R.S. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* **2009**, *136*, 876–890. [[CrossRef](#)]
- Kondratska, K.; Kondratskyi, A.; Yassine, M.; Lemonnier, L.; Lepage, G.; Morabito, A.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2263–2269. [[CrossRef](#)]
- Flourakis, M.; Lehen'kyi, V.; Beck, B.; Raphaël, M.; Vandenberghe, M.; Abeele, F.V.; Roudbaraki, M.; Lepage, G.; Mauroy, B.; Romanin, C.; et al. Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e75. [[CrossRef](#)]
- Chalmers, S.B.; Monteith, G.R. ORAI channels and cancer. *Cell Calcium* **2018**, *74*, 160–167. [[CrossRef](#)]
- Lewuillon, C.; Laguillaumie, M.O.; Quesnel, B.; Idziorek, T.; Touil, Y.; Lemonnier, L. Put in a “Ca(2+)” to Acute Myeloid Leukemia. *Cells* **2022**, *11*, 543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Patterson, S.D.; Huang, X.; Jørgensen, H.G.; Michie, A.M. Transcriptional Regulation by the NFAT Family in Acute Myeloid Leukaemia. *Hemato* **2021**, *2*, 556–571. [[CrossRef](#)]
- Li, S.; Garrett-Bakelman, F.E.; Chung, S.S.; Sanders, M.A.; Hricik, T.; Rapaport, F.; Patel, J.; Dillon, R.; Vijay, P.; Brown, A.L.; et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 792–799. [[CrossRef](#)]
- Metzelder, S.K.; Michel, C.; von Bonin, M.; Rehberger, M.; Hessmann, E.; Inselmann, S.; Solovey, M.; Wang, Y.; Sohlbach, K.; Brendel, C.; et al. NFATc1 as a therapeutic target in FLT3-ITD-positive AML. *Leukemia* **2015**, *29*, 1470–1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tyner, J.W.; Tognon, C.E.; Bottomly, D.; Wilmot, B.; Kurtz, S.E.; Savage, S.L.; Long, N.; Schultz, A.R.; Traer, E.; Abel, M.; et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature* **2018**, *562*, 526–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gao, J.; Aksoy, B.A.; Dogrusoz, U.; Dresdner, G.; Gross, B.; Sumer, S.O.; Sun, Y.; Jacobsen, A.; Sinha, R.; Larsson, E.; et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal* **2013**, *6*, p11. [[CrossRef](#)]
- 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](#)]
- Huang, S.D.; Yuan, Y.; Tang, H.; Liu, X.H.; Fu, C.G.; Cheng, H.Z.; Bi, J.W.; Yu, Y.W.; Gong, D.J.; Zhang, W.; et al. Tumor cells positive and negative for the common cancer stem cell markers are capable of initiating tumor growth and generating both progenies. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54579. [[CrossRef](#)]
- Nakano, A.; Tsuji, D.; Miki, H.; Cui, Q.; El Sayed, S.M.; Ikegame, A.; Oda, A.; Amou, H.; Nakamura, S.; Harada, T.; et al. Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27222. [[CrossRef](#)]

18. Touil, Y.; Segoula, Z.; Thuru, X.; Galiègue-Zouitina, S.; Tierny, D.; Quesnel, B. Aggressiveness Potential of Spontaneous Canine Mucosal Melanoma Can Dictate Distinct Cancer Stem Cell Compartment Behaviors in Regard to Their Initial Size and Expansion Abilities. *Stem Cells Dev.* **2020**, *29*, 919–928. [[CrossRef](#)]
19. Touil, Y.; Zuliani, T.; Wolowczuk, I.; Kuranda, K.; Prochazkova, J.; Andrieux, J.; Le Roy, H.; Mortier, L.; Vandomme, J.; Jouy, N.; et al. The PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low-Rhodamine123-retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity. *Stem Cells* **2013**, *31*, 641–651. [[CrossRef](#)]
20. Dubois, C.; Kondratska, K.; Kondratskyi, A.; Morabito, A.; Mesilmany, L.; Farfariello, V.; Toillon, R.A.; Ziental Gelus, N.; Laurence, E.; Vanden Abeele, F.; et al. ORAI3 silencing alters cell proliferation and promotes mitotic catastrophe and apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Biochim. Et Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **2021**, *1868*, 119023. [[CrossRef](#)]
21. Terrié, E.; Coronas, V.; Constantin, B. Role of the calcium toolkit in cancer stem cells. *Cell Calcium* **2019**, *80*, 141–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lee, S.H.; Rigas, N.K.; Lee, C.R.; Bang, A.; Srikanth, S.; Gwack, Y.; Kang, M.K.; Kim, R.H.; Park, N.H.; Shin, K.H. Orai1 promotes tumor progression by enhancing cancer stemness via NFAT signaling in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43239–43255.e4147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Aulestia, F.J.; Néant, I.; Dong, J.; Haiech, J.; Kilhoffer, M.C.; Moreau, M.; Leclerc, C. Quiescence status of glioblastoma stem-like cells involves remodelling of Ca(2+) signalling and mitochondrial shape. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bonora, M.; Kahsay, A.; Pinton, P. Mitochondrial calcium homeostasis in hematopoietic stem cell: Molecular regulation of quiescence, function, and differentiation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2021**, *362*, 111–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fukushima, T.; Tanaka, Y.; Hamey, F.K.; Chang, C.H.; Oki, T.; Asada, S.; Hayashi, Y.; Fujino, T.; Yonezawa, T.; Takeda, R.; et al. Discrimination of Dormant and Active Hematopoietic Stem Cells by G(0) Marker Reveals Dormancy Regulation by Cytoplasmic Calcium. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 4144–4158. [[CrossRef](#)]
26. Diez-Bello, R.; Jardin, I.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation. *Biochim. Et Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 1064–1070. [[CrossRef](#)]
27. Borella, G.; Da Ros, A.; Borile, G.; Porcù, E.; Tregnago, C.; Benetton, M.; Marchetti, A.; Bisio, V.; Montini, B.; Michielotto, B.; et al. Targeting the plasticity of mesenchymal stromal cells to reroute the course of acute myeloid leukemia. *Blood* **2021**, *138*, 557–570. [[CrossRef](#)]
28. Bachas, C.; Schuurhuis, G.J.; Assaraf, Y.G.; Kwidama, Z.J.; Kelder, A.; Wouters, F.; Snel, A.N.; Kaspers, G.J.; Cloos, J. The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse. *Leukemia* **2012**, *26*, 1313–1320. [[CrossRef](#)]
29. Liu, H.; Hughes, J.D.; Rollins, S.; Chen, B.; Perkins, E. Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* **2011**, *91*, 753–760. [[CrossRef](#)]
30. Kar, P.; Samanta, K.; Kramer, H.; Morris, O.; Bakowski, D.; Parekh, A.B. Dynamic assembly of a membrane signaling complex enables selective activation of NFAT by Orai1. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, 1361–1368. [[CrossRef](#)]
31. Lagunas-Rangel, F.A.; Chávez-Valencia, V. FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. *Med. Oncol.* **2017**, *34*, 114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Boyer, T.; Gonzales, F.; Plesa, A.; Peyrouze, P.; Barthelemy, A.; Guihard, S.; Quesnel, B.; Roumier, C.; Preudhomme, C.; Cheok, M. Flow Cytometry to Estimate Leukemia Stem Cells in Primary Acute Myeloid Leukemia and in Patient-derived-xenografts, at Diagnosis and Follow Up. *J. Vis. Exp. JoVE* **2018**, *26*, 56976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Table S1. Patient characteristics including age, sex, the French-American-British (FAB) classification of AML, the European LeukemiaNet (ELN) risk classification: favorable, intermediate or adverse risk, the percent of CD34+CD38- cells and Leukemic Stem Cell (LSC) score; N.D.: No Data

Patient	Age (y)	Sex	FAB	ELN	CD34+CD38- cells	LSC score*
AML#1	34	M	M0	3- adverse	82%	ND
AML#2	48	F	M5	ND	0.3%	ND
AML#3	30	M	M4	ND	18.4%	ND
AML#4	57	M	ND	ND	0.01%	ND
AML#5	72	F	M2	Favorable	18.2%	1
AML#6	78	M	M0	3- adverse	46%	3 inter II
AML#7	69	M	M2	3- adverse	22.0%	3 inter II
AML#8	50	F	M2	Favorable	<0.01%	ND
AML#9	69	M	M2	2- inter	ND	2 inter I

Table S2. Differential expression patterns of the 17 LSC gene signature described by Ng et.al [15] in ABCB1^{high} and ABCB1^{low} AML patients subgroups. RNA-seq data were generated by Tyner et al. [12] from n= 439 samples derived from patients with AML at diagnosis of the disease. P-value and q-value were indicated according to Student t-test and Benjamini Hochberg procedure respectively. Bold gene names are genes with significant differences.

(17 LSC gene signature) LSC genes ¹	ABCB1 ^{high}	ABCB1 ^{low}	p-value (derived from Student t-test)	q-value (derived from Benjamini Hochberg procedure)
CD34	higher expression	lower expression	1.09e-21	3.97e-19
LAPTM4B	higher expression	lower expression	1.808e-4	1.459e-3
NYRMIN	higher expression	lower expression	0.00529	0.0865
MMRNI	higher expression	lower expression	1.97e-8	2.03e-7
DNMT3B	higher expression	lower expression	2.521e-4	8.279e-4
KIAA0125	ND	ND	-	-
SOCS2	higher expression	lower expression	0.463	0.542
CPXM1	higher expression	lower expression	0.0923	0.139
AKR1C3	higher expression	lower expression	1.0310e-9	1.52e-8
GPR56	ND	ND	-	-
CDK4	higher expression	lower expression	0.0210	0.0390
CDK6	higher expression	lower expression	0.163	0.225
DPYSL3	lower expression	higher expression	0.0923	0.139
NGFRAP1	higher expression	lower expression	ND	ND
ARHGAP22	higher expression	lower expression	0.869	0.900
LOC284422	ND	ND	-	-
ZBTB46	higher expression	lower expression	3.69e-9	4.69e-8

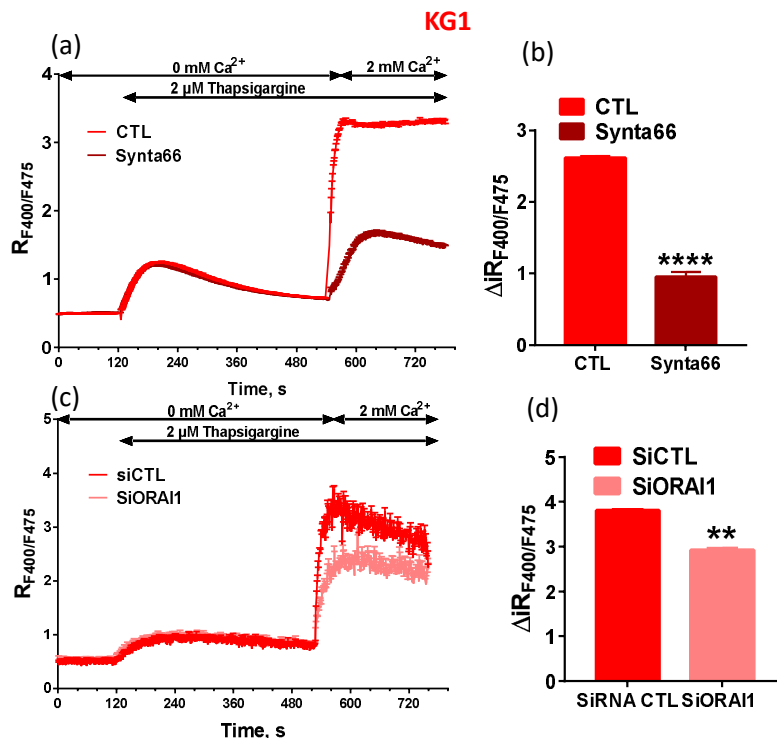


Figure S1. ORAI1 is involved in SOCE in KG1 leukemic cell line. Time course of Ca²⁺ cytosolic concentration using the Indo-AM ratiometric dye in KG1 cell line treated with the SOC channel inhibitor agent synta66 (a) or transfected with the control siRNA and siORAI1 (c). Each point represent mean of 3 independent experiments regrouping between 1,000 -10,000 cells. Calcium capacitive entry of KG1 leukemic cell line treated with synta66 (b) or transfected with the control siRNA and siORAI1 (d). ** p < 0.01, ****p < 0.0001. Three independent experiments were performed.

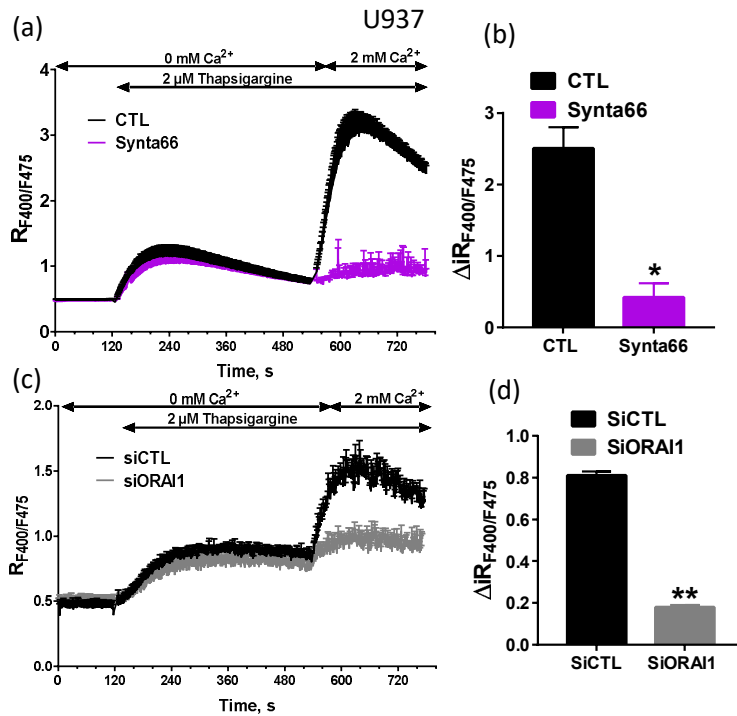


Figure S2. ORAI1 is involved in SOCE in U937 leukemic cell line. Time course of Ca^{2+} cytosolic concentration using the Indo-AM ratiometric dye in KG1 cell line treated with the SOC channel inhibitor agent synta66 (a) or transfected with the control siRNA and siORAI1 (c). Each point represent mean of 3 independent experiments regrouping between 1,000 -10,000 cells. Calcium capacitive entry of U937 leukemic cell line treated with synta66 (b) or transfected with the control siRNA and siORAI1 (d). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ Three independent experiments were performed.

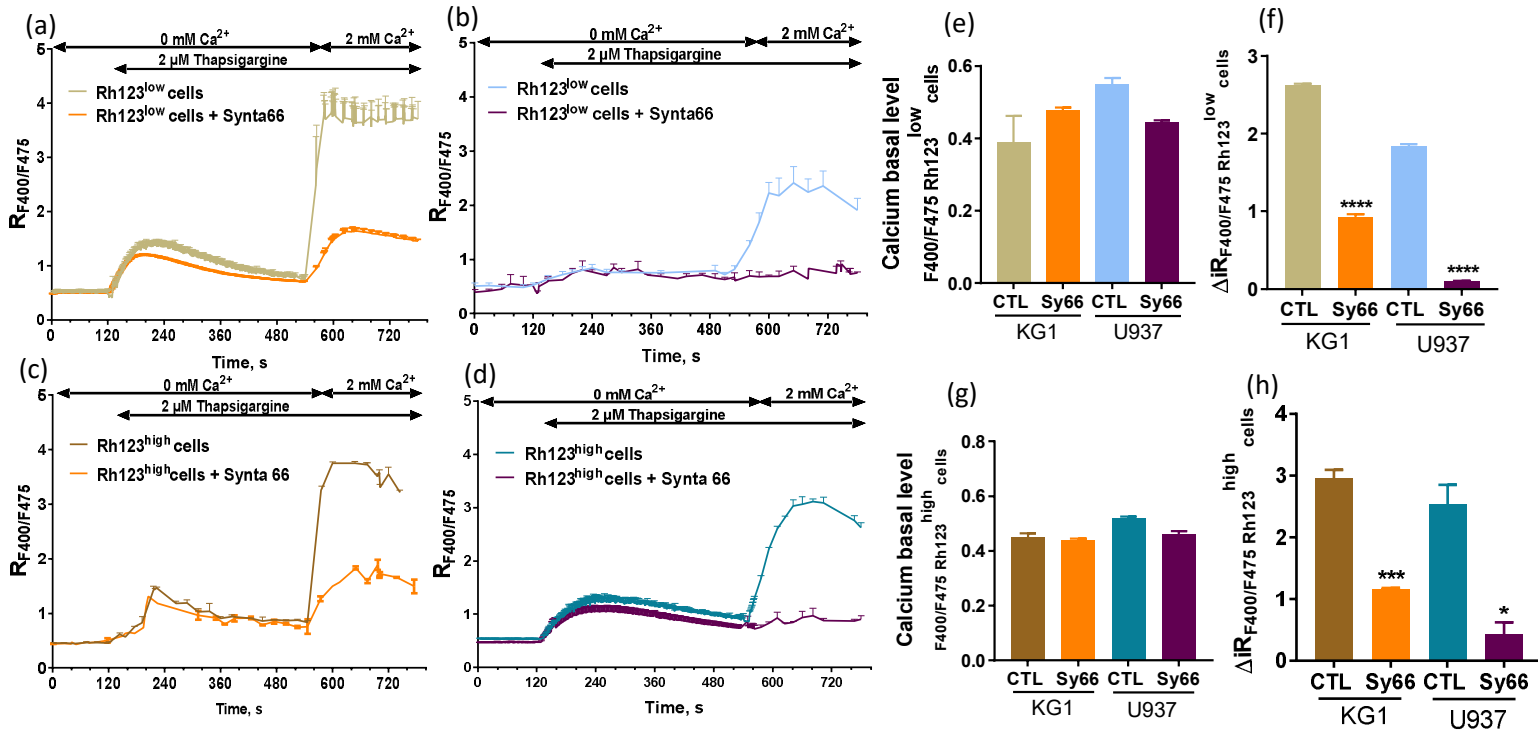


Figure S3. SOCE in Rh123^{low} and Rh123^{high} populations in KG1 and U937 cell lines. Cells were treated or not with 10 μM synta66. Time course of Ca^{2+} cytosolic concentration using the Indo-AM ratiometric dye in the KG1 (a and c) and U937 (b and d) Rh123^{low} and Rh123^{high} populations respectively. Each point represent mean of 3 independent experiments regrouping between 1,000 -10,000 cells. Analysis by flow cytometry of the F400/F475 ratio reflecting the calcium basal level and the capacitive Ca^{2+} entry in the KG1 and U937 Rh123^{low} (e and f respectively) and Rh123^{high} (g and h respectively) subpopulations. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Three independent experiments were performed.

Table S3. LSC compartment identified by CD34+CD38- phenotype combined with Rh123 exclusion assay in KG1 and U937 AML cell lines. Percentage of Rh123^{low} and Rh123^{high} cell compartment associated with or without CD34 and CD38 surface markers analyzed by flow cytometry in control condition, after 24 h of treatment with synta66 10 μM , transfected cells with control siRNA or siORAI1.

AML cell lines		Rh123 ^{high}	Rh123 ^{low}	CD34 ⁺ CD38 ⁻	Rh123 ^{high} CD34 ⁺ CD38 ⁻	Rh123 ^{low} CD34 ⁺ CD38 ⁻
KG1	Control	0.084±0.031	99.93±0.033	13.23±3.6	0.002±0.002	13.2±3.6
	Synta66	0.083±0.026	99.93±0.033	14.2±5.2	0.0022±0.01	14.2±5.2
U937	Control	96.83±0.85	3.14±0.85	0.04±0.011	0.013±0.01	0.03±0.01
	Synta66	95.5±2	4.5±2.1	0.03±0.01	0.01±0.001	0.02±0.01
KG1	SiCTL	0.092±0.012	99.32±0.01	15.25±3.3	0.0018±0.002	15.25±3.3
	SiORAI1	0.098±0.032	99.28±0.02	16.2±2.2	0.0032±0.02	16.2±2.2
U937	SiCTL	95.84±0.65	4.15±0.25	0.05±0.01	0.022±0.01	0.04±0.01
	SiORAI1	93.2±2	6.5±2.2	0.04±0.01	0.02±0.001	0.03±0.01

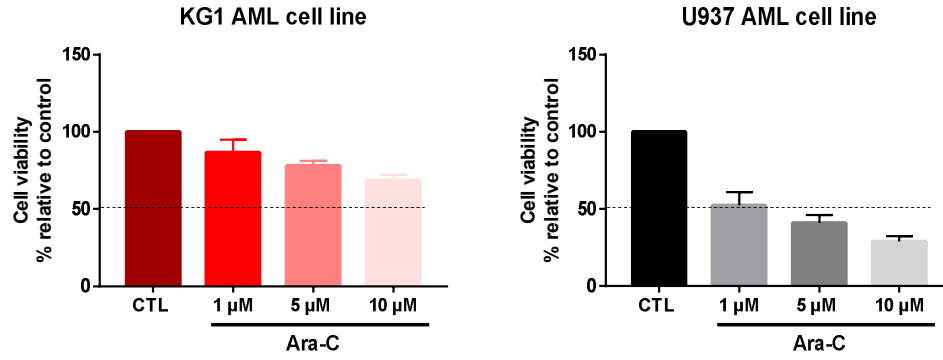


Figure S4. KG1 and U937 cell viability following Ara-C treatment. Viable cells were counted by exclusion trypan blue after a Ara-C exposure at indicated concentrations during 24 hours .

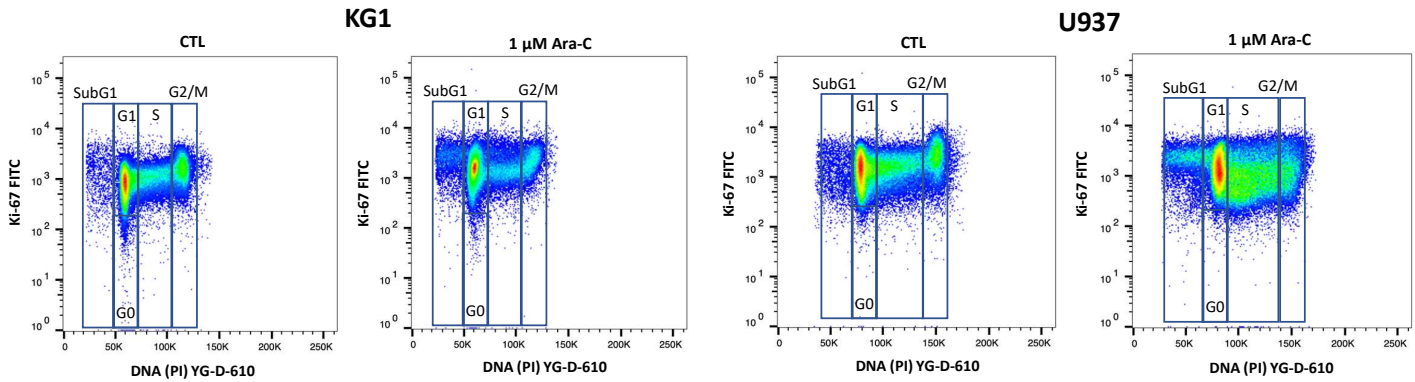


Figure S5. Cell cycle analysis of KG1 and U937 AML cell lines after Ara-C treatment. Cells were treated for 24 hours with 1 Ara-C during 24h and cell cycle analysis were assessed following Ki-67 and Propidium iodide (PI) double staining.

Table S5. LSC compartment identified by CD34+CD38- phenotype combined with Rh123 exclusion assay in KG1 and U937 AML cell lines after Ara-C treatment. Percentage of Rh123^{low} and Rh123^{high} cell compartment associated with or without CD34 and CD38 surface markers analyzed by flow cytometry, in control condition or after 24 h of treatment with the indicated concentration of Ara-C. * p ≤ 0.05

AML cell lines		Rh123 ^{high}	Rh123 ^{low}	CD34 ⁺ CD38 ⁻	Rh123 ^{high} CD34 ⁺ CD38 ⁻	Rh123 ^{low} CD34 ⁺ CD38 ⁻
KG1	Control	0.036±0.006	99.93±0.03	4.8±0.87	0.01±0.002	4.8±0.9
	Ara-C 1 μM	0.05±0.016	99.93±0.03	8.5±0.5*	0.02±0.01	8.5±0.5*
	Ara-C 5 μM	0.040±0.009	99.97±0.03	9.8±0.5*	0.01±0.003	9.8±0.5*
	Ara-C 10 μM	0.057±0.010	99.97±0.03	9.95±0.08*	0.02±0.003	9.94±0.1*
U937	Control	97.1±0.794	2.9±0.8	0.04±0.01	0.02±0.003	0.02±0.003
	Ara-C 1 μM	80.83±7.1	19.2±7.1	0.04±0.012	0.01±0.002	0.034±0.01*
	Ara-C 5 μM	67.133±5	32.9±5	0.063±0.02	0.013±0.003	0.05±0.02*
	Ara-C 10 μM	68.4±3.55	31.6±3.6	0.06±0.02	0.014±0.003	0.05±0.02*

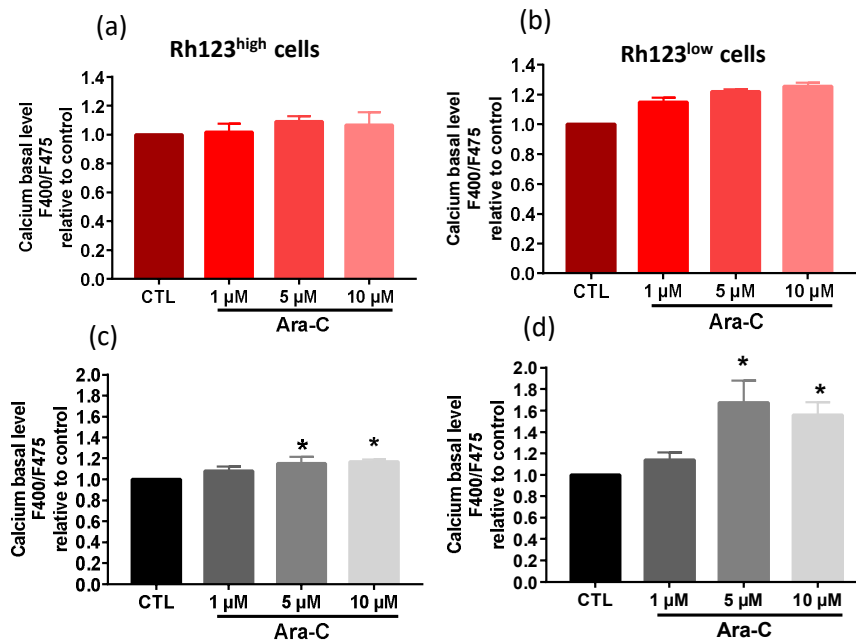


Figure S6. Analysis by flow cytometry of the F400/F475 ratio reflecting the calcium basal level in the KG1 and U937 Rh123^{high} (a and c respectively) and Rh123^{low} (b and d respectively) populations treated or not with the indicated concentrations of Ara-C. * p ≤ 0.05

Table S6. LSC compartment identified by CD34⁺CD38⁻ phenotype combined with Rh123 exclusion assay in AML#1 and AML#2 primary cells after Ara-C treatment. Percentage of Rh123^{low} and Rh123^{high} cell compartment associated with or without CD34 and CD38 surface markers analyzed by flow cytometry in control condition or after 24 h of treatment with indicated concentration of Ara-C.

AML Patient #1	Rh123 ^{high}	Rh123 ^{low}	CD34 ⁺ CD38 ⁻	Rh123 ^{high} CD34 ⁺ CD38 ⁻	Rh123 ^{low} CD34 ⁺ CD38 ⁻
Control	2	98	82	0.009	81.9
Ara-C 5μM	2	98	78	0.047	78
AML Patient #2	Rh123 ^{high}	Rh123 ^{low}	CD34 ⁺ CD38 ⁻	Rh123 ^{high} CD34 ⁺ CD38 ⁻	Rh123 ^{low} CD34 ⁺ CD38 ⁻
Control	58.8	40.2	0.3	0.1	0.2
Ara-C 5μM	25.7	74.3	0.3	0.06	0.3

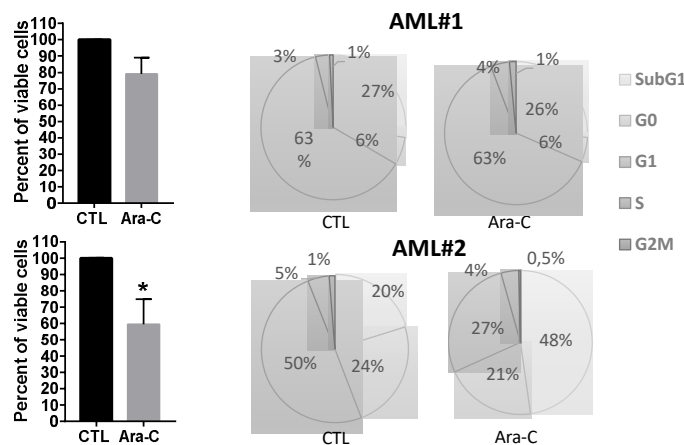


Figure S7. Effect of Ara-C on viability and cell cycle in AML patient #1 and patient #2. Cells were either in a control condition or treated for 24h with Ara-C 5 μM. Two independent experiments were performed. Percentage of viable cells counted with trypan blue exclusion staining. Cell cycle analysis with Ki67/PI staining of AML#1 and AML#2 in control condition and following 5 μM Ara-C treatment.

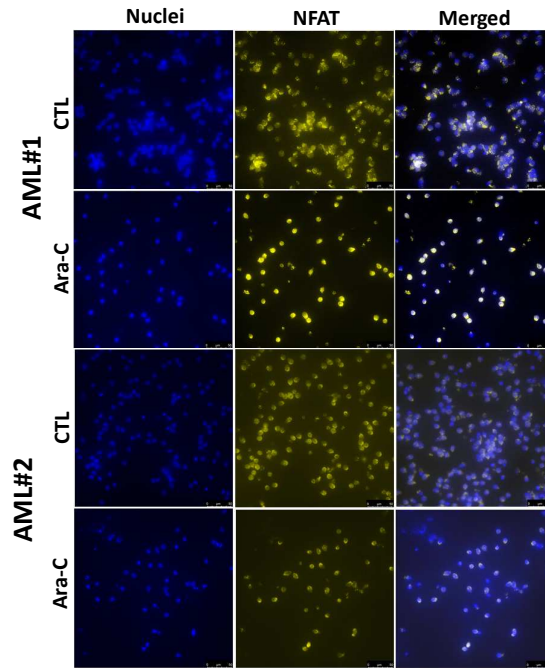


Figure S8. Effect of Ara-C on the NFAT localization in AML primary cells. Confocal analysis showing expression and localization of NFAT (Alexa Fluor 568) and nuclei (Hoechst, blue) in control and Ara-C-treated cells conditions in the AML patient #1 and #2.

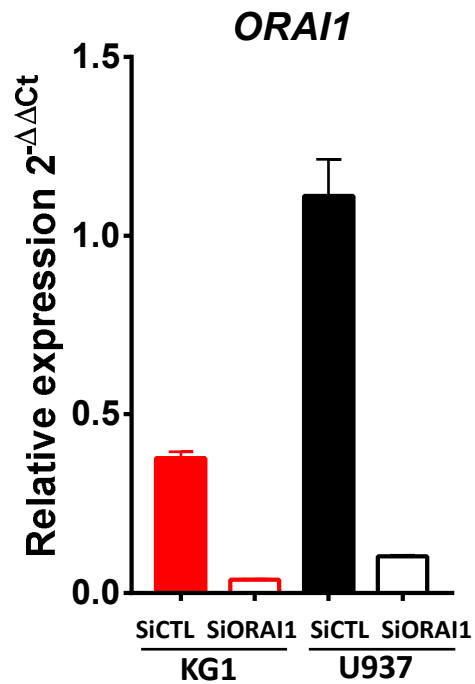


Figure S9. Relative ORAI1 expression in transfected KG1 and U937 cells with control SiRNA (SiCTL) and ORAI1 SiRNA (SiORAI1) determined by RT-qPCR.

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

1. Le modèle expérimental de microfluidique permet d'étudier la synapse immunologique

Les résultats publiés dans notre article « *Pairing cells of different sizes in a microfluidic device for immunological synapse monitoring* » (Shaik *et al.* 2022) ont permis de montrer la validation expérimentale de la technologie microfluidique pour mettre en contact deux types cellulaires différents (lignées et échantillons de patients) et étudier leur interaction fonctionnelle à l'échelle de la cellule unique.

Nous avons pu observer la formation de la synapse immunologique et ainsi mieux comprendre les interactions fonctionnelles entre les LT CD8⁺ et les cellules leucémiques isolées à partir de patients. Plus spécifiquement, la technologie microfluidique nous a permis d'étudier la réponse immunitaire du LT CD8⁺ contre la cellule cible, à savoir la réponse calcique suivie, ou non, de la lyse cytotoxique. Cette lyse cytotoxique peut s'avérer dysfonctionnelle et ainsi expliquer une des causes de la progression du cancer.

L'étude de l'interaction directe entre ces deux cellules a permis de mieux comprendre (i) les mécanismes de résistance des cellules leucémiques (axe PD-1/PD-L1) et (ii) le dysfonctionnement du LT CD8⁺ contre la cellule cancéreuse. L'hétérogénéité et la rareté des LT et cellules leucémiques d'échantillons primaires de patients avec des propriétés de résistance selon le stade de la maladie nécessitent une étude à l'échelle de la cellule unique afin de caractériser les différentes signatures des synapses immunologiques. Nous étudions les événements au cours des interactions entre des sous-populations rares et c'est pourquoi le besoin d'étudier ces interactions à l'échelle de la cellule unique a mené à une collaboration avec l'équipe SMMiL-E spécialisée en microfluidique.

Malgré l'hétérogénéité des interactions entre les cellules immunitaires et cancéreuses causée par leurs propriétés spécifiques, notre méthode permet de réaliser des études fonctionnelles détaillées au niveau de la synapse immunologique reflétant la diversité des comportements des cellules immunitaires et des cellules malignes. Le suivi détaillé des interactions au niveau d'une seule paire de cellules permet de découvrir des mécanismes clés pour améliorer l'efficacité de diverses stratégies immunothérapeutiques.

La microfluidique nous a permis (i) d'optimiser la capture de paires de cellules entre un LT et une cellule leucémique pour étudier efficacement la réponse calcique de cellules isolées ou de paires de cellules et (ii) favoriser le contact entre un LT et une cellule leucémique en fonction des phénotypes des deux types cellulaires afin d'évaluer les

différentes signatures calciques des paires de cellules formées. Nos microsystèmes facilitent également (iii) l'ajout d'inhibiteurs des canaux calciques membranaires SOCs durant les cinétiques afin de mieux comprendre cette signature calcique et d'évaluer leur impact sur les événements cellulaires et moléculaires comme la lyse cytotoxique, la formation de la synapse immunologique ou encore le signal calcique de la synapse immunologique. Enfin, la technologie microfluidique (iv) réduit considérablement le nombre de cellules nécessaires pour la formation de cette synapse immunologique.

L'étude de la signalisation calcique de la synapse immunologique grâce aux microsystèmes de microfluidique est une technique expérimentale novatrice toutefois peu utilisée. À ce jour, seule l'équipe de Dura *et al.* a réalisé cette étude à partir de lignées cellulaires humaines ou de cellules primaires de souris (Dura *et al.* 2015; 2016) et notre étude est donc la première à avoir réalisé l'analyse de l'homéostasie calcique de synapses immunologiques de cellules de patients atteints de LAM au diagnostic.

L'optimisation de ces microsystèmes de microfluidique ainsi que la mise en place de protocoles efficaces ont permis à ce jour d'étudier pour 14 patients LAM au diagnostic les interactions entre leurs sous-populations de cellules leucémiques et de LT CD8⁺ lors de la formation de synapses immunologiques à l'échelle de la cellule unique.

2. Il existe une expression hétérogène des marqueurs extracellulaires des cellules leucémiques de patients LAM

Pour ces 14 patients, nous avons phénotypé par cytométrie en flux les cellules leucémiques, ce qui nous a permis d'observer que malgré une hétérogénéité cellulaire inter-patients, la sous-population CD33⁺ CD34⁺ CD38⁻ possédant les caractéristiques des CSL est une population faiblement représentée chez tous ces patients. En accord avec nos résultats, il a été montré dans la littérature que le niveau de CD33 exprimé par les cellules souches CD34⁺ CD38⁻ de patients LAM variait selon les patients. Les patients atteints de LAM CD33⁺, définie par une expression de CD33 à plus de 60% par les cellules leucémiques, possèdent une majorité de CSL associées au phénotype CD34⁺ CD38⁻ CD33⁺. Cependant, pour les patients LAM avec un seul sous-ensemble de cellules leucémiques exprimant CD33, seule une sous-population minoritaire de CSL exprime CD33. Enfin, les patients atteints de LAM CD33⁻ présentent des CSL en grande partie CD33⁻ (Hauswirth *et al.* 2007).

Deux raisons pourraient expliquer le faible pourcentage de CSL CD33⁺ CD34⁺ CD38⁻ observé dans nos résultats. La première est la faible représentation au diagnostic de cette sous-population responsable de la prolifération des cellules leucémiques et de la rechute

après traitement (Bonnet D et Dick JE, 1997). La seconde raison pourrait être due à l'hétérogénéité inter-patient qui est très importante dans cette pathologie.

Nos résultats semblent également montrer une sous-expression des marqueurs de surface PD-L1, CD33, HLA-DR et TIM-3 caractéristiques des cellules leucémiques persistantes chez les CSL CD34⁺ CD38⁻ comparées à la population totale des cellules leucémiques chez les patients atteints de LAM au diagnostic. De même, comparées à la population CD34⁻, les populations CSL CD34⁺ CD38⁻ et enrichies en CS CD34⁺ sous-expriment ces marqueurs de surface. Ceci est en corrélation avec l'étude de Haubner *et al.* qui montre également une plus faible expression des marqueurs de surface CD33 et TIM-3 chez les CSL comparées à la population totale des cellules leucémiques (Haubner *et al.* 2019). Néanmoins, de nombreuses études ont montré une surexpression de TIM-3 par les CSL permettant de les discriminer des CSH normales (Jan *et al.* 2011; Kikushige *et al.* 2010).

Cette disparité entre les études de la littérature et nos résultats peut s'expliquer par les corrélations pouvant exister entre les nombreuses anomalies génétiques de la LAM, qui sont facteurs de risques pronostiques, et la surexpression de TIM-3 dans les CSL. En effet, y aurait-il un lien entre la surexpression de TIM-3 et les différents aspects du pronostic (résistance des CSL aux thérapies, rechute, survie) et la surexpression de TIM-3 modifie-t-elle la fonction des CSL ? Des études plus approfondies sur l'expression de TIM-3 dans les LAM permettrait de mieux comprendre cette différence d'expression observée dans les études.

Une sous-expression de HLA-DR, qui est un type de CMH de type II et dont le complexe avec l'antigène se lie au TCR, peut être expliquée par la diminution de son expression par les CSL afin d'éviter la reconnaissance des LT, et ainsi échapper à l'immunosurveillance et la formation de la synapse immunologique pouvant mener à la lyse cytotoxique (Thomas et Majeti 2017).

PD-L1 est exprimé constitutivement dans 30% à 60% des cellules leucémiques selon les patients atteints de LAM. Son taux d'expression varie également de 18% à 50% entre le sang périphérique et la MO (Berthon *et al.* 2010). Cette variation du niveau d'expression pourrait expliquer la difficulté à obtenir des cellules PD-L1⁺ dans les échantillons de patients étudiés.

Toutefois, la sous-expression de PD-L1 au sein de la population CD34⁺ CD38⁻ et la représentation minoritaire de la sous-population CD33⁺ PD-L1⁺ paraissent être en contradiction avec les données trouvées dans la littérature qui indiquent que l'expression de PD-L1 semble être plus importante parmi les cellules CD34⁺ (Yang *et al.* 2014).

Cependant, d'autres études n'ont pas trouvé de corrélation entre l'expression de PD-L1 et la forte expression de CD34 par les cellules de la LAM (Brodská *et al.* 2019).

L'expression de PD-L1 peut également dépendre du statut quiescent ou prolifératif de la cellule tumorale. Payne *et al.* ont en effet montré que les cellules au cycle cellulaire ralenti étaient plus susceptibles de surexprimer PD-L1 par rapport aux cellules quiescentes. Associer le phénotypage avec l'étude du statut quiescent ou prolifératif des cellules permettrait de conclure sur la raison pour laquelle ces cellules expriment faiblement PD-L1 (Payne *et al.* 2016).

Il a été montré par notre équipe que l'expression de PD-L1 est augmentée au moment de la rechute par rapport au diagnostic (Berthon *et al.* 2010). D'autres données ont mis en évidence que l'expression de PD-L1 est induite par NFAT (Ritprajak et Azuma 2015), et que NFAT est plus exprimé au sein des cellules primaires de LAM en rechute plutôt qu'au diagnostic (Patterson *et al.* 2021). Ces observations pourraient expliquer la faible expression de PD-L1 dans les échantillons de patients LAM au diagnostic analysés pour notre étude et nous montrent l'importance de comparer les cellules du même patient en rechute.

Une étude approfondie de l'expression de NFAT et ses isoformes serait également nécessaire car une équipe a montré que l'expression des isoformes de NFAT dépendait du stade de différenciation des cellules leucémiques. Ainsi, déterminer quelles isoformes de NFAT sont exprimées au sein des sous-populations aiderait à confirmer si une différence d'expression de PD-L1 est induite en fonction de l'isoforme de NFAT exprimée (Metzelder *et al.* 2015).

Nous avons également pu déterminer qu'un traitement à l'IFN γ mimant la sécrétion de cette cytokine par le LT provoque une augmentation de la population CD33⁺ PD-L1⁺. Cette augmentation de l'expression de PD-L1 après un traitement à l'IFN γ correspond à ce qui est observé dans la littérature où des études montrent une augmentation de l'expression de PD-L1 par les cellules leucémiques après stimulation à l'IFN γ (Berthon *et al.* 2010; Norde *et al.* 2011). Il y aurait donc une résistance adaptative des cellules leucémiques suite à leur interaction avec le microenvironnement comprenant les LT (Sehgal, Whiteside, et Boyiadzis 2015; Aqbi *et al.* 2018). Il serait intéressant de déterminer également si l'effet de l'IFN γ sur l'expression de PD-L1 varie en fonction du phénotype des cellules leucémiques et des CSL notamment. Les cellules leucémiques montreraient-elles une résistance adaptative en fonction de leurs propriétés intrinsèques en lien ou non avec la signature calcique ?

Un modèle *in vivo* de dormance leucémique a montré que PD-L1 était surexprimé par les cellules leucémiques résiduelles afin de leur permettre d'échapper à la lyse cytotoxique

(Saudemont et Quesnel 2004). D'autres études ont également montré la surexpression de PD-L1 par les cellules CD34⁺ responsables de la rechute et également par les cellules quiescentes. Les chercheurs ont aussi mis en évidence que cette expression de PD-L1 pouvait être corrélée à de plus faibles chances de survie (Chen *et al.* 2008; Brodská *et al.* 2019).

L'hétérogénéité d'expression des marqueurs de surface observée dans nos résultats et la littérature montre l'intérêt d'étudier et mieux caractériser les phénotypes résistants de la LAM au moment du diagnostic, de la MRD et de la rechute afin de comprendre leur interaction avec le SI et comparer l'activité des synapses immunologiques formées en fonction du statut souche et non souche, quiescent ou prolifératif des cellules leucémiques de patients LAM provenant du sang périphérique et de la moelle osseuse. Le manque de temps et la fatalité de la maladie n'auront pas permis de réaliser cette étude sur la MRD et la rechute au cours de mon projet de thèse.

3. Il existe une expression hétérogène des marqueurs extracellulaires des LT de patients LAM et individus sains en fonction de leur statut de différenciation

Le phénotypage des LT CD8⁺ de 14 patients atteints de LAM au diagnostic ainsi que des donneurs sains a mis en évidence une hétérogénéité inter-patients concernant l'expression de PD-1. On observe que les donneurs sains présentent une population de LT CD8⁺ qui exprime plus PD-1 que celle des patients LAM, ce qui est en désaccord avec plusieurs études ayant montré que la fréquence de LT CD8⁺ exprimant PD-1 était supérieure chez les patients LAM comparée à celle des donneurs sains, mettant ainsi en évidence le caractère dysfonctionnel des LT de patients LAM (Knaus *et al.* 2018; Williams *et al.* 2019). Cette contradiction entre nos résultats et la littérature peut s'expliquer par un biais dans les échantillons de donneurs sains. En effet, ne possédant que des données limitées à leur sujet, il est difficile de déterminer leur profil et d'identifier la raison d'une forte expression de PD-1.

L'expression de PD-1 par les LT de donneurs sains et LAM est augmentée après activation des cellules à l'aide de billes CD3/CD28 et d'IL-2. Cette augmentation peut s'expliquer par l'activation de la voie Ca²⁺/calcineurine/NFAT lors de l'activation du LT. En effet, il a été montré que NFAT2 est responsable de l'induction de l'expression de PD-1 (Srinivasan et Frauwirth 2007; Oestreich *et al.* 2008). Une activation du LT peut donc

également aboutir à l'activation de voies de rétrocontrôle responsables de son inactivation/épuisement.

La diversité des sous-populations de LT CD8⁺ périphériques concernant leur état de différenciation et de fonctionnalité rend nécessaire la caractérisation des LT CD8⁺ répondant au blocage de PD-1. Cela permettrait d'élargir notre compréhension de ce mécanisme inhibiteur et ainsi prévoir la réponse anti-leucémique des LT et leur efficacité après une immunothérapie (Khanniche *et al.* 2022).

L'étude de Le Dieu *et al.* nous a aidés à caractériser les états de différenciation des LT CD8⁺ de donneurs sains et LAM exprimant ou non PD-1 (Le Dieu *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2021). Nos résultats montrent que les populations CD8⁺ PD-1⁻ des LT sains et LAM ont une plus forte proportion de LT effecteurs que la population CD8⁺ PD-1⁺. Ceci peut s'expliquer par le fait que les LT CD8⁺ PD-1⁻, moins épuisés, répondent plus rapidement et à de plus faibles stimuli que les LT CD8⁺ PD-1⁺ (Kaech et Cui 2012). On observe également, parmi les donneurs sains et LAM, que les LT CD8⁺ PD-1⁺ sont majoritairement effecteurs mémoires, comme observé dans l'étude de Wang *et al.* (Wang *et al.* 2018). Nos résultats montrent que les LT sains possèdent une plus grande population de LT effecteurs que les LT de patients LAM, ce qui est en désaccord avec les recherches d'autres équipes. Nos résultats peuvent cependant expliquer que les LT de donneurs sains soient moins épuisés que les LT de patients LAM et présentent donc une plus forte activité.

Dans la littérature, seules quelques équipes montrent le nombre, la distribution et le statut fonctionnel des LT dans la LAM. Ces résultats contrastés peuvent donc refléter l'hétérogénéité de la maladie, le stade de la maladie, le nombre limité de patients évalués et les différences entre ces patients (Le Dieu *et al.* 2009; Wang *et al.* 2018; Knaus *et al.* 2018; Williams *et al.* 2019).

La faculté de lyse cytotoxique de ces LT en fonction de leur activation a ensuite été évaluée et nos résultats ne semblent pas indiquer de différence d'efficacité de lyse cytotoxique entre les LT de donneurs sains non activés et activés pendant 3 ou 7 jours. Ceci peut s'expliquer par le fait que même les LT sains non activés présentent une forte proportion de LT effecteurs et effecteurs mémoires comme le montrent les résultats du phénotypage. Les LT de donneurs sains activés pendant 14 jours sont ceux réalisant la meilleure lyse cytotoxique, ce qui pourrait être dû à une activation suffisamment longue pour obtenir la proportion maximale de LT effecteurs et effecteurs mémoires. Cependant, les LT activés 10 ou 14 jours présenteraient peut-être déjà un phénotype épuisé justifié par leur plus faible sécrétion d'IFN γ , ceci en comparaison avec les LT de donneurs sains activés pendant 7 jours (Peng *et al.* 2001).

L'efficacité de lyse cytotoxique ne varie pas entre les LT de patients LAM PD-1⁺ ou PD-1⁻. Or, le phénotypage du statut de différenciation des LT montre une plus forte proportion de LT effecteurs au sein des LT LAM PD-1⁻ mais une plus forte proportion de LT effecteurs mémoires au sein des LT LAM PD-1⁺. Cet équilibre peut expliquer la capacité de lyse cytotoxique équivalente au sein de deux sous-populations différentes de LT de patients LAM.

L'activation d'un LT déclenche la voie de signalisation du TCR qui permet, à terme, la translocation de NFAT au noyau pour induire la sécrétion d'IFN γ . Ceci explique la plus forte sécrétion d'IFN γ par les LT LAM activés contrairement aux LT LAM de la population totale ou PD-1⁺ non activés.

Lorsque étudiés simultanément, la sécrétion d'IFN γ est plus importante pendant la lyse cytotoxique des LT de patients LAM et notamment pour les LT LAM PD-1⁺ comparée à celle des patients de LT sains activés ou non. Ceci est en corrélation avec le fait que le phénotypage montre une proportion plus importante de LT effecteurs mémoires au sein des LT LAM PD-1⁺.

L'étude de la lyse cytotoxique et la sécrétion de cytokines reste toutefois incomplète à ce jour. Il serait intéressant de vérifier l'efficacité de lyse des LT de donneurs sains et LAM selon leur phénotype et leur expression de PD-1. PD-1 pourrait, en effet, être un marqueur d'activation transitoire ou de dysfonctionnement du LT.

Il serait aussi pertinent de coupler l'étude de la lyse cytotoxique avec la réponse calcique des cellules lors de la formation de la synapse immunologique. Une étude a en effet montré une activité cytotoxique dépendante des concentrations calciques intracellulaires et extracellulaires. Ainsi, une réponse calcique forte ne détermine pas nécessairement la lyse cytotoxique, et des concentrations en dehors d'une gamme optimale permettant l'activation du LT entraînent l'inhibition partielle de son activité cytotoxique. Ce mécanisme serait modulé par l'expression de *ORAI1* à la surface des LT car une extinction totale ou partielle de l'expression de *ORAI1* inhibe ou augmente respectivement l'activité cytotoxique (Zhou *et al.* 2018).

Les pourcentages de lyse cytotoxique différents observés dans nos résultats selon les paires de cellules formées lors de la synapse immunologique peuvent donc s'expliquer par des concentrations calciques intra- et extracellulaires en dehors des valeurs optimales pour certains phénotypes. Déterminer les concentrations calciques optimales permettrait une meilleure activation des LT en fonction de leur phénotype.

De même, vérifier l'expression des canaux SOCs au sein des LT en fonction de leur phénotype permettrait peut-être de prédire l'efficacité de la lyse cytotoxique.

4. L'homéostasie calcique diffère entre les LT de patients LAM et d'individus sains

L'étude fonctionnelle de la réponse calcique des sous-populations étant primordiale afin de comprendre les défauts de lyse cytotoxique, les sous-populations cellulaires phénotypées ont été étudiées de manière isolée afin d'évaluer leur homéostasie calcique. L'implication des canaux calciques dans l'entrée capacitive de Ca^{2+} a été vérifiée grâce à l'inhibiteur des canaux SOCs, le synta66, que ce soit pour les LT de donneurs sains, LAM et les cellules leucémiques.

Dans notre article « *Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure* » (Lewuillon *et al.* 2022), nous démontrons que les canaux calciques SOCs, et plus particulièrement ORAI1, interviennent dans l'entrée capacitive de Ca^{2+} des lignées cellulaires LAM humaines et des cellules primaires de patients LAM. Nos résultats sur 14 échantillons de patients LAM confirment l'implication des canaux SOCs dans l'entrée capacitive de Ca^{2+} des cellules leucémiques.

Les stocks calciques réticulaires des LT de donneurs sains sont diminués et ceux des LT de patients LAM sont augmentés après un traitement au synta66, inhibiteur des canaux SOCs. Le synta66 induit également une diminution de l'entrée capacitive de Ca^{2+} au sein des LT de donneurs sains et de patients LAM, bien que cette diminution soit moins accentuée au sein des LT de patients LAM.

L'association possible des canaux ORAI et senseurs STIM avec les canaux TRP dans les cancers peut expliquer une entrée capacitive moins inhibée au sein des LT de patients LAM. Cette association et réorganisation calcique a été observée dans les cancers du sein, du colon et de l'estomac pour permettre la migration tumorale et expliquerait la signature calcique spécifique des cellules leucémiques (Chakraborty *et al.* 2016; Guéguinou *et al.* 2016; Xu *et al.* 2016).

Par ailleurs, il a été montré qu'une surexpression des STIM et ORAI au sein de cellules d'adénocarcinome rénal augmente la concentration calcique intracellulaire et modifie l'homéostasie calcique de manière à induire des processus oncogènes. Par conséquent, les LT de patients LAM pourraient surexprimer STIM et ORAI, mais également exprimer d'autres acteurs impliqués dans l'entrée capacitive de calcium qui seraient insensibles à l'agent inhibiteur synta66 spécifique des canaux ORAI1. Compte tenu des processus pro-survie et anti-apoptotique des cellules de patients LAM, le rôle de STIM1 et des canaux SOCs peut différer entre les LT sains et les LT LAM, ce qui expliquerait la plus

forte concentration calcique cytosolique de ces derniers (Jardin et Rosado 2016; Kim *et al.* 2014; Kondratska *et al.* 2014).

Les mitochondries sont des organites cruciaux qui, non seulement régulent la production d'énergie cellulaire et l'apoptose, mais contrôlent également la signalisation intracellulaire du Ca^{2+} , notamment par leur capacité à moduler les canaux SOCs en absorbant le Ca^{2+} (Samanta, Douglas, et Parekh 2014; Patron *et al.* 2014). Par effet Warburg, les cellules tumorales remodelent leur métabolisme pour utiliser la glycolyse avec une phosphorylation oxydative réduite (Lewuillon *et al.* 2022). Le Ca^{2+} peut stimuler l'oxydation et la phosphorylation de substrats dans les mitochondries, ce qui peut être renforcé dans les cellules tumorales présentant une signalisation calcique accrue. La production de ROS par la mitochondrie induit la libération du cytochrome c et active l'apoptosome, entraînant alors la mort cellulaire dépendante des caspases. De ce fait, on peut supposer que les LT de patients LAM augmentent leur stock calcique réticulaire afin d'éviter de transférer le Ca^{2+} dans les stocks transitoires de la mitochondrie lorsque le RE ne peut plus stocker de Ca^{2+} . Ce mécanisme permet d'éviter une accumulation de Ca^{2+} dans la mitochondrie et l'induction de l'apoptose.

Néanmoins, en condition normale, le stock calcique réticulaire et l'entrée capacitive de Ca^{2+} sont diminués au sein des LT de patients LAM par rapport aux LT sains. Cela pourrait correspondre à un moyen d'adaptation afin d'éviter une trop forte entrée capacitive de Ca^{2+} dans la cellule qui mènerait à une surcharge calcique dans le RE. Cette surcharge entraînerait à son tour le transfert de Ca^{2+} à la mitochondrie qui, suite à une accumulation de Ca^{2+} , déclencherait les voies apoptotiques.

L'entrée capacitive de Ca^{2+} favorise la prolifération alors que la libération des stocks calciques favorise la mort cellulaire. C'est pourquoi une surexpression des canaux SOCs déclenche des voies de pro-survie alors que les mitochondries, qui n'accumulent pas le Ca^{2+} traversant la membrane plasmique mais celui libéré par le RE, jouent un rôle central dans la mort cellulaire (Meier et Vousden 2007; DeBerardinis *et al.* 2008).

5. L'homéostasie calcique impacte l'activation des LT

Nos résultats préliminaires mettent en avant un stock calcique réticulaire plus élevé mais une entrée capacitive de Ca^{2+} plus faible de la part des LT de patients LAM $\text{CD8}^+ \text{PD-1}^-$ comparés aux LT LAM $\text{CD8}^+ \text{PD-1}^+$. On peut supposer que le stock calcique réticulaire est plus important pour les LT PD-1^+ que pour les LT PD-1^- car la présence de PD-1 est associée à un phénotype épuisé, notamment suite à son expression causée par l'activation de NFAT et ses co-activateurs. En effet, des études ont montré une association entre le

facteur de transcription NFAT et le phénotype épuisé des LT (Mognol *et al.* 2017). Un phénotype de LT épuisé montre une quantité élevée de facteurs de transcriptions NFAT, IRF4 et BATF qui favorisent l'expression de récepteurs inhibiteurs comme PD-1. Ces derniers altèrent les fonctions effectrices et le métabolisme des LT épuisés. Ces facteurs de transcription étant dépendants de la signalisation calcique, les stocks calciques réticulaires seraient plus élevés au sein des LT épuisés afin de libérer suffisamment de Ca^{2+} pour activer la voie $Ca^{2+}/CaM/Calcineurine$ et maintenir le niveau d'expression de ces facteurs de transcription et l'expression de PD-1 qui en découle, préservant ainsi le phénotype épuisé des LT PD-1⁺ (Man *et al.* 2017; Oestreich *et al.* 2008; Klein-Hessling *et al.* 2017).

Les LT PD-1⁻ présentent une entrée capacitive de Ca^{2+} plus importante que les PD-1⁺ car le phénotype plus épuisé des LT PD-1⁺ confère le besoin d'une stimulation plus importante pour être activés. Les équipes de Wei *et al.* et Kong *et al.* montrent en effet que le niveau d'expression de PD-1 détermine le niveau d'épuisement du LT car PD-1 impacte la signalisation calcique responsable de l'activation du LT *via* la voie du TCR. De ce fait, un LT exprimant fortement PD-1 est plus épuisé qu'un LT exprimant faiblement PD-1, ce qui impacte la prolifération et l'activité cytotoxique du LT (Wei *et al.* 2013; Kong *et al.* 2015). Cet état épuisé des LT de patients LAM CD8⁺ PD-1⁺ explique pour notre étude pourquoi, suite à la formation de la synapse immunologique, les LT LAM PD-1⁺ forment moins de synapses immunologiques et ont une plus faible réponse calcique que les LT LAM PD-1⁻. L'expression de PD-1 influe sur l'activation des complexes TCR induisant les signaux calciques responsables de la formation de la synapse immunologique. Une liaison de 30 complexes TCR est nécessaire pour déclencher la formation de la synapse immunologique en présence de PD-1 tandis que cela n'en requiert que 10 en son absence (Wei *et al.* 2013).

Par ailleurs, le phénotypage du statut de différenciation des LT a montré que les LT LAM PD-1⁻ possèdent une plus grande population effectrice que les LT PD-1⁺, ce qui peut expliquer la meilleure réponse calcique de la part des LT LAM PD-1⁻.

Néanmoins, les résultats présentés ici concernant les LT de patients LAM exprimant ou non PD-1 nécessitent des analyses plus approfondies avec un plus grand nombre d'échantillons de patients testés afin d'obtenir des résultats significatifs.

6. Il existe une différence de réponse entre les synapses

immunologiques formées avec des LT allogéniques ou autologues

Nous avons ensuite étudié la formation de synapses immunologiques en condition allogénique, c'est-à-dire avec des cellules provenant de deux patients différents, ici des LT

d'un donneur sain avec des cellules leucémiques d'un patient LAM, ou en condition autologue avec des LT et des cellules leucémiques d'un même patient LAM. De manière similaire à l'équipe de Le Dieu *et al.*, nous avons observé que les LT de patients LAM ont une plus forte propension à former des synapses immunologiques que les LT de donneurs sains. Cela peut s'expliquer par le fait que les LT de patients LAM présentent une population de LT effecteurs mémoires plus importante que les LT de donneurs sains (Le Dieu *et al.* 2009).

Durant la formation de la synapse immunologique, une plus faible réponse calcique de la part des LT de patients LAM s'explique par un plus grand épuisement que pour les LT de donneurs sains. Des LT épuisés nécessitent une plus forte stimulation de leur complexe TCR pour devenir activés et les cellules leucémiques ne permettent pas d'activer suffisamment les LT de patients LAM pour obtenir une réponse calcique conséquente induisant, à terme, la formation de la synapse immunologique et le déclenchement de la lyse cytotoxique (Le Dieu *et al.* 2009; Wei *et al.* 2013).

Plusieurs études intéressantes ont mis en évidence un lien entre le métabolisme et la réponse immunitaire adaptative (Pearce *et al.* 2013; Wang et Green 2012). Un métabolisme altéré serait lié aux déficiences fonctionnelles des LT infiltrant la tumeur qui présentent souvent un phénotype épuisé (Chang *et al.* 2015; Ho *et al.* 2015; Staron *et al.* 2014; Bengsch *et al.* 2016; Schurich *et al.* 2016). Un lien a également été établi entre l'expression de PD-1 et les déficiences métaboliques des LT épuisés. Il y aurait donc un rapport entre l'épuisement du LT et le métabolisme modulé par la signalisation du TCR (Bengsch *et al.* 2016).

Aussi, des études contradictoires montrent que des LT allogéniques sont plus efficaces que des LT autologues (Kalwak *et al.* 2002; Schwinger *et al.* 2006) ou inversement (Roberts *et al.* 1993) et une autre étude montre qu'il n'y a pas de différence entre les deux conditions (Puissant-Lubrano *et al.* 2014). Dans nos résultats, la formation de synapses autologues avec des LT et des cellules leucémiques du même patient LAM pourrait induire une plus faible reconnaissance et donc une plus faible réponse calcique.

7. Les cellules leucémiques traitées à l'Ara-C forment des synapses immunologiques différentes de celles formées avec les cellules leucémiques non traitées de patients LAM

L'étude de la formation de synapses immunologiques en condition allogénique a permis de montrer la réponse calcique de LT de donneurs sains face aux cellules leucémiques d'un

patient LAM au diagnostic. Un traitement des cellules leucémiques de patients LAM à l'agent chimiothérapeutique Ara-C 0,1 μ M pendant 72h a été réalisé afin de sélectionner les cellules résistantes à ce traitement et étant donc responsables de la MRD. Cela nous permet ainsi de comparer la formation et réponse de synapses immunologiques de LT de donneurs sains face à des cellules leucémiques et des cellules leucémiques persistantes.

Les LT de donneurs sains forment plus difficilement des synapses immunologiques avec les cellules persistantes qu'avec la population totale des cellules leucémiques. Ce traitement à l'Ara-C montre donc qu'il existe une minorité de cellules persistantes qui résistent à la formation de la synapse immunologique avec les LT, peut-être grâce à des caractéristiques de cellules résistantes comme l'expression de ligands inhibiteurs comme PD-L1 ou une entrée en quiescence et la diminution de l'expression de leur CMH afin d'échapper au système immunitaire (Shen, Vagner, et Robert 2020). Il reste cependant à élucider si ces caractéristiques de cellules persistantes ont été acquises suite au traitement à l'Ara-C ou si ce traitement a permis d'isoler des cellules exprimant déjà ces caractéristiques (Mopin *et al.* 2022; Jia *et al.* 2022).

Malgré le fait qu'il y ait moins de synapses immunologiques formées, la réponse calcique des LT de donneurs sains est plus forte lors de la formation de synapses immunologiques avec des cellules persistantes qu'avec la population totale de cellules leucémiques. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. La première est que la cellule persistante présente des caractéristiques de résistance comme l'expression de ligands inhibiteurs tels que PD-L1 (Shen, Vagner, et Robert 2020). L'activation du LT suite à liaison entre le TCR et le CMH de la cellule leucémique permettrait à cette dernière d'induire un fort signal calcique au sein du LT de sorte à favoriser l'expression de ses récepteurs inhibiteurs comme PD-1 et ainsi induire un phénotype épuisé plus rapidement pour échapper à la lyse cytotoxique (Schietinger et Greenberg 2014; Wherry 2011). La seconde hypothèse est que l'élimination d'une cellule persistante nécessite une concentration calcique plus importante de la part des organites du LT comme les mitochondries et le RE pour former la synapse immunologique et sécréter les cytokines cytotoxiques (Delon *et al.* 1998; Hartzell *et al.* 2016).

Lorsque l'on compare nos résultats de réponse calcique entre les LT de donneurs sains et les cellules leucémiques, on obtient le même résultat avec une réponse calcique plus importante parmi les cellules leucémiques traitées à l'Ara-C 0,1 μ M comparées à la population totale de cellules leucémiques non traitées. Encore une fois, la forte réponse calcique des cellules leucémiques traitées peut trouver son explication dans deux

hypothèses. La première serait que le traitement à l'Ara-C sensibilise les cellules leucémiques persistantes et empêche le contrôle de l'entrée capacitive de Ca^{2+} causée par la formation de la synapse immunologique. Une trop forte surcharge calcique cytosolique ne serait pas prise en charge par les mitochondries et le RE des cellules leucémiques et entraînerait l'apoptose. La seconde hypothèse serait que l'augmentation calcique cytosolique au sein de la cellule leucémique permettrait de résister à la lyse cytotoxique, d'une part en activant ses mécanismes d'immunoéchappement dépendants du Ca^{2+} comme l'expression de PD-L1 et l'induction de la quiescence par NFAT, mais aussi en induisant la réparation des pores formés à la membrane par les perforines sécrétées par le LT lors de la lyse cytotoxique (Nair *et al.* 2002; Weigelin *et al.* 2021; Andrews, Almeida, et Corrotte 2014; Lopez *et al.* 2013).

Par ailleurs, l'augmentation de la concentration calcique cytosolique observée chez les cellules traitées à l'Ara-C est en accord avec les résultats de notre article (Lewuillon *et al.* 2022) où le traitement à l'Ara-C module le SOCE dans les lignées cellulaires de LAM et les cellules primaires de patients *via* la régulation de l'expression de *ORAI1*. En utilisant les lignées cellulaires KG1 et U937, deux modèles avec une activité ABCB1 et une proportion du compartiment CSL distinctes, nous avons observé des réponses opposées au traitement à l'Ara-C en ce qui concerne l'expression de *ORAI1* et la modulation du SOCE. La population KG1 est composée d'une majorité de cellules $CD34^+ CD38^-$ présentant des caractéristiques de CSL et surexprimant les pompes ABCB1 qui permettent de résister à la chimiothérapie, tandis que la lignée cellulaire U937 présente une majorité de cellules non souches sensibles à la chimiothérapie. Les cellules KG1 $ABCB1^{high}$ et enrichies en CSL, plus chimiorésistantes, affichent une augmentation du SOCE et de l'expression de *ORAI1* après le traitement à l'Ara-C, tandis que les cellules U937 $ABCB1^{low}$, chimiosensibles et peu enrichies en CSL, présentent des réponses opposées. Dans cette même étude, nous avons observé des comportements similaires dans les cellules de LAM primaires obtenues à partir de patients au moment du diagnostic et présentant les mêmes caractéristiques opposées. Un traitement à l'Ara-C 0,1 μ M a donc permis de mettre en évidence une population résistante similaire à la population majoritaire de la lignée cellulaire LAM KG1.

La différence de réponse calcique entre la population totale des cellules leucémiques et les cellules sélectionnées suite au traitement chimiothérapeutique montre que le phénotype majoritairement représenté n'est pas le phénotype résistant à la chimiothérapie. Il existe donc des mécanismes de résistance différents en fonction du phénotype et du stade de différenciation des cellules.

De plus, les cellules persistantes présentent des caractéristiques de cellules souches et seraient donc majoritairement quiescentes. Des études ont observé que les cellules CD34⁺ et CD34⁺ CD38⁻ étaient plus quiescentes que les autres populations de cellules leucémiques avant traitement à l'Ara-C et que, malgré leur persistance, l'Ara-C réduit tout de même leurs proportions et fait sortir les cellules CD34⁺ de leur quiescence afin de réapprovisionner la quantité de cellules leucémiques (Boyd et Rodrigues 2018). La chimiothérapie semble donc sensibiliser les cellules résistantes et favoriser leur déplétion.

Une étude a mis en avant le fait que le Ca²⁺ entrant *via* les SOCs des cellules quiescentes est plus efficacement capturé grâce à une activité accrue des mitochondrie qui absorbent le Ca²⁺ (Aulestia *et al.* 2018). Une autre étude démontre cependant que les cellules de patients LAM résiduelles résistantes à l'Ara-C ne sont ni enrichies en cellules quiescentes ni en CSL mais présentent des niveaux élevés de ROS et de phosphorylation oxydative. Cibler la synthèse de protéines de la mitochondrie induit alors une faible phosphorylation oxydative et améliore les effets chimiothérapeutiques de l'Ara-C. Ces résultats indiquent que les fonctions mitochondriales contribuent à la résistance à l'Ara-C dans les LAM et forment une cible prometteuse pour traiter la MRD induite par les cellules persistantes (Farge *et al.* 2017).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Alors que les altérations de la signalisation calcique ont été largement étudiées dans les cancers solides, seules quelques études ont exploré la dérégulation des voies de signalisation dépendantes du calcium dans la LAM, et aucune n'a étudié les mécanismes de résistance dépendants du calcium.

Notre revue « *Put in a « Ca²⁺» to Myeloid Leukemia* » souligne le rôle du Ca²⁺ dans (i) la prolifération et différenciation ainsi que dans la quiescences des CSL, (ii) la mitochondrie, le métabolisme et le stress oxydatif, (iii) l'effet du microenvironnement de la MO et enfin (iv) le mécanisme par lequel les traitements chimiothérapeutiques modifient l'homéostasie du calcium dans les cellules de la LAM (Lewuillon *et al.* 2022).

Les CSL sont influencées par l'évolution génétique clonale, les altérations épigénétiques et leur microenvironnement, ce qui explique leur hétérogénéité concernant leurs capacités de chimiorésistance. La détection précoce des sous-populations leucémiques préexistantes résistantes aux traitements est donc cruciale pour la prévention des rechutes.

Notre étude a mis en évidence la population CSL CD33⁺ CD34⁺ CD38⁻ qui est une population minoritaire au sein des cellules leucémiques de patients LAM. Il serait intéressant de valider le caractère CSL de cette sous-population en vérifiant l'expression de gènes caractéristiques des cellule souches. Il serait également pertinent de vérifier l'expression de *ABCB1* afin de confirmer une surexpression de pompes d'efflux au sein des CSL comme cela a été réalisé dans notre article « *Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure* » (Lewuillon *et al.* 2022). De plus, vérifier le statut quiescent ou prolifératif des cellules leucémiques à l'aide de la protéine Ki67 et la localisation des isoformes de NFAT permettrait de conclure sur la sous-expression que nous avons observée des marqueurs de surface caractéristiques des CSL, à savoir HLA-DR, PD-L1, TIM-3 et CD33.

Caractériser de manière plus précise le statut de différenciation des LT et valider le niveau d'expression de *PD-1*, des canaux *ORAI*, de *NFAT* et des senseurs *STIM* selon ce statut de différenciation apporterait également des informations sur la formation de la synapse immunologique et la signature calcique associée en fonction des phénotypes des LT.

Le rôle de ORAI1 dans les cancers est de plus en plus documenté mais son rôle dans les LAM et les CSL reste peu étudié. L'identification des canaux calciques impliqués dans la persistance des cellules leucémiques résiduelles pourrait améliorer notre compréhension de ce mécanisme.

Notre article montre l'implication du canal calcique ORAI1 et du facteur de transcription NFAT associé dans l'entrée capacitive de calcium des lignées cellulaires humaines KG1 et U937 ainsi que dans les cellules primaires isolées de patients LAM. Les données suggèrent que, dans ces modèles, le SOCE varie en fonction du statut de différenciation des cellules, du niveau d'activité de *ABCB1* et de la proportion du compartiment des CSL (Lewuillon *et al.* 2022). Faisant suite à ces résultats, notre projet de recherche étudie, pour la première fois, à l'aide de la microfluidique l'implication des canaux SOC dans l'entrée capacitive de Ca^{2+} et l'homéostasie calcique de sous-populations faiblement représentées au sein des LT et cellules leucémiques de patients LAM au diagnostic.

Confirmer le niveau d'expression des canaux *ORAI* et senseurs *STIM* au sein des sous-populations d'intérêt permettrait de valider la différence d'homéostasie calcique observée. L'étude de canaux interagissant avec les canaux SOC serait également pertinente pour valider l'hypothèse d'association d'autres canaux qui détourneraient l'entrée capacitive de Ca^{2+} au sein des cellules leucémiques.

La contradiction parfois observée entre les résultats présentés ici et ceux observés dans la littérature pourrait s'expliquer par la différence du niveau d'expression des gènes, dont *ORAI1* et *STIM1*, parmi les différents types cellulaires étudiés. Cette différence d'expression en fonction du phénotype cellulaire montre l'intérêt d'utiliser la méthode de microfluidique pour réaliser une analyse ciblée en complément des méthodes conventionnelles comme la cytométrie en flux qui fournissent une analyse plus globale.

Nos résultats montrent également une différence d'homéostasie calcique entre les LT $CD8^+$ de donneurs sains et de patients LAM avec une activité diminuée chez les LT de patients LAM. De même, il existe une différence d'homéostasie calcique entre les LT LAM $CD8^+ PD-1^+$ et les LT LAM $CD8^+ PD-1^-$. Étant donné que l'expression de PD-1 dépend de la voie de signalisation $Ca^{2+}/CaM/Calcineurine$ et NFAT, il serait intéressant de vérifier la distribution de NFAT par immunofluorescence afin de vérifier son activation et également valider quelle isoforme de NFAT est exprimée. Cette étude de NFAT permettrait de valider son implication dans l'expression de PD-1 et donc l'état d'épuisement des LT. L'étude de l'homéostasie calcique des LT en fonction de leur statut de différenciation et expression de PD-1 apporterait une meilleure compréhension de l'activité des différents types de LT. Aussi, analyser la sécrétion de cytokines comme l' $IFN\gamma$ et l'IL-2 permettrait de conclure sur

l'état d'épuisement des LT. Par ailleurs, étant donné que l'intensité et durée du signal calcique impacte l'activation et les fonctions effectrices des LT, la modulation de l'homéostasie calcique pourrait éviter l'épuisement des LT. En effet, une étude montre que l'inhibition du SOCE par la voie de signalisation SOCE/calcineurine/NFAT rend des cellules CAR (chimeric antigen receptor)-T résistantes au développement de dysfonctions intrinsèques car elles montrent une diminution d'épuisement (Shao *et al.* 2022).

L'étude de l'interaction cellule à cellule entre les différentes sous-populations de LT CD8⁺ et les cellules leucémiques nous a permis d'étudier les signatures calciques spécifiques des différentes synapses immunologiques et ainsi valider la différence de signature calcique entre les LT de donneurs sains et les LT de patients LAM. Évaluer la formation de la synapse immunologique avec des cellules leucémiques exprimant plus ou moins PD-L1 avec des LT exprimant plus ou moins PD-1 validerait nos hypothèses sur l'effet de l'axe inhibiteur PD-1/PD-L1 sur la réponse calcique des cellules.

Ainsi, cibler la signalisation calcique permettrait de moduler l'expression de l'axe inhibiteur PD-1/PD-L1 comme l'ont montré plusieurs études (Wu *et al.* 2020; Pan *et al.* 2021). Cependant, compte tenu de la complexité du réseau de cibles d'ORAI et de STIM dans les processus pro-survie et pro-apoptotiques, chaque type cellulaire peut présenter une résistance dépendante de la voie de signalisation activée, ce qui montre l'intérêt de ce projet à identifier les acteurs de la signalisation calcique spécifique de chaque sous-population (Kondratska *et al.* 2014).

Nous avons déjà mis en avant dans notre article le rôle joué par ORAI1/SOCE dans la prolifération des cellules de LAM et dans l'engagement du cycle cellulaire G0–G1 selon le phénotype CSL. Un lien a également été fait entre l'expression et/ou l'activité d'*ORAI1* et le stade de différenciation des cellules de LAM, l'activité *ABCB1* et le compartiment de CSL. Toutefois, d'autres études restent nécessaires pour mieux comprendre (i) la contribution précise de l'axe ORAI1/SOCE/NFAT dans l'engagement du cycle cellulaire des CSL et (ii) les mécanismes spécifiques de régulation de l'apoptose par le SOCE et ORAI1 afin de potentiellement révéler de nouvelles stratégies ciblant ces protéines et améliorer l'efficacité actuelle des traitements contre la LAM (Lewuillon *et al.* 2022).

La rareté des sous-populations des CSL et des LT de patients LAM empêche souvent de réaliser plusieurs analyses en simultané. Il est important de coupler l'analyse de la synapse immunologique à la lyse cytotoxique en microfluidique pour étudier la lyse cytotoxique au ratio 1 :1 contrairement aux expérimentations de cytométrie en flux qui, par souci de faible

nombre de cellules, sont réalisées au ratio cinq LT pour une cellule leucémique. Ces expérimentations reproduisant les conditions réelles d'élimination des cellules cancéreuses par le SI dans l'organisme contredisent potentiellement les résultats de formation de synapses immunologiques et réponse calcique obtenus en microfluidique au ratio 1 :1. Effectivement, l'étude à l'échelle de la cellule unique en microfluidique permet d'évaluer la signature calcique d'une sous-population, tandis que les conditions de cytométrie en flux, où les LT attaquent la cellule leucémique en bande organisée, masquent potentiellement l'état d'épuisement d'un type de LT. Ces résultats restent tout de même à réitérer car la différence d'efficacité de lyse cytotoxique et de sécrétion de cytokines montre l'importance d'étudier et comparer les LT de donneurs sains et LAM en fonction de leur activation, phénotype et statut de différenciation.

L'équipe collaboratrice SMMiL-E développe actuellement un dispositif de microfluidique permettant de mettre en contact plusieurs LT avec une cellule leucémique de manière contrôlée afin de réaliser les conditions de lyse cytotoxique de manière identique à celles réalisées en cytométrie en flux.

Par ailleurs, les dispositifs de microfluidique étant compatibles avec la fixation de cellules pour réaliser de l'immunofluorescence, il serait également intéressant à la fois de (i) valider la formation de la synapse immunologique en localisant les molécules d'adhésion LFA-1 et ICAM-1 et les filaments d'actine attestant de la réorganisation cytosquelettique de la membrane, (ii) étudier la distribution et les isoformes de NFAT et (iii) attester du statut quiescent ou prolifératif des cellules avec l'expression ou non de la protéine nucléaire Ki67.

Lors de la formation de synapses immunologiques avec des cellules leucémiques et des cellules leucémiques persistantes en microfluidique, le traitement chimiothérapeutique Ara-C entraîne une différence de réponse calcique de la part des LT sains. Cette différence de réponse calcique suite à un traitement à l'Ara-C peut s'expliquer en vérifiant l'expression basale des canaux SOCs.

Notre article présente le fait que l'expression de *ORAI1* et l'amplitude du SOCE sont modulés dans un phénotype de résistance à l'apoptose au sein des CSL provoqué par le médicament chimiothérapeutique Ara-C. Les résultats proposent *ORAI1/SOCE* comme marqueurs potentiels de la progression de la LAM et de la résistance aux médicaments (Lewuillon *et al.* 2022). Étudier la signalisation calcique de cellules résistantes aux chimiothérapies permettrait en effet d'identifier une stratégie efficace d'élimination.

Jusqu'à présent les stratégies évoquées pour cibler les cellules tumorales dormantes sont de les forcer à entrer en prolifération et avoir recours à des thérapies anti-prolifératives

qui pourraient tuer la majorité des cellules. Néanmoins, cela pourrait également entraîner la sélection de clones résistants et ainsi assombrir le pronostic (Pisco *et al.* 2013). L'autre alternative serait d'induire une dormance perpétuelle des cellules pour ainsi empêcher le développement de métastases, bien que cela induirait un traitement chronique et coûteux (Aguirre-Ghiso, Bragado, et Sosa 2013; Ghajar 2015; Maria Soledad Sosa *et al.* 2011; María Soledad Sosa, Bragado, et Aguirre-Ghiso 2014). Or, une étude a montré qu'un inhibiteur d'un canal calcique combiné avec l'Ara-C a diminué le nombre de cellules de LAM (Borella *et al.* 2021). L'étude de la régulation du Ca^{2+} cytoplasmique et de l'activité des canaux calciques au sein des cellules leucémiques résistantes est donc primordiale pour mieux comprendre les mécanismes de résistance et ainsi mieux cibler ces cellules.

En plus de la vérification du phénotype et de l'expression des gènes de cellules souches, il serait également intéressant d'évaluer le niveau d'expression des canaux SOCs, l'expression de Ki67 et la localisation des isoformes de NFAT au sein des cellules leucémiques persistantes obtenues après traitement à l'Ara-C afin de valider les caractéristiques des cellules résistantes aux chimiothérapies. Il est également important de comparer la réponse calcique entre des LT de donneurs sains et LT de patients LAM en fonction de leurs phénotypes face aux cellules persistantes afin de confirmer l'état d'épuisement des LT de patients LAM et l'immunoéchappement des cellules persistantes.

La possibilité d'étudier les cinétiques des synapses immunologiques en présence d'inhibiteurs permettra également de mieux comprendre la signalisation calcique et les acteurs impliqués. Cela pourrait aussi permettre d'observer une réversion du phénotype épuisé des LT, notamment grâce à l'ajout de l'anticorps anti-PD-1 Nivolumab.

Également, collecter les deux types de cellules à la sortie du microsystème de microfluidique après l'observation de la synapse immunologique en fonction des différents phénotypes cellulaires permettrait de réaliser une analyse transcriptomique à l'échelle de la cellule unique afin d'identifier une signature de gènes spécifique des sous-populations.

À plus long terme, il serait intéressant d'étudier le calcium mitochondrial et le métabolisme associé au sein des cellules souches/résistantes leucémiques, avant et après chimiothérapie. En effet, des études ont montré une signature métabolique spécifique des cellules leucémiques persistantes et NFAT pourrait jouer un rôle dans cette réponse métabolique (Farge *et al.* 2017).

Enfin, les différences biologiques sous-jacentes entre les compartiments de la LAM étudiés, à savoir le sang périphérique et la MO montrent l'importance de comparer les résultats obtenus sur les échantillons de sang périphérique de patients LAM au diagnostic avec ceux de la MO. De même, comparer les échantillons de patients LAM au diagnostic et

en rechute montrerait les différences (i) de proportions de sous-populations de LT et cellules leucémique exprimant l'axe PD-1/PD-L1 (surexpression de PD-L1 en rechute (Berthon *et al.* 2010)), (ii) de localisation et d'isoformes de NFAT (surexprimé en rechute, rôle dans la chimiorésistance, (Patterson *et al.* 2021)) et (iii) de statut quiescent ou prolifératif.

L'hétérogénéité inter-patients nécessite également de regarder tous ces paramètres en fonction des types de mutations de LAM afin de peut-être identifier des mutations prédictives du devenir de la maladie.

Il est également à souligner que nous avons exclusivement étudié les échantillons au diagnostic. Il serait très intéressant de compléter cette étude avec l'analyse d'échantillons de patients LAM en MRD et en rechute afin d'évaluer le phénotype et l'homéostasie calcique des cellules résiduelles. La quantité de cellules persistantes étant très limitée, notamment en MRD, la technologie de microfluidique pourrait aider à étudier ces populations rares.

En conclusion, ces recherches mettent en évidence le rôle encore peu connu du Ca^{2+} et sa signalisation dans les hémopathies malignes et plus particulièrement la LAM. Il semble exister une hétérogénéité du profil de l'homéostasie calcique en fonction du phénotype des cellules leucémiques et LT. Ces profils calciques spécifiques semblent également être modulés par le microenvironnement tumoral qui régule les propriétés des cellules souches et non souches (quiescence, immunoéchappement par expression de PD-L1).

L'étude de la signalisation calcique et des canaux associés impliqués dans les mécanismes de résistance des CSL pourrait permettre de mieux comprendre la biologie tumorale et, à terme, de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur de nouvelles cibles et marqueurs de diagnostic.

En effet, les stratégies visant à améliorer l'efficacité du système immunitaire contre les cellules de la LAM sont entravées par l'hétérogénéité des sous-populations cellulaires et de la maladie, et compliquées par les capacités immunoévasives des cellules leucémiques. La complexité génétique, épigénétique et clonale de la maladie empêche également d'identifier des prédicteurs de réponse aux immunothérapies et de rechute. C'est pourquoi, une meilleure compréhension de l'interaction immunologique, génomique et micro-environnementale permettra de concevoir des approches combinées.

BIBLIOGRAPHIE

- Aguirre-Ghiso, Julio A. 2007. « Models, Mechanisms and Clinical Evidence for Cancer Dormancy ». *Nature Reviews Cancer* 7 (11): 834-46. <https://doi.org/10.1038/nrc2256>.
- Aguirre-Ghiso, Julio A, Paloma Bragado, et Maria Soledad Sosa. 2013. « Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer ». *Nature Medicine* 19 (3): 276-77. <https://doi.org/10.1038/nm.3120>.
- Alicia, Sampieri, Zepeda Angélica, Saldaña Carlos, Salgado Alfonso, et Luis Vaca. 2008. « STIM1 Converts TRPC1 from a Receptor-Operated to a Store-Operated Channel: Moving TRPC1 in and out of Lipid Rafts ». *Cell Calcium* 44 (5): 479-91. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.03.001>.
- Al-Mawali, Adhra, David Gillis, Pravin Hissaria, et Ian Lewis. 2008. « Incidence, Sensitivity, and Specificity of Leukemia-Associated Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia Using Specific Five-Color Multiparameter Flow Cytometry ». *American Journal of Clinical Pathology* 129 (6): 934-45. <https://doi.org/10.1309/FY0UMAMM91VPMR2W>.
- Al-Mawali, Adhra, David Gillis, et Ian Lewis. 2009. « The Role of Multiparameter Flow Cytometry for Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia ». *American Journal of Clinical Pathology* 131 (1): 16-26. <https://doi.org/10.1309/AJCP5TSD3DZXFLCX>.
- Amcheslavsky A, Wood ML, Yeromin AV, Parker I, Freitas JA, Tobias DJ, Cahalan MD. Molecular biophysics of Orai store-operated Ca²⁺ channels. *Biophys J*. 2015 Jan 20;108(2):237-46. doi: 10.1016/j.bpj.2014.11.3473. PMID: 25606672; PMCID: PMC4302196.
- Andrews, Norma W., Patricia E. Almeida, et Matthias Corrotte. 2014. « Damage Control: Cellular Mechanisms of Plasma Membrane Repair ». *Trends in Cell Biology* 24 (12): 734-42. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.07.008>.
- Anguille, S, V F Van Tendeloo, et Z N Berneman. 2012. « Leukemia-Associated Antigens and Their Relevance to the Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 26 (10): 2186-96. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.145>.
- Aqbi, Hussein F., Matthew Wallace, Samay Sappal, Kyle K. Payne, et Masoud H. Manjili. 2018. « IFN-γ Orchestrates Tumor Elimination, Tumor Dormancy, Tumor Escape, and Progression ». *Journal of Leukocyte Biology* 103 (6): 1219-23. <https://doi.org/10.1002/JLB.5MIR0917-351R>.
- Arber, Daniel A., Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, et James W. Vardiman. 2016. « The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia ». *Blood* 127 (20): 2391-2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.
- Askmyr, Maria, Helena Ågerstam, Nils Hansen, Sandra Gordon, Alexandros Arvanitakis, Marianne Rissler, Gunnar Juliusson, Johan Richter, Marcus Järås, et Thoas Fioretos. 2013. « Selective Killing of Candidate AML Stem Cells by Antibody Targeting of IL1RAP ». *Blood* 121 (18): 3709-13. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-458935>.
- Aulestia, Francisco J., Isabelle Néant, Jihu Dong, Jacques Haiech, Marie-Claude Kilhoffer, Marc Moreau, et Catherine Leclerc. 2018. « Quiescence Status of Glioblastoma Stem-like Cells Involves Remodelling of Ca²⁺ Signalling and Mitochondrial Shape ». *Scientific Reports* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28157-8>.
- Ay AS, Benzerdjeb N, Sevestre H, Ahidouch A, Ouadid-Ahidouch H. Orai3 constitutes a native store-operated calcium entry that regulates non small cell lung adenocarcinoma cell proliferation. *PLoS One*. 2013 Sep 13;8(9):e72889. doi: 10.1371/journal.pone.0072889. Erratum in: *PLoS One*. 2015;10(4):e0124201. Benzerdjeb, Nazim [corrected to Benzerdjeb, Nazim]. PMID: 24058448; PMCID: PMC3772818.
- Baccarani, U., P. Piselli, D. Serraino, G.L. Adani, D. Lorenzin, M. Gambato, A. Buda, et al. 2010. « Comparison of de Novo Tumours after Liver Transplantation with Incidence Rates from Italian Cancer Registries ». *Digestive and Liver Disease* 42 (1): 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.04.017>.
- Bachas, C, G J Schuurhuis, Y G Assaraf, Z J Kwidama, A Kelder, F Wouters, A N Snel, G J L Kaspers, et J Cloos. 2012. « The Role of Minor Subpopulations within the Leukemic Blast Compartment of AML Patients at Initial Diagnosis in the Development of Relapse ». *Leukemia* 26 (6): 1313-20. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.383>.
- Badran, Bassam M., Steven M. Wolinsky, Arsène Burny, et Karen E. Willard-Gallo. 2002. « Identification of Three NFAT Binding Motifs in the 5'-Upstream Region of the Human CD3γ Gene That Differentially Bind NFATc1, NFATc2, and NF-KB P50 ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (49): 47136-48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206330200>.
- Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, Schiffer CA, Powell BL, Kolitz JE, Moore JO, Stone RM, Davey FR, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3574-80. doi: 10.1182/blood.v97.11.3574. PMID: 11369653.
- Baine, Ian, Brian T. Abe, et Fernando Macian. 2009. « Regulation of T-Cell Tolerance by Calcium/NFAT Signaling ». *Immunological Reviews* 231 (1): 225-40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00817.x>.

- Baksh, Shairaz, Hans R. Widlund, Ashley A. Frazer-Abel, Jinyan Du, Susan Fosmire, David E. Fisher, James A. DeCaprio, Jaime F. Modiano, et Steven J. Burakoff. 2002. « NFATc2-Mediated Repression of Cyclin-Dependent Kinase 4 Expression ». *Molecular Cell* 10 (5): 1071-81. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00701-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00701-3).
- Bensch, Bertram, Andy L. Johnson, Makoto Kurachi, Pamela M. Odorizzi, Kristen E. Pauken, John Attanasio, Erietta Stelekati, et al. 2016. « Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8 + T Cell Exhaustion ». *Immunity* 45 (2): 358-73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.008>.
- Benzerdjeb N, Sevestre H, Ahidouch A, Ouadid-Ahidouch H. Orai3 is a predictive marker of metastasis and survival in resectable lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016 Dec 6;7(49):81588-81597. doi: 10.18632/oncotarget.13149. PMID: 27835593; PMCID: PMC5348414.
- Berna-Erro, Alejandro, Attila Braun, Robert Kraft, Christoph Kleinschnitz, Michael K. Schuhmann, David Stegner, Thomas Wulsch, et al. 2009. « STIM2 Regulates Capacitive Ca²⁺ Entry in Neurons and Plays a Key Role in Hypoxic Neuronal Cell Death ». *Science Signaling* 2 (93). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000522>.
- Berridge, Michael J., Peter Lipp, et Martin D. Bootman. 2000. « The Versatility and Universality of Calcium Signalling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (1): 11-21. <https://doi.org/10.1038/35036035>.
- Berthon, Céline, Virginie Driss, Jizhong Liu, Klaudia Kuranda, Xavier Leleu, Nathalie Jouy, Dominique Hetuin, et Bruno Quesnel. 2010. « In Acute Myeloid Leukemia, B7-H1 (PD-L1) Protection of Blasts from Cytotoxic T Cells Is Induced by TLR Ligands and Interferon-Gamma and Can Be Reversed Using MEK Inhibitors ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 59 (12): 1839-49. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0909-y>.
- Bhakta, Nirav R., et Richard S. Lewis. 2005. « Real-Time Measurement of Signaling and Motility during T Cell Development in the Thymus ». *Seminars in Immunology* 17 (6): 411-20. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.09.004>.
- Birnbaum, Michael E., Juan L. Mendoza, Dhruv K. Sethi, Shen Dong, Jacob Glanville, Jessica Dobbins, Engin Özkan, Mark M. Davis, Kai W. Wucherpfennig, et K. Christopher Garcia. 2014. « Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition ». *Cell* 157 (5): 1073-87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.047>.
- Blair, Allison, et Heather J Sutherland. 2000. « Primitive Acute Myeloid Leukemia Cells with Long-Term Proliferative Ability in Vitro and in Vivo Lack Surface Expression of c-Kit (CD117) ». *Experimental Hematology* 28 (6): 660-71. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(00\)00155-7](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(00)00155-7).
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730-7. doi: 10.1038/nm0797-730. PMID: 9212098.
- Borella G, Da Ros A, Borile G, Porcù E, Tregnago C, Benetton M, Marchetti A, Bisio V, Montini B, Michielotto B, Cani A, Leszl A, Campodoni E, Sandri M, Montesi M, Bresolin S, Cairo S, Buldini B, Locatelli F, Pigazzi M. « Targeting the plasticity of mesenchymal stromal cells to reroute the course of acute myeloid leukemia ». *Blood*. 2021 Aug 19;138(7):557-570. doi: 10.1182/blood.2020009845. PMID: 34010415.
- Bortner, Carl D., et John A. Cidlowski. 2014. « Ion Channels and Apoptosis in Cancer ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1638): 20130104. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0104>.
- Boyd, Ashleigh S., et Neil P. Rodrigues. 2018. « Stem Cells Cycle toward Immune Surveillance ». *Immunity* 48 (2): 187-90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.006>.
- Boyer, Gonzales, Barthélémy, Marceau-Renaut, Peyrouze, Guihard, Lepelley, et al. 2019. « Clinical Significance of ABCB1 in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Study ». *Cancers* 11 (9): 1323. <https://doi.org/10.3390/cancers11091323>.
- Brandman, Onn, Jen Liou, Wei Sun Park, et Tobias Meyer. 2007. « STIM2 Is a Feedback Regulator That Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Levels ». *Cell* 131 (7): 1327-39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.039>.
- Braumüller, Heidi, Thomas Wieder, Ellen Brenner, Sonja Aßmann, Matthias Hahn, Mohammed Alkhaled, Karin Schilbach, et al. 2013. « T-Helper-1-Cell Cytokines Drive Cancer into Senescence ». *Nature* 494 (7437): 361-65. <https://doi.org/10.1038/nature11824>.
- Brewer, Jerry D., Oscar R. Colegio, P. Kim Phillips, Randall K. Roenigk, M. Amanda Jacobs, Diederik Van de Beek, Ross A. Dierkhising, Walter K. Kremers, Christopher G. A. McGregor, et Clark C. Otley. 2009. « Incidence of and Risk Factors for Skin Cancer After Heart Transplant ». *Archives of Dermatology* 145 (12). <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2009.276>.
- Brodská, Barbora, Petra Otevřelová, Cyril Šálek, Ota Fuchs, Zdenka Gašová, et Kateřina Kuželová. 2019. « High PD-L1 Expression Predicts for Worse Outcome of Leukemia Patients with Concomitant NPM1 and FLT3 Mutations ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11): 2823. <https://doi.org/10.3390/ijms20112823>.
- Brossard, Cédric, Vincent Feuillet, Alain Schmitt, Clotilde Randriamampita, Maryse Romao, Graça Raposo, et Alain Trautmann. 2005. « Multifocal Structure of the T Cell - Dendritic Cell Synapse ». *European Journal of Immunology* 35 (6):

1741-53. <https://doi.org/10.1002/eji.200425857>.

Bunnell SC, Kapoor V, Triple RP, Zhang W, Samelson LE. « Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT ». *Immunity*. 2001 Mar;14(3):315-29. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00112-1. PMID: 11290340.

Burkhardt, Janis K., Esteban Carrizosa, et Meredith H. Shaffer. 2008. « The Actin Cytoskeleton in T Cell Activation ». *Annual Review of Immunology* 26 (1): 233-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090347>.

Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Hunter AE, Kjeldsen L, Yin J, Gibson BE, Wheatley K, Milligan D. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 20;31(27):3360-8. doi: 10.1200/JCO.2012.47.4874. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23940227.

Caetano, Mauricio S., Adriana Vieira-De-Abreu, Leonardo K. Teixeira, Miriam B.F. Werneck, Marcello A. Barcinski, et João P.B. Viola. 2002. « NFATC2 Transcription Factor Regulates Cell Cycle Progression during Lymphocyte Activation: Evidence of Its Involvement in the Control of Cyclin Gene Expression ». *The FASEB Journal* 16 (14): 1940-42. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0282fje>.

Cahalan MD, Chandy KG. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev*. 2009 Sep;231(1):59-87. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00816.x. PMID: 19754890; PMCID: PMC3133616.

Cahalan MD, Wulff H, Chandy KG. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J Clin Immunol*. 2001 Jul;21(4):235-52. doi: 10.1023/a:1010958907271. PMID: 11506193.

Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, et al. 2003. « Osteoblastic Cells Regulate the Haematopoietic Stem Cell Niche ». *Nature* 425 (6960): 841-46. <https://doi.org/10.1038/nature02040>.

Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, von Bonin M, Bejestani EP, Ehninger G, Bachmann MP. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer J*. 2016 Aug 12;6(8):e458. doi: 10.1038/bcj.2016.61. PMID: 27518241; PMCID: PMC5022178.

Cate, B., M. de Bruyn, Y. Wei, E. Bremer, W. Helfrich, Marwa Mourabet, Sandra El-Hachem, Janet Harrison, et David Binion. 2010. « Targeted Elimination of Leukemia Stem Cells; a New Therapeutic Approach in Hemato-Oncology ». *Current Drug Targets* 11 (1): 95-110. <https://doi.org/10.2174/138945010790031063>.

Chakraborty, Supriya, Swatilekha Ghosh, Bhaswati Banerjee, Abhishek Santra, Arghya Adhikary, Anup K. Misra, et Parimal C. Sen. 2016. « Phemindole, a Synthetic Di-Indole Derivative Maneuvers the Store Operated Calcium Entry (SOCE) to Induce Potent Anti-Carcinogenic Activity in Human Triple Negative Breast Cancer Cells ». *Frontiers in Pharmacology* 7 (mai). <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00114>.

Chang, Chih-Hao, Jing Qiu, David O'Sullivan, Michael D. Buck, Takuro Noguchi, Jonathan D. Curtis, Qiongyu Chen, et al. 2015. « Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression ». *Cell* 162 (6): 1229-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.016>.

Chappert, Pascal, et Ronald H Schwartz. 2010. « Induction of T Cell Anergy: Integration of Environmental Cues and Infectious Tolerance ». *Current Opinion in Immunology* 22 (5): 552-59. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.08.005>.

Che, Hui, Gang Li, Hai-Ying Sun, Guo-Sheng Xiao, Yan Wang, et Gui-Rong Li. 2015. « Roles of Store-Operated Ca²⁺ Channels in Regulating Cell Cycling and Migration of Human Cardiac c-Kit⁺ Progenitor Cells ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 309 (10): H1772-81. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00260.2015>.

Chemnitz, Jens M., Richard V. Parry, Kim E. Nichols, Carl H. June, et James L. Riley. 2004. « SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation ». *The Journal of Immunology* 173 (2): 945-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.945>.

Chen, Jian, Yanjiao Li, Tzong-Shiue Yu, Renée M. McKay, Dennis K. Burns, Steven G. Kernie, et Luis F. Parada. 2012. « A Restricted Cell Population Propagates Glioblastoma Growth after Chemotherapy ». *Nature* 488 (7412): 522-26. <https://doi.org/10.1038/nature11287>.

Chen, Lieping. 2004. « Co-Inhibitory Molecules of the B7-CD28 Family in the Control of T-Cell Immunity ». *Nature Reviews Immunology* 4 (5): 336-47. <https://doi.org/10.1038/nri1349>.

Chen, Xiangli, Shuhu Liu, Liancai Wang, Wang-Gang Zhang, Yuqiang Ji, et Xiaorong Ma. 2008. « Clinical Significance of B7-H1 (PD-L1) expression in Human Acute Leukemia ». *Cancer Biology & Therapy* 7 (5): 622-27. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.5.5689>.

Chen, Xueyan, et Sindhu Cherian. 2017. « Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis ». *Clinics in Laboratory Medicine* 37 (4): 753-69. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.07.003>.

- Chen, Yih-Fung, Wen-Tai Chiu, Ying-Ting Chen, Pey-Yun Lin, Huey-Jy Huang, Cheng-Yang Chou, Hsien-Chang Chang, Ming-Jer Tang, et Meng-Ru Shen. 2011. « Calcium Store Sensor Stromal-Interaction Molecule 1-Dependent Signaling Plays an Important Role in Cervical Cancer Growth, Migration, and Angiogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (37): 15225-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103315108>.
- Cheng, Kwong Tai, Hwei Ling Ong, Xibao Liu, et Indu S. Ambudkar. 2013. « Contribution and Regulation of TRPC Channels in Store-Operated Ca²⁺ Entry ». In *Current Topics in Membranes*, 71:149-79. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00007-X>.
- Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, Scadden DT. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science*. 2000 Mar 10;287(5459):1804-8. doi: 10.1126/science.287.5459.1804. PMID: 10710306.
- Choi, Seok, Jozsef Maleth, Archana Jha, Kyu Pil Lee, Min Seuk Kim, Insuk So, Malini Ahuja, et Shmuel Muallem. 2014. « The TRPCs–STIM1–Orai Interaction ». In *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, édité par Bernd Nilius et Veit Flockerzi, 223:1035-54. Handbook of Experimental Pharmacology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05161-1_13.
- Christopher, Matthew J., Allegra A. Petti, Michael P. Rettig, Christopher A. Miller, Ezhilarasi Chendamarai, Eric J. Duncavage, Jeffery M. Klco, et al. 2018. « Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation ». *New England Journal of Medicine* 379 (24): 2330-41. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1808777>.
- Clarkson B, Fried J, Strife A, Sakai Y, Ota K, Okita T. Studies of cellular proliferation in human leukemia. 3. Behavior of leukemic cells in three adults with acute leukemia given continuous infusions of 3H-thymidine for 8 or 10 days. *Cancer*. 1970 Jun;25(6):1237-60. doi: 10.1002/1097-0142(197006)25:6<1237::aid-cnrcr2820250602>3.0.co;2-7. PMID: 4246416.
- Colmone, Angela, Maria Amorim, Andrea L. Pontier, Sheng Wang, Elizabeth Jablonski, et Dorothy A. Sipkins. 2008. « Leukemic Cells Create Bone Marrow Niches That Disrupt the Behavior of Normal Hematopoietic Progenitor Cells ». *Science* 322 (5909): 1861-65. <https://doi.org/10.1126/science.1164390>.
- Contento, Rita Lucia, Silvia Campello, Anna Elisa Trovato, Elena Magrini, Fabio Anselmi, et Antonella Viola. 2010. « Adhesion Shapes T Cells for Prompt and Sustained T-Cell Receptor Signalling ». *The EMBO Journal* 29 (23): 4035-47. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.258>.
- Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):62-70. doi: 10.1182/blood-2015-07-604546. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26660427.
- Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainy D, Arnoulet C, Gastaut JA, Olive D. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38-progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res*. 2000 Aug 15;60(16):4403-11. PMID: 10969785.
- Craddock, C, L Quek, N Goardon, S Freeman, S Siddique, M Raghavan, A Aztberger, et al. 2013. « Azacitidine Fails to Eradicate Leukemic Stem/Progenitor Cell Populations in Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia ». *Leukemia* 27 (5): 1028-36. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.312>.
- Currie, Andrew J., Amy Prosser, Alison McDonnell, Amanda L. Cleaver, Bruce W. S. Robinson, Gordon J. Freeman, et Robbert G. van der Most. 2009. « Dual Control of Antitumor CD8 T Cells through the Programmed Death-1/Programmed Death-Ligand 1 Pathway and Immunosuppressive CD4 T Cells: Regulation and Counterregulation ». *The Journal of Immunology* 183 (12): 7898-7908. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901060>.
- Curti, Antonio, Sara Trabanelli, Valentina Salvestrini, Michele Baccarani, et Roberto M. Lemoli. 2009. « The Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in the Induction of Immune Tolerance: Focus on Hematology ». *Blood* 113 (11): 2394-2401. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-144485>.
- Curtsinger, Julie M., Christopher M. Johnson, et Matthew F. Mescher. 2003. « CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine ». *The Journal of Immunology* 171 (10): 5165-71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5165>.
- Curtsinger, Julie M., Debra C. Lins, et Matthew F. Mescher. 2003. « Signal 3 Determines Tolerance versus Full Activation of Naive CD8 T Cells ». *Journal of Experimental Medicine* 197 (9): 1141-51. <https://doi.org/10.1084/jem.20021910>.
- Czechowicz, Agnieszka, Daniel Kraft, Irving L. Weissman, et Deepta Bhattacharya. 2007. « Efficient Transplantation via Antibody-Based Clearance of Hematopoietic Stem Cell Niches ». *Science* 318 (5854): 1296-99. <https://doi.org/10.1126/science.1149726>.
- Dama, Paola, Marshall Tang, Noreen Fulton, Justin Kline, et Hongtao Liu. 2019. « Gal9/Tim-3 Expression Level Is Higher in AML Patients Who Fail Chemotherapy ». *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7 (1): 175. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0611-3>.

- Naval Daver, Sreyashi Basu, Guillermo Garcia-Manero, Jorge E. Cortes, Farhad Ravandi, Elias J. Jabbour, Stephany Hendrickson, Sherry Pierce, Jing Ning, Marina Konopleva, Michael Andreeff, Steven M. Kornblau, Naveen Pemmaraju, Carlos E Bueso-Ramos, Jorge Blando, Juliana Elisa Hidalgo Lopez, James Allison, Hagop M. Kantarjian, Padmanee Sharma; Phase IB/II Study of Nivolumab in Combination with Azacytidine (AZA) in Patients (pts) with Relapsed Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* 2016; 128 (22): 763. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.763.763>
- Daver, Naval, Guillermo Garcia-Manero, Sreyashi Basu, Prajwal C. Boddu, Mansour Alfayez, Jorge E. Cortes, Marina Konopleva, et al. 2019. « Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study ». *Cancer Discovery* 9 (3): 370-83. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0774>.
- Daivdas, Matthew S., Haesook T. Kim, Pavan Bachireddy, Caitlin Costello, Rebecca Liguori, Alexandra Savell, Alexander P. Lukez, et al. 2016. « Ipilimumab for Patients with Relapse after Allogeneic Transplantation ». *New England Journal of Medicine* 375 (2): 143-53. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1601202>.
- Daya HA, Kouba S, Ouled-Haddou H, Benzerdjeb N, Telliez MS, Dayen C, Sevestre H, Garçon L, Hague F, Ouadid-Ahidouch H. Orai3-Mediates Cisplatin-Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Enriching Cancer Stem Cell Population through PI3K/AKT Pathway. *Cancers (Basel)*. 2021 May 12;13(10):2314. doi: 10.3390/cancers13102314. PMID: 34065942; PMCID: PMC8150283.
- Dean, Michael. 2009. « ABC Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells ». *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 14 (1): 3-9. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9109-9>.
- Dean, Michael, Tito Fojo, et Susan Bates. 2005. « Tumour Stem Cells and Drug Resistance ». *Nature Reviews Cancer* 5 (4): 275-84. <https://doi.org/10.1038/nrc1590>.
- DeBerardinis, Ralph J., Julian J. Lum, Georgia Hatzivassiliou, et Craig B. Thompson. 2008. « The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation ». *Cell Metabolism* 7 (1): 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>.
- Delia, Mario, Paola Carluccio, Anna Mestice, Claudia Brunetti, Francesco Albano, et Giorgina Specchia. 2018. « Impact of Bone Marrow Aspirate Tregs on the Response Rate of Younger Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Patients ». *Journal of Immunology Research* 2018 (juillet): 1-7. <https://doi.org/10.1155/2018/9325261>.
- Déliot, Nadine, et Bruno Constantin. 2015. « Plasma Membrane Calcium Channels in Cancer: Alterations and Consequences for Cell Proliferation and Migration ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848 (10): 2512-22. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.009>.
- Delon, Jérôme, Nadège Bercovici, Roland Liblau, et Alain Trautmann. 1998. « Imaging Antigen Recognition by Naive CD4+ T Cells: Compulsory Cytoskeletal Alterations for the Triggering of an Intracellular Calcium Response ». *European Journal of Immunology* 28 (2): 716-29. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199802\)28:02<716::AID-IMMU716>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<716::AID-IMMU716>3.0.CO;2-E).
- Depoil, David, Rossana Zaru, Martine Guiraud, Anne Chauveau, Julie Harriague, Georges Bismuth, Clemens Utzny, Sabina Müller, et Salvatore Valitutti. 2005. « Immunological Synapses Are Versatile Structures Enabling Selective T Cell Polarization ». *Immunity* 22 (2): 185-94. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.12.010>.
- Desai, Pooja N., Xuexin Zhang, Shilan Wu, Agnes Janoshazi, Sunitha Bolimuntha, James W. Putney, et Mohamed Trebak. 2015. « Multiple Types of Calcium Channels Arising from Alternative Translation Initiation of the *Orai1* Message ». *Science Signaling* 8 (387). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa8323>.
- Dhodapkar, Madhav V., Rachael Sexton, Rituparna Das, Kavita M. Dhodapkar, Lin Zhang, Ranjini Sundaram, Sonal Soni, John J. Crowley, Robert Z. Orlowski, et Bart Barlogie. 2015. « Prospective Analysis of Antigen-Specific Immunity, Stem-Cell Antigens, and Immune Checkpoints in Monoclonal Gammopathy ». *Blood* 126 (22): 2475-78. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-03-632919>.
- Dick, John E. 2005. « Acute Myeloid Leukemia Stem Cells ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1044 (1): 1-5. <https://doi.org/10.1196/annals.1349.001>.
- Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):4793-807. doi: 10.1182/blood-2008-08-077941. PMID: 19064739.
- Diez-Bello, R., I. Jardin, G.M. Salido, et J.A. Rosado. 2017. « Orai1 and Orai2 Mediate Store-Operated Calcium Entry That Regulates HL60 Cell Migration and FAK Phosphorylation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864 (6): 1064-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.014>.
- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994 Sep;1(6):447-56. doi: 10.1016/1074-7613(94)90087-6. PMID: 7895156.

DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, Swords R, Collins RH, Mannis GN, Pollyea DA, Donnellan W, Fathi AT, Pigneux A, Erba HP, Prince GT, Stein AS, Uy GL, Foran JM, Traer E, Stuart RK, Arellano ML, Slack JL, Sekeres MA, Willekens C, Choe S, Wang H, Zhang V, Yen KE, Kapsalis SM, Yang H, Dai D, Fan B, Goldwasser M, Liu H, Agresta S, Wu B, Attar EC, Tallman MS, Stone RM, Kantarjian HM. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med*. 2018 Jun 21;378(25):2386-2398. doi: 10.1056/NEJMoa1716984. Epub 2018 Jun 2. PMID: 29860938.

Ding, Li, Timothy J. Ley, David E. Larson, Christopher A. Miller, Daniel C. Koboldt, John S. Welch, Julie K. Ritchey, et al. 2012. « Clonal Evolution in Relapsed Acute Myeloid Leukaemia Revealed by Whole-Genome Sequencing ». *Nature* 481 (7382): 506-10. <https://doi.org/10.1038/nature10738>.

Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(12):1136-52. doi: 10.1056/NEJMra1406184. PMID: 26376137.

Dohner, H., E. H. Estey, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Buchner, A. K. Burnett, H. Dombret, et al. 2010. « Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia in Adults: Recommendations from an International Expert Panel, on Behalf of the European LeukemiaNet ». *Blood* 115 (3): 453-74. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>.

Döhner, Hartmut, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, et al. 2017. « Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel ». *Blood* 129 (4): 424-47. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>.

Döhner, Hartmut, Andrew H. Wei, Frederick R. Appelbaum, Charles Craddock, Courtney D. DiNardo, Hervé Dombret, Benjamin L. Ebert, et al. 2022. « Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 Recommendations from an International Expert Panel on Behalf of the ELN ». *Blood* 140 (12): 1345-77. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016867>.

Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):53-61. doi: 10.1182/blood-2015-08-604520. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26660429; PMCID: PMC4705610.

Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012 Feb 3;10(2):120-36. doi: 10.1016/j.stem.2012.01.006. PMID: 22305562.

Dubois, Charlotte, Fabien Vanden Abeele, V'yacheslav Lehen'kyi, Dimitra Gkika, Basma Guarmit, Gilbert Lepage, Christian Slomianny, et al. 2014. « Remodeling of Channel-Forming ORAI Proteins Determines an Oncogenic Switch in Prostate Cancer ». *Cancer Cell* 26 (1): 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.025>.

Dura, Burak, Stephanie K. Dougan, Marta Barisa, Melanie M. Hoehl, Catherine T. Lo, Hidde L. Ploegh, et Joel Voldman. 2015. « Profiling Lymphocyte Interactions at the Single-Cell Level by Microfluidic Cell Pairing ». *Nature Communications* 6 (1): 5940. <https://doi.org/10.1038/ncomms6940>.

Dura, Burak, Mariah M. Servos, Rachel M. Barry, Hidde L. Ploegh, Stephanie K. Dougan, et Joel Voldman. 2016. « Longitudinal Multiparameter Assay of Lymphocyte Interactions from Onset by Microfluidic Cell Pairing and Culture ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (26). <https://doi.org/10.1073/pnas.1515364113>.

Dustin, Michael L., et John A. Cooper. 2000. « The Immunological Synapse and the Actin Cytoskeleton: Molecular Hardware for T Cell Signaling ». *Nature Immunology* 1 (1): 23-29. <https://doi.org/10.1038/76877>.

El Boustany, Charbel, Maria Katsogiannou, Philippe Delcourt, Etienne Dewailly, Natalia Prevarskaya, Anne-Sophie Borowiec, et Thierry Capiod. 2010. « Differential Roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the Control of Cell Proliferation and SOCE Amplitude in HEK293 Cells ». *Cell Calcium* 47 (4): 350-59. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.01.006>.

Eppert, Kolja, Katsuto Takenaka, Eric R Lechman, Levi Waldron, Björn Nilsson, Peter van Galen, Klaus H Metzeler, et al. 2011. « Stem Cell Gene Expression Programs Influence Clinical Outcome in Human Leukemia ». *Nature Medicine* 17 (9): 1086-93. <https://doi.org/10.1038/nm.2415>.

Essers, Marieke A. G., Sandra Offner, William E. Blanco-Bose, Zoe Waibler, Ulrich Kalinke, Michel A. Duchosal, et Andreas Trumpp. 2009. « IFN α Activates Dormant Haematopoietic Stem Cells in Vivo ». *Nature* 458 (7240): 904-8. <https://doi.org/10.1038/nature07815>.

Essers, Marieke Alida Gertruda, et Andreas Trumpp. 2010. « Targeting Leukemic Stem Cells by Breaking Their Dormancy ». *Molecular Oncology* 4 (5): 443-50. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.06.001>.

Estey, Elihu H. 2014. « Acute Myeloid Leukemia: 2014 Update on Risk-Stratification and Management: AML: 2014 Update on Risk-Stratification and Management ». *American Journal of Hematology* 89 (11): 1063-81. <https://doi.org/10.1002/ajh.23834>.

Eun, Kiyong, Seok Won Ham, et Hyunggee Kim. 2017. « Cancer Stem Cell Heterogeneity: Origin and New Perspectives on CSC Targeting ». *BMB Reports* 50 (3): 117-25. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.3.222>.

Eyles, Jo, Anne-Laure Puaux, Xiaojie Wang, Benjamin Toh, Celine Prakash, Michelle Hong, Tze Guan Tan, et al. 2010.

- « Tumor Cells Disseminate Early, but Immunosurveillance Limits Metastatic Outgrowth, in a Mouse Model of Melanoma ». *Journal of Clinical Investigation* 120 (6): 2030-39. <https://doi.org/10.1172/JCI42002>.
- Faouzi M, Hague F, Potier M, Ahidouch A, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H. Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2011 Feb;226(2):542-51. doi: 10.1002/jcp.22363. PMID: 20683915.
- Faouzi M, Kischel P, Hague F, Ahidouch A, Benzerdjeb N, Sevestre H, Penner R, Ouadid-Ahidouch H. ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Mar;1833(3):752-60. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.12.009. Epub 2012 Dec 22. PMID: 23266555.
- Farge, Thomas, Estelle Saland, Fabienne de Toni, Nesrine Aroua, Mohsen Hosseini, Robin Perry, Claudie Bosc, et al. 2017. « Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism ». *Cancer Discovery* 7 (7): 716-35. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0441>.
- Farrar, J. D., K. H. Katz, J. Windsor, G. Thrush, R. H. Scheuermann, J. W. Uhr, et N. E. Street. 1999. « Cancer Dormancy. VII. A Regulatory Role for CD8+ T Cells and IFN-Gamma in Establishing and Maintaining the Tumor-Dormant State ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (5): 2842-49.
- Fathi, Ezzatollah, Raheleh Farahzadi, Roghayeh Sheervalilou, Zohreh Sanaat, et Ilja Vietor. 2020. « A General View of CD33⁺ Leukemic Stem Cells and CAR-T Cells as Interesting Targets in Acute Myeloblastic Leukemia Therapy ». *BLOOD RESEARCH* 55 (1): 10-16. <https://doi.org/10.5045/br.2020.55.1.10>.
- Faure, Sophie, Laura Inés Salazar-Fontana, Monique Semichon, Victor L J Tybulewicz, Georges Bismuth, Alain Trautmann, Ronald N Germain, et Jérôme Delon. 2004. « ERM Proteins Regulate Cytoskeleton Relaxation Promoting T Cell-APC Conjugation ». *Nature Immunology* 5 (3): 272-79. <https://doi.org/10.1038/ni1039>.
- Fenninger, Franz, et Wilfred A. Jefferies. 2019. « What's Bred in the Bone: Calcium Channels in Lymphocytes ». *The Journal of Immunology* 202 (4): 1021-30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800837>.
- Feske, Stefan. 2007. « Calcium Signalling in Lymphocyte Activation and Disease ». *Nature Reviews Immunology* 7 (9): 690-702. <https://doi.org/10.1038/nri2152>.
- Feske, Stefan, Ruth Draeger, Hans-Hartmut Peter, Klaus Eichmann, et Anjana Rao. 2000. « The Duration of Nuclear Residence of NFAT Determines the Pattern of Cytokine Expression in Human SCID T Cells ». *The Journal of Immunology* 165 (1): 297-305. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.1.297>.
- Feske, Stefan, Jena Giltneane, Ricardo Dolmetsch, Louis M. Staudt, et Anjana Rao. 2001. « Gene Regulation Mediated by Calcium Signals in T Lymphocytes ». *Nature Immunology* 2 (4): 316-24. <https://doi.org/10.1038/86318>.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):179-85. doi: 10.1038/nature04702. Epub 2006 Apr 2. PMID: 16582901.
- Fife, Brian T, Kristen E Pauken, Todd N Eagar, Takashi Obu, Jenny Wu, Qizhi Tang, Miyuki Azuma, Matthew F Krummel, et Jeffrey A Bluestone. 2009. « Interactions between PD-1 and PD-L1 Promote Tolerance by Blocking the TCR-Induced Stop Signal ». *Nature Immunology* 10 (11): 1185-92. <https://doi.org/10.1038/ni.1790>.
- Fiorio Pla, A., K. Kondratska, et N. Prevarskaya. 2016. « STIM and ORAI Proteins: Crucial Roles in Hallmarks of Cancer ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 310 (7): C509-19. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00364.2015>.
- Flourakis, M, V Lehen'kyi, B Beck, M Raphaël, M Vandenberghe, F V Abeele, M Roudbaraki, et al. 2010. « Orai1 Contributes to the Establishment of an Apoptosis-Resistant Phenotype in Prostate Cancer Cells ». *Cell Death & Disease* 1 (9): e75-e75. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.52>.
- Fluegen, Georg, Alvaro Avivar-Valderas, Yarong Wang, Michael R. Padgen, James K. Williams, Ana Rita Nobre, Veronica Calvo, et al. 2017. « Phenotypic Heterogeneity of Disseminated Tumour Cells Is Preset by Primary Tumour Hypoxic Microenvironments ». *Nature Cell Biology* 19 (2): 120-32. <https://doi.org/10.1038/ncb3465>.
- Foltys, D., A. Linkermann, A. Heumann, M. Hoppe-Lotichius, M. Heise, A. Schad, J. Schneider, et al. 2009. « Organ Recipients Suffering From Undifferentiated Neuroendocrine Small-Cell Carcinoma of Donor Origin: A Case Report ». *Transplantation Proceedings* 41 (6): 2639-42. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.06.026>.
- Francisco, Loise M., Victor H. Salinas, Keturah E. Brown, Vijay K. Vanguri, Gordon J. Freeman, Vijay K. Kuchroo, et Arlene H. Sharpe. 2009. « PD-L1 Regulates the Development, Maintenance, and Function of Induced Regulatory T Cells ». *Journal of Experimental Medicine* 206 (13): 3015-29. <https://doi.org/10.1084/jem.20090847>.
- Freeman, Gordon J., Andrew J. Long, Yoshiko Iwai, Karen Bourque, Tatyana Chernova, Hiroyuki Nishimura, Lori J. Fitz, et al. 2000. « Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation ». *Journal of Experimental Medicine* 192 (7): 1027-34.

<https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>.

Jacob Furth, Morton C. Kahn, Charles Breedis; The Transmission of Leukemia of Mice with a Single Cell. *The American Journal of Cancer* 1 October 1937; 31 (2): 276–282. <https://doi.org/10.1158/ajc.1937.276>

Gabriel, Christian H., Fridolin Gross, Martin Karl, Heike Stephanowitz, Anna Floriane Hennig, Melanie Weber, Stefanie Gryzik, et al. 2016. « Identification of Novel Nuclear Factor of Activated T Cell (NFAT)-Associated Proteins in T Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (46): 24172-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.739326>.

Gal, H, N Amariglio, L Trakhtenbrot, J Jacob-Hirsh, O Margalit, A Avigdor, A Nagler, et al. 2006. « Gene Expression Profiles of AML Derived Stem Cells; Similarity to Hematopoietic Stem Cells ». *Leukemia* 20 (12): 2147-54. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404401>.

Genovese, Giulio, Anna K. Kähler, Robert E. Handsaker, Johan Lindberg, Samuel A. Rose, Samuel F. Bakhoun, Kimberly Chambert, et al. 2014. « Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence ». *New England Journal of Medicine* 371 (26): 2477-87. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405>.

Gentles, Andrew J. 2010. « Association of a Leukemic Stem Cell Gene Expression Signature With Clinical Outcomes in Acute Myeloid Leukemia ». *JAMA* 304 (24): 2706. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1862>.

Ghajar, Cyrus M. 2015. « Metastasis Prevention by Targeting the Dormant Niche ». *Nature Reviews Cancer* 15 (4): 238-47. <https://doi.org/10.1038/nrc3910>.

Gill S, Maus MV, Porter DL. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25years in the making. *Blood Rev.* 2016 May;30(3):157-67. doi: 10.1016/j.blre.2015.10.003. Epub 2015 Nov 6. PMID: 26574053.

Ivana Gojo, Robert K. Stuart, Jonathan Webster, Amanda Blackford, Juan Carlos Varela, Jillian Morrow, Amy E. DeZern, Matthew C Foster, Mark J. Levis, Catherine C. Coombs, Gabrielle T. Prince, B. Douglas Smith, Hendrik W. Van Deventer, Katarzyna Jamieson, Ravi Varadhan, Benjamin G. Vincent, Jonathan S. Serody, Leo Luznik, Joshua F. Zeidner; Multi-Center Phase 2 Study of Pembrolizumab (Pembro) and Azacitidine (AZA) in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML) and in Newly Diagnosed (≥65 Years) AML Patients. *Blood* 2019; 134 (Supplement_1): 832. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2019-127345>

Gorczyca, Wojciech, Zhong-Yi Sun, William Cronin, Xiaoyu Li, Sophal Mau, et Sorina Tugulea. 2011. « Immunophenotypic Pattern of Myeloid Populations by Flow Cytometry Analysis ». In *Methods in Cell Biology*, 103:221-66. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385493-3.00010-3>.

Goswami, Meghali, Gege Gui, Laura W Dillon, Katherine E Lindblad, Julie Thompson, Janet Valdez, Dong-Yun Kim, et al. 2022. « Pembrolizumab and Decitabine for Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia ». *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 10 (1): e003392. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003392>.

Gotwals, Philip, Scott Cameron, Daniela Cipolletta, Viviana Cremasco, Adam Crystal, Becker Hewes, Britta Mueller, et al. 2017. « Prospects for Combining Targeted and Conventional Cancer Therapy with Immunotherapy ». *Nature Reviews Cancer* 17 (5): 286-301. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.17>.

Graf, M., S. Reif, K. Hecht, R. Pelka-Fleischer, T. Kroell, K. Pfister, et H. Schmetzer. 2005. « High Expression of Costimulatory Molecules Correlates with Low Relapse-Free Survival Probability in Acute Myeloid Leukemia (AML) ». *Annals of Hematology* 84 (5): 287-97. <https://doi.org/10.1007/s00277-004-0978-0>.

Greiner, Jochen, Susanne Hofmann, Michael Schmitt, Marlies Götz, Markus Wiesneth, Hubert Schrezenmeier, Donald Bunjes, Hartmut Döhner, et Lars Bullinger. 2017. « Acute Myeloid Leukemia with Mutated Nucleophosmin 1: An Immunogenic Acute Myeloid Leukemia Subtype and Potential Candidate for Immune Checkpoint Inhibition ». *Haematologica* 102 (12): e499-501. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.176461>.

Greiner J, Bullinger L, Guinn BA, Döhner H, Schmitt M. Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 15;14(22):7161-6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1102. PMID: 19010831.

Griffiths, Gillian M., Andy Tsun, et Jane C. Stinchcombe. 2010. « The Immunological Synapse: A Focal Point for Endocytosis and Exocytosis ». *Journal of Cell Biology* 189 (3): 399-406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002027>.

Guéguinou, Maxime, Thomas Harnois, David Crottes, Arnaud Uguen, Nadine Deliot, Audrey Gambade, Aurélie Chantôme, et al. 2016. « SK3/TRPC1/Orai1 Complex Regulates SOCE-Dependent Colon Cancer Cell Migration: A Novel Opportunity to Modulate Anti-EGFR MAb Action by the Alkyl-Lipid Ohmline ». *Oncotarget* 7 (24): 36168-84. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8786>.

Gunzer M, Schäfer A, Borgmann S, Grabbe S, Zänker KS, Bröcker EB, Kämpgen E, Friedl P. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity.* 2000 Sep;13(3):323-32. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00032-7. PMID: 11021530.

Gwack, Yousang, Stefan Feske, Sonal Srikanth, Patrick G. Hogan, et Anjana Rao. 2007. « Signalling to Transcription: Store-Operated Ca²⁺ Entry and NFAT Activation in Lymphocytes ». *Cell Calcium* 42 (2): 145-56. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.03.007>.

Hackl, Hubert, Katarina Steinleitner, Karin Lind, Sybille Hofer, Natasa Tomic, Sonja Pavlovic, Nada Suvajdzic, Heinz Sill, et Rotraud Wieser. 2015. « A Gene Expression Profile Associated with Relapse of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Is Enriched for Leukemia Stem Cell Genes ». *Leukemia & Lymphoma* 56 (4): 1126-28. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.944523>.

Halle, Stephan, Kirsten Anja Keyser, Felix Rolf Stahl, Andreas Busche, Anja Marquardt, Xiang Zheng, Melanie Galla, et al. 2016. « In Vivo Killing Capacity of Cytotoxic T Cells Is Limited and Involves Dynamic Interactions and T Cell Cooperativity ». *Immunity* 44 (2): 233-45. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.010>.

Hamanishi, Junzo, Masaki Mandai, Masashi Iwasaki, Taku Okazaki, Yoshimasa Tanaka, Ken Yamaguchi, Toshihiro Higuchi, et al. 2007. « Programmed Cell Death 1 Ligand 1 and Tumor-Infiltrating CD8⁺ T Lymphocytes Are Prognostic Factors of Human Ovarian Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (9): 3360-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611533104>.

Hamann, Philip R., Lois M. Hinman, Irwin Hollander, Carl F. Beyer, Delores Lindh, Ryan Holcomb, William Hallett, et al. 2002. « Gemtuzumab Ozogamicin, A Potent and Selective Anti-CD33 Antibody–Calicheamicin Conjugate for Treatment of Acute Myeloid Leukemia ». *Bioconjugate Chemistry* 13 (1): 47-58. <https://doi.org/10.1021/bc010021y>.

Han, Shaobo, Ayuna Asoyan, Hannah Rabenstein, Naoko Nakano, et Reinhard Obst. 2010. « Role of Antigen Persistence and Dose for CD4⁺ T-Cell Exhaustion and Recovery ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (47): 20453-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008437107>.

Hanahan, Douglas. 2022. « Hallmarks of Cancer: New Dimensions ». *Cancer Discovery* 12 (1): 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

Hartzell, Catherine A, Katarzyna I Jankowska, Janis K Burkhardt, et Richard S Lewis. 2016. « Calcium Influx through CRAC Channels Controls Actin Organization and Dynamics at the Immune Synapse ». *ELife* 5 (juillet): e14850. <https://doi.org/10.7554/eLife.14850>.

Haubner, S., F. Perna, T. Köhnke, C. Schmidt, S. Berman, C. Augsburg, F. M. Schnorfeil, et al. 2019. « Coexpression Profile of Leukemic Stem Cell Markers for Combinatorial Targeted Therapy in AML ». *Leukemia* 33 (1): 64-74. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0180-3>.

Hauswirth, A.W., S. Florian, D. Printz, K. Sotlar, M.-T. Krauth, G. Fritsch, G.-H. Scherthaner, et al. 2007. « Expression of the Target Receptor CD33 in CD34⁺/CD38[?]/CD123⁺ AML Stem Cells ». *European Journal of Clinical Investigation* 37 (1): 73-82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01746.x>.

He LP, Hewavitharana T, Soboloff J, Spassova MA, Gill DL. A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2. *J Biol Chem* 280: 10997–11006, 2005.

Heibein, Jeffrey A., Ing Swie Goping, Michele Barry, Michael J. Pinkoski, Gordon C. Shore, Douglas R. Green, et R. Chris Bleackley. 2000. « Granzyme B–Mediated Cytochrome C Release Is Regulated by the Bcl-2 Family Members Bid and Bax ». *Journal of Experimental Medicine* 192 (10): 1391-1402. <https://doi.org/10.1084/jem.192.10.1391>.

Heissmeyer, Vigo, et Anjana Rao. 2004. « E3 Ligases in T Cell Anergy—Turning Immune Responses into Tolerance ». *Science's STKE* 2004 (241). <https://doi.org/10.1126/stke.2412004pe29>.

Herbrich, Shelley, Antonio Cavazos, Cora Marie C Cheung, Lynette Alexander-Williams, Nicholas J. Short, Jairo Matthews, Naval G. Daver, et Marina Y Konopleva. 2019. « Single-Cell Mass Cytometry Identifies Mechanisms of Resistance to Immunotherapy in AML ». *Blood* 134 (Supplement_1): 1428-1428. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-128601>.

Herbst, Roy S., Jean-Charles Soria, Marcin Kowanz, Gregg D. Fine, Omid Hamid, Michael S. Gordon, Jeffery A. Sosman, et al. 2014. « Predictive Correlates of Response to the Anti-PD-L1 Antibody MPDL3280A in Cancer Patients ». *Nature* 515 (7528): 563-67. <https://doi.org/10.1038/nature14011>.

Hino, Ryosuke, Kenji Kabashima, Yu Kato, Hiroaki Yagi, Motonobu Nakamura, Tasuku Honjo, Taku Okazaki, et Yoshiki Tokura. 2010. « Tumor Cell Expression of Programmed Cell Death-1 Ligand 1 Is a Prognostic Factor for Malignant Melanoma ». *Cancer* 116 (7): 1757-66. <https://doi.org/10.1002/cncr.24899>.

Ho, Ping-Chih, Jessica Daus Bihuniak, Andrew N. Macintyre, Matthew Staron, Xiaojing Liu, Robert Amezcua, Yao-Chen Tsui, et al. 2015. « Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-Tumor T Cell Responses ». *Cell* 162 (6): 1217-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.012>.

Ho, Tzu-Chieh, Mark LaMere, Brett M. Stevens, John M. Ashton, Jason R. Myers, Kristen M. O'Dwyer, Jane L. Liesveld, et al. 2016. « Evolution of Acute Myelogenous Leukemia Stem Cell Properties after Treatment and Progression ». *Blood* 128 (13): 1671-78. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-695312>.

- Hobo, Willemijn, Frans Maas, Niken Adisty, Theo de Witte, Nicolaas Schaap, Robbert van der Voort, et Harry Dolstra. 2010. « SiRNA Silencing of PD-L1 and PD-L2 on Dendritic Cells Augments Expansion and Function of Minor Histocompatibility Antigen-Specific CD8+ T Cells ». *Blood* 116 (22): 4501-11. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-278739>.
- Hogan, Patrick G., Lin Chen, Julie Nardone, et Anjana Rao. 2003. « Transcriptional Regulation by Calcium, Calcineurin, and NFAT ». *Genes & Development* 17 (18): 2205-32. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>.
- Hogan, Patrick G., Richard S. Lewis, et Anjana Rao. 2010. « Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI ». *Annual Review of Immunology* 28 (1): 491-533. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132550>.
- Hope, Kristin J, Liqing Jin, et John E Dick. 2004. « Acute Myeloid Leukemia Originates from a Hierarchy of Leukemic Stem Cell Classes That Differ in Self-Renewal Capacity ». *Nature Immunology* 5 (7): 738-43. <https://doi.org/10.1038/ni1080>.
- Horsley, Valerie, Antonios O. Aliprantis, Lisa Polak, Laurie H. Glimcher, et Elaine Fuchs. 2008. « NFATc1 Balances Quiescence and Proliferation of Skin Stem Cells ». *Cell* 132 (2): 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.047>.
- Hou, Xiaowei, Leanne Pedi, Melinda M. Diver, et Stephen B. Long. 2012. « Crystal Structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai ». *Science* 338 (6112): 1308-13. <https://doi.org/10.1126/science.1228757>.
- Hou HA, Tien HF. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies. *J Biomed Sci.* 2020 Jul 21;27(1):81. doi: 10.1186/s12929-020-00674-7. PMID: 32690020; PMCID: PMC7372828.
- Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, Zhu MX. 2-Aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 279: 35741–35748, 2004.
- Huang P, Plunkett W. Fludarabine- and gemcitabine-induced apoptosis: incorporation of analogs into DNA is a critical event. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;36(3):181-8. doi: 10.1007/BF00685844. PMID: 7781136.
- Huang T, Song X, Xu D, Tiek D, Goenka A, Wu B, Sastry N, Hu B, Cheng SY. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics.* 2020 Jul 9;10(19):8721-8743. doi: 10.7150/thno.41648. PMID: 32754274; PMCID: PMC7392012.
- Huppa, Johannes B., et Mark M. Davis. 2003. « T-Cell-Antigen Recognition and the Immunological Synapse ». *Nature Reviews Immunology* 3 (12): 973-83. <https://doi.org/10.1038/nri1245>.
- Im SH, Rao A. Activation and deactivation of gene expression by Ca²⁺/calcineurin-NFAT-mediated signaling. *Mol Cells.* 2004 Aug 31;18(1):1-9. PMID: 15359117.
- Ishida, Masayoshi, Yoshiko Iwai, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Gordon J Freeman, Nagahiro Minato, et Tasuku Honjo. 2002. « Differential Expression of PD-L1 and PD-L2, Ligands for an Inhibitory Receptor PD-1, in the Cells of Lymphohematopoietic Tissues ». *Immunology Letters* 84 (1): 57-62. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00142-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00142-6).
- Ishikawa, Fumihiko, Shuro Yoshida, Yoriko Saito, Atsushi Hijikata, Hiroshi Kitamura, Satoshi Tanaka, Ryu Nakamura, et al. 2007. « Chemotherapy-Resistant Human AML Stem Cells Home to and Engraft within the Bone-Marrow Endosteal Region ». *Nature Biotechnology* 25 (11): 1315-21. <https://doi.org/10.1038/nbt1350>.
- Jacob Furth, Morton C. Kahn, Charles Breedis; The Transmission of Leukemia of Mice with a Single Cell. *The American Journal of Cancer* 1 October 1937; 31 (2): 276–282. <https://doi.org/10.1158/ajc.1937.276>
- Jaiswal, Siddhartha, Catriona H.M. Jamieson, Wendy W. Pang, Christopher Y. Park, Mark P. Chao, Ravindra Majeti, David Traver, Nico van Rooijen, et Irving L. Weissman. 2009. « CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis ». *Cell* 138 (2): 271-85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.046>.
- Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science.* 2019 Nov 1;366(6465):eaan4673. doi: 10.1126/science.aan4673. PMID: 31672865; PMCID: PMC8050831.
- Jan, Max, Mark P. Chao, Adriel C. Cha, Ash A. Alizadeh, Andrew J. Gentles, Irving L. Weissman, et Ravindra Majeti. 2011. « Prospective Separation of Normal and Leukemic Stem Cells Based on Differential Expression of TIM3, a Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cell Marker ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (12): 5009-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100551108>.
- Jardin, Isaac, et Juan A. Rosado. 2016. « STIM and Calcium Channel Complexes in Cancer ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863 (6): 1418-26. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.003>.
- Jia, Bei, Liru Wang, David F. Claxton, W Christopher Ehmann, Witold B. Rybka, Shin Mineishi, Syed Rizvi, et al. 2018. « Bone Marrow CD8 T Cells Express High Frequency of PD-1 and Exhibit Reduced Anti-Leukemia Response in Newly Diagnosed AML Patients ». *Blood Cancer Journal* 8 (3): 34. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0069-4>.

- Jia, Ruinan, Min Ji, Guosheng Li, Yuan Xia, Shouhui Guo, Peng Li, Yanping Sun, et al. 2022. « Subclones of Bone Marrow CD34⁺ Cells in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis Confer Responses of Patients to Induction Chemotherapy ». *Cancer* 128 (22): 3929-42. <https://doi.org/10.1002/cncr.34481>.
- Jiang, Weiqin, Yinjun He, Wenguang He, Guosheng Wu, Xile Zhou, Qinsong Sheng, Weixiang Zhong, et al. 2021. « Exhausted CD8⁺T Cells in the Tumor Immune Microenvironment: New Pathways to Therapy ». *Frontiers in Immunology* 11 (février): 622509. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.622509>.
- Jinesh, Goodwin G., Ganiraju C. Manyam, Chinedu O. Mmeje, Keith A. Baggerly, et Ashish M. Kamat. 2017. « Surface PD-L1, E-Cadherin, CD24, and VEGFR2 as Markers of Epithelial Cancer Stem Cells Associated with Rapid Tumorigenesis ». *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08796-z>.
- Joseph, Noah, Barak Reicher, et Mira Barda-Saad. 2014. « The Calcium Feedback Loop and T Cell Activation: How Cytoskeleton Networks Control Intracellular Calcium Flux ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838 (2): 557-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2013.07.009>.
- Jung, Namyoun, Bo Dai, Andrew J. Gentles, Ravindra Majeti, et Andrew P. Feinberg. 2015. « An LSC Epigenetic Signature Is Largely Mutation Independent and Implicates the HOXA Cluster in AML Pathogenesis ». *Nature Communications* 6 (1): 8489. <https://doi.org/10.1038/ncomms9489>.
- Kaech, Susan M., et Weiguo Cui. 2012. « Transcriptional Control of Effector and Memory CD8⁺ T Cell Differentiation ». *Nature Reviews Immunology* 12 (11): 749-61. <https://doi.org/10.1038/nri3307>.
- Kalwak, Krzysztof, Ewa Gorczyńska, Jacek Toporski, Dominik Turkiewicz, Malgorzata Slociak, Marek Ussowicz, Elżbieta Latos-Grażyńska, Marzena Król, Janina Boguslawska-Jaworska, et Alicja Chybicka. 2002. « Immune Reconstitution after Haematopoietic Cell Transplantation in Children: Immunophenotype Analysis with Regard to Factors Affecting the Speed of Recovery: Immune Reconstitution after Auto-/Allogeneic HCT in Children ». *British Journal of Haematology* 118 (1): 74-89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03560.x>.
- Kauffman, H. M., M. A. McBride, et F. L. Delmonico. 2000. « First Report of the United Network for Organ Sharing Transplant Tumor Registry: Donors with a History of Cancer ». *Transplantation* 70 (12): 1747-51.
- Kawano, S, S Shoji, S Ichinose, K Yamagata, M Tagami, et M Hiraoka. 2002. « Characterization of Ca²⁺ Signaling Pathways in Human Mesenchymal Stem Cells ». *Cell Calcium* 32 (4): 165-74. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001240>.
- Kawano, Seiko, Keishi Otsu, Satoshi Shoji, Kazuo Yamagata, et Masayasu Hiraoka. 2003. « Ca²⁺ Oscillations Regulated by Na⁺-Ca²⁺ Exchanger and Plasma Membrane Ca²⁺ Pump Induce Fluctuations of Membrane Currents and Potentials in Human Mesenchymal Stem Cells ». *Cell Calcium* 34 (2): 145-56. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00069-1).
- Keir, Mary E., Manish J. Butte, Gordon J. Freeman, et Arlene H. Sharpe. 2008. « PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity ». *Annual Review of Immunology* 26 (1): 677-704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>.
- Kenderian, S S, M Ruella, O Shestova, M Klichinsky, V Aikawa, J J D Morrisette, J Scholler, et al. 2015. « CD33-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit Potent Preclinical Activity against Human Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 29 (8): 1637-47. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.52>.
- Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, Schnittger S, Schoch C, Kolb HJ, Ludwig WD, Hiddemann W, Haferlach T. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica*. 2003 Jun;88(6):646-53. PMID: 12801840.
- Khaldoyanidi, Sophia, Dirk Nagorsen, Anthony Stein, Gerrit Ossenkoppele, et Marion Subklewe. 2021. « Immune Biology of Acute Myeloid Leukemia: Implications for Immunotherapy ». *Journal of Clinical Oncology* 39 (5): 419-32. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00475>.
- Khanniche, Asma, Yi Yang, Jie Zhang, Shiqing Liu, Liliang Xia, Huangqi Duan, Yaxian Yao, et al. 2022. « Early-like Differentiation Status of Systemic PD-1⁺ CD8⁺ T Cells Predicts PD-1 Blockade Outcome in Non-small Cell Lung Cancer ». *Clinical & Translational Immunology* 11 (7). <https://doi.org/10.1002/cti2.1406>.
- Kiani, Alexander, Ivonne Habermann, Michael Haase, Silvia Feldmann, Sabine Boxberger, Maria A. Sanchez-Fernandez, Christian Thiede, Martin Bornhäuser, et Gerhard Ehninger. 2004. « Expression and Regulation of NFAT (Nuclear Factors of Activated T Cells) in Human CD34⁺ Cells: Down-Regulation upon Myeloid Differentiation ». *Journal of Leukocyte Biology* 76 (5): 1057-65. <https://doi.org/10.1189/jlb.0404259>.
- Kiani, Alexander, Hanna Kuithan, Friederike Kuithan, Satu Kyttälä, Ivonne Habermann, Achim Temme, Martin Bornhäuser, et Gerhard Ehninger. 2007. « Expression Analysis of Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT) during Myeloid Differentiation of CD34⁺ Cells: Regulation of Fas Ligand Gene Expression in Megakaryocytes ». *Experimental Hematology* 35 (5): 757-70. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.02.001>.

- Kihara, R, Y Nagata, H Kiyoi, T Kato, E Yamamoto, K Suzuki, F Chen, et al. 2014. « Comprehensive Analysis of Genetic Alterations and Their Prognostic Impacts in Adult Acute Myeloid Leukemia Patients ». *Leukemia* 28 (8): 1586-95. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.55>.
- Kikushige, Yoshikane, Takahiro Shima, Shin-ichiro Takayanagi, Shingo Urata, Toshihiro Miyamoto, Hiromi Iwasaki, Katsuto Takenaka, et al. 2010. « TIM-3 Is a Promising Target to Selectively Kill Acute Myeloid Leukemia Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 7 (6): 708-17. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.014>.
- Kim, Ji-Hee, Sayama Lkhagvadorj, Mi-Ra Lee, Kyu-Hee Hwang, Hyun Chul Chung, Jae Hung Jung, Seung-Kuy Cha, et Minseob Eom. 2014. « Orai1 and STIM1 Are Critical for Cell Migration and Proliferation of Clear Cell Renal Cell Carcinoma ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448 (1): 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.064>.
- Kim, Min Seuk, Weizhong Zeng, Joseph P. Yuan, Dong Min Shin, Paul F. Worley, et Shmuel Muallem. 2009. « Native Store-Operated Ca²⁺ Influx Requires the Channel Function of Orai1 and TRPC1 ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (15): 9733-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808097200>.
- Kim, T, K Yoshida, Y K Kim, M S Tyndel, H J Park, S H Choi, J-S Ahn, et al. 2016. « Clonal Dynamics in a Single AML Case Tracked for 9 Years Reveals the Complexity of Leukemia Progression ». *Leukemia* 30 (2): 295-302. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.264>.
- Klein-Hessling, Stefan, Khalid Muhammad, Matthias Klein, Tobias Pusch, Ronald Rudolf, Jessica Flöter, Musga Qureischi, et al. 2017. « NFATc1 Controls the Cytotoxicity of CD8⁺ T Cells ». *Nature Communications* 8 (1): 511. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00612-6>.
- Knaus, Hanna A., Sofia Berglund, Hubert Hackl, Amanda L. Blackford, Joshua F. Zeidner, Raúl Montiel-Esparza, Rupkatha Mukhopadhyay, et al. 2018. « Signatures of CD8⁺ T Cell Dysfunction in AML Patients and Their Reversibility with Response to Chemotherapy ». *JCI Insight* 3 (21): e120974. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120974>.
- Kobielak, Krzysztof, Nicole Stokes, June de la Cruz, Lisa Polak, et Elaine Fuchs. 2007. « Loss of a Quiescent Niche but Not Follicle Stem Cells in the Absence of Bone Morphogenetic Protein Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (24): 10063-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703004104>.
- Kondratska, Kateryna, Artem Kondratskyi, Maya Yassine, Loic Lemonnier, Gilbert Lepage, Angela Morabito, Roman Skryma, et Natalia Prevarskaya. 2014. « Orai1 and STIM1 Mediate SOCE and Contribute to Apoptotic Resistance of Pancreatic Adenocarcinoma ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 (10): 2263-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.012>.
- Kondratskyi, Artem, Kateryna Kondratska, Roman Skryma, et Natalia Prevarskaya. 2015. « Ion Channels in the Regulation of Apoptosis ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848 (10): 2532-46. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.030>.
- Kong, Y, J Zhang, D F Claxton, W C Ehmann, W B Rybka, L Zhu, H Zeng, T D Schell, et H Zheng. 2015. « PD-1hiTIM-3⁺ T Cells Associate with and Predict Leukemia Relapse in AML Patients Post Allogeneic Stem Cell Transplantation ». *Blood Cancer Journal* 5 (7): e330-e330. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.58>.
- Kong, Y., L. Zhu, T. D. Schell, J. Zhang, D. F. Claxton, W. C. Ehmann, W. B. Rybka, M. R. George, H. Zeng, et H. Zheng. 2016. « T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8⁺ T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients ». *Clinical Cancer Research* 22 (12): 3057-66. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2626>.
- Konopleva, Marina Y., et Craig T. Jordan. 2011. « Leukemia Stem Cells and Microenvironment: Biology and Therapeutic Targeting ». *Journal of Clinical Oncology* 29 (5): 591-99. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.0904>.
- Kopp, Hans-Georg, Scott T. Avezilla, Andrea T. Hooper, et Shahin Rafii. 2005. « The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization ». *Physiology* 20 (5): 349-56. <https://doi.org/10.1152/physiol.00025.2005>.
- Kovtun Y, Jones GE, Adams S, Harvey L, Audette CA, Wilhelm A, Bai C, Rui L, Laleau R, Liu F, Ab O, Setiady Y, Yoder NC, Goldmacher VS, Chari RVJ, Pinkas J, Chittenden T. A CD123-targeting antibody-drug conjugate, IMG632, designed to eradicate AML while sparing normal bone marrow cells. *Blood Adv.* 2018 Apr 24;2(8):848-858. doi: 10.1182/bloodadvances.2018017517. PMID: 29661755; PMCID: PMC5916008.
- Krause, Daniela S., et Richard A. Van Etten. 2007. « Right on Target: Eradicating Leukemic Stem Cells ». *Trends in Molecular Medicine* 13 (11): 470-81. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.003>.
- Krönig, Holger, Lukas Kremmler, Bernhard Haller, Carsten Englert, Christian Peschel, Reinhard Andreesen, et Christian U. Blank. 2014. « Interferon-Induced Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1/B7-H1) Expression Increases on Human Acute Myeloid Leukemia Blast Cells during Treatment ». *European Journal of Haematology* 92 (3): 195-203. <https://doi.org/10.1111/ejh.12228>.

- Krummel, Matthew F., et Michael D. Cahalan. 2010. « The Immunological Synapse: A Dynamic Platform for Local Signaling ». *Journal of Clinical Immunology* 30 (3): 364-72. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9393-6>.
- Krummel, Matthew, Christoph Wülfing, Cenk Sumen, et Mark M. Davis. 2000. « Thirty–Six Views of T–Cell Recognition ». Édité par C. R. M. Bangham, R. M. May, et M. A. Novak. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355 (1400): 1071-76. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0644>.
- Kufe, D, D Spriggs, Em Egan, et D Munroe. 1984. « Relationships among Ara-CTP Pools, Formation of (Ara-C)DNA, and Cytotoxicity of Human Leukemic Cells ». *Blood* 64 (1): 54-58. <https://doi.org/10.1182/blood.V64.1.54.54>.
- Kusumbe, Anjali P., et Sharmila A. Bapat. 2009. « Cancer Stem Cells and Aneuploid Populations within Developing Tumors Are the Major Determinants of Tumor Dormancy ». *Cancer Research* 69 (24): 9245-53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2802>.
- Lafouresse, Fanny, Vinicius Cotta-de-Almeida, Gema Malet-Engra, Anne Galy, Salvatore Valitutti, et Loïc Dupré. 2012. « Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Controls Antigen-Presenting Cell-Driven CD4+ T-Cell Motility by Regulating Adhesion to Intercellular Adhesion Molecule-1 ». *Immunology* 137 (2): 183-96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03620.x>.
- Lambert J, Lambert J, Nibourel O, Pautas C, Hayette S, Cayuela JM, Terré C, Rousselot P, Dombret H, Chevret S, Preudhomme C, Castaigne S, Renneville A. MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin. *Oncotarget*. 2014 Aug 15;5(15):6280-8. doi: 10.18632/oncotarget.2196. PMID: 25026287; PMCID: PMC4171629.
- Lane, Steven W., David T. Scadden, et D. Gary Gilliland. 2009. « The Leukemic Stem Cell Niche: Current Concepts and Therapeutic Opportunities ». *Blood* 114 (6): 1150-57. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-202606>.
- T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, J.E. Dick, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice, *Nature*. 367 (1994) 645–648, <https://doi.org/10.1038/367645a0>.
- Le Dieu, R., D. C. Taussig, A. G. Ramsay, R. Mitter, F. Miraki-Moud, R. Fatah, A. M. Lee, T. A. Lister, et J. G. Gribben. 2009. « Peripheral Blood T Cells in Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients at Diagnosis Have Abnormal Phenotype and Genotype and Form Defective Immune Synapses with AML Blasts ». *Blood* 114 (18): 3909-16. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206946>.
- Le Floc'h, Audrey, et Morgan Huse. 2015. « Molecular Mechanisms and Functional Implications of Polarized Actin Remodeling at the T Cell Immunological Synapse ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (3): 537-56. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1760-7>.
- Leanza, Luigi, Antonella Managò, Mario Zoratti, Erich Gulbins, et Ildiko Szabo. 2016. « Pharmacological Targeting of Ion Channels for Cancer Therapy: In Vivo Evidences ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863 (6): 1385-97. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.11.032>.
- Lee, Dyantha I. van der, Rogier M. Reijmers, Maria W. Honders, Renate S. Hagedoorn, Rob C.M. de Jong, Michel G.D. Kester, Dirk M. van der Steen, et al. 2019. « Mutated Nucleophosmin 1 as Immunotherapy Target in Acute Myeloid Leukemia ». *Journal of Clinical Investigation* 129 (2): 774-85. <https://doi.org/10.1172/JCI97482>.
- Lewis, Richard S. 2001. « Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes ». *Annual Review of Immunology* 19 (1): 497-521. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.497>.
- Lewuillon Clara, Aurélie Guillemette, Sofia Titah, Faruk Shaik, Nathalie Jouy, Ossama Labiad, Valerio Farfariello, et al. 2022. « Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (10): 5555. <https://doi.org/10.3390/ijms23105555>.
- Lewuillon Clara, Marie-Océane Laguillaumie, Bruno Quesnel, Thierry Idziorek, Yasmine Touil, et Loïc Lemonnier. 2022. « Put in a “Ca2+II” to Acute Myeloid Leukemia ». *Cells* 11 (3): 543. <https://doi.org/10.3390/cells11030543>.
- Li, Guilin, Zhenxing Zhang, Renzhi Wang, Wenbin Ma, Ying Yang, Junji Wei, et Yanping Wei. 2013. « Suppression of STIM1 Inhibits Human Glioblastoma Cell Proliferation and Induces G0/G1 Phase Arrest ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 32 (1): 20. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-20>.
- Li, Gui-Rong, Haiying Sun, Xiuling Deng, et Chu-Pak Lau. 2005. « Characterization of Ionic Currents in Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow ». *STEM CELLS* 23 (3): 371-82. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0213>.
- Li, Huiming, Anjana Rao, et Patrick G. Hogan. 2011. « Interaction of Calcineurin with Substrates and Targeting Proteins ». *Trends in Cell Biology* 21 (2): 91-103. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.011>.

- Li J, McKeown L, Ojelabi O, Stacey M, Foster R, O'Regan D, Porter KE, Beech DJ. Nanomolar potency and selectivity of a Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel inhibitor against store-operated Ca²⁺ entry and migration of vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 164: 382–393, 2011.
- Li, Sheng, Francine E Garrett-Bakelman, Stephen S Chung, Mathijs A Sanders, Todd Hricik, Franck Rapaport, Jay Patel, et al. 2016. « Distinct Evolution and Dynamics of Epigenetic and Genetic Heterogeneity in Acute Myeloid Leukemia ». *Nature Medicine* 22 (7): 792-99. <https://doi.org/10.1038/nm.4125>.
- Li, X., M. T. Lewis, J. Huang, C. Gutierrez, C. K. Osborne, M.-F. Wu, S. G. Hilsenbeck, et al. 2008. « Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy ». *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 100 (9): 672-79. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn123>.
- Li, Yangqiu, Qingsong Yin, Lijian Yang, Shaohua Chen, Suxia Geng, Xiuli Wu, Liye Zhong, Christian A. Schmidt, et Grzegorz K. Przybylski. 2009. « Reduced Levels of Recent Thymic Emigrants in Acute Myeloid Leukemia Patients ». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58 (7): 1047-55. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0621-3>.
- Lichtenegger, Felix S., Robin Lorenz, Katharina Gellhaus, Wolfgang Hiddemann, Barbara Beck, et Marion Subklewe. 2014. « Impaired NK Cells and Increased T Regulatory Cell Numbers during Cytotoxic Maintenance Therapy in AML ». *Leukemia Research* 38 (8): 964-69. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.05.014>.
- Lichtman, Eben I., Hongwei Du, Peishun Shou, Feifei Song, Kyogo Suzuki, Sarah Ahn, Guangming Li, et al. 2021. « Preclinical Evaluation of B7-H3-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia ». *Clinical Cancer Research* 27 (11): 3141-53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2540>.
- Lin, David Yin-wei, Yoshimasa Tanaka, Masashi Iwasaki, Apostolos G. Gittis, Hua-Poo Su, Bunzo Mikami, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, Nagahiro Minato, et David N. Garboczi. 2008. « The PD-1/PD-L1 Complex Resembles the Antigen-Binding Fv Domains of Antibodies and T Cell Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (8): 3011-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712278105>.
- Lin, Wei, Zhichao Fan, Yuanzhen Suo, Yuting Deng, Min Zhang, Jiyang Wang, Xunbin Wei, et Yiwei Chu. 2015. « The Bullseye Synapse Formed between CD4⁺ T-cell and Staphylococcal Enterotoxin B-pulsed Dendritic Cell Is a Suppressive Synapse in T-cell Response ». *Immunology & Cell Biology* 93 (1): 99-110. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.76>.
- Liou, Jen, Man Lyang Kim, Won Do Heo, Joshua T. Jones, Jason W. Myers, James E. Ferrell, et Tobias Meyer. 2005. « STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx ». *Current Biology* 15 (13): 1235-41. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>.
- Lioudyno, Maria I., J. Ashot Kozak, Aubin Penna, Olga Safrina, Shenyuan L. Zhang, Debasish Sen, Jack Roos, Kenneth A. Stauderman, et Michael D. Cahalan. 2008. « Orai1 and STIM1 Move to the Immunological Synapse and Are Up-Regulated during T Cell Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (6): 2011-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706122105>.
- Lioudyno MI, Kozak JA, Penna A, Safrina O, Zhang SL, Sen D, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD. Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 12;105(6):2011-6. doi: 10.1073/pnas.0706122105. Epub 2008 Feb 4. PMID: 18250319; PMCID: PMC2538873.
- Lis, Annette, Christine Peinelt, Andreas Beck, Suhel Parvez, Mahealani Monteilh-Zoller, Andrea Fleig, et Reinhold Penner. 2007. « CRACM1, CRACM2, and CRACM3 Are Store-Operated Ca²⁺ Channels with Distinct Functional Properties ». *Current Biology* 17 (9): 794-800. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.065>.
- Litan, Alisa, et Sigrid A. Langhans. 2015. « Cancer as a Channelopathy: Ion Channels and Pumps in Tumor Development and Progression ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (mars). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00086>.
- Liu, Gentao, Xiangpeng Yuan, Zhaohui Zeng, Patrizia Tunici, Hiushan Ng, Iman R Abdulkadir, Lizhi Lu, Dwain Irvin, Keith L Black, et John S Yu. 2006. « Analysis of Gene Expression and Chemoresistance of CD133+ Cancer Stem Cells in Glioblastoma ». *Molecular Cancer* 5 (1): 67. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-67>.
- Liu, Huiling, Joshua D. Hughes, Shadon Rollins, Betty Chen, et Eddie Perkins. 2011. « Calcium Entry via ORAI1 Regulates Glioblastoma Cell Proliferation and Apoptosis ». *Experimental and Molecular Pathology* 91 (3): 753-60. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.09.005>.
- Liu, Ting, Jizhou Tan, Minhao Wu, Wenzhe Fan, Jialiang Wei, Bowen Zhu, Jian Guo, et al. 2021. « High-Affinity Neoantigens Correlate with Better Prognosis and Trigger Potent Antihepatocellular Carcinoma (HCC) Activity by Activating CD39⁺ CD8⁺ T Cells ». *Gut* 70 (10): 1965-77. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322196>.
- Liu, Yan, Shannon E. Elf, Yasuhiko Miyata, Goro Sashida, Yuhui Liu, Gang Huang, Silvana Di Giandomenico, et al. 2009. « P53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence ». *Cell Stem Cell* 4 (1): 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.006>.
- Liu, Yuxin, Jan Philipp Bewersdorf, Maximilian Stahl, et Amer M. Zeidan. 2019. « Immunotherapy in Acute Myeloid

- Leukemia and Myelodysplastic Syndromes: The Dawn of a New Era? » *Blood Reviews* 34 (mars): 67-83. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.12.001>.
- Lopez, Jamie A., Olivia Susanto, Misty R. Jenkins, Natalya Lukoyanova, Vivien R. Sutton, Ruby H. P. Law, Angus Johnston, et al. 2013. « Perforin Forms Transient Pores on the Target Cell Plasma Membrane to Facilitate Rapid Access of Granzymes during Killer Cell Attack ». *Blood* 121 (14): 2659-68. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-446146>.
- Löwenberg B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013 Jan 3;121(1):26-8. doi: 10.1182/blood-2012-07-444851. PMID: 23287624.
- Lu, Tangying, et Dmitry I. Gabrilovich. 2012. « Molecular Pathways: Tumor-Infiltrating Myeloid Cells and Reactive Oxygen Species in Regulation of Tumor Microenvironment ». *Clinical Cancer Research* 18 (18): 4877-82. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2939>.
- Luik, Riina M., Minnie M. Wu, JoAnn Buchanan, et Richard S. Lewis. 2006. « The Elementary Unit of Store-Operated Ca²⁺ Entry: Local Activation of CRAC Channels by STIM1 at ER–Plasma Membrane Junctions ». *Journal of Cell Biology* 174 (6): 815-25. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604015>.
- Macian, Fernando. 2005. « NFAT Proteins: Key Regulators of T-Cell Development and Function ». *Nature Reviews Immunology* 5 (6): 472-84. <https://doi.org/10.1038/nri1632>.
- MacKie, Rona M., Robin Reid, et Brian Junor. 2003. « Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery ». *New England Journal of Medicine* 348 (6): 567-68. <https://doi.org/10.1056/NEJM200302063480620>.
- Maleki Behzad M, Abbasi M, Ollaei I, Ghorbani Gholiabad S, Rafieemehr H. Effects of Lifestyle and Environmental Factors on the Risk of Acute Myeloid Leukemia: Result of a Hospital-based Case-Control Study. *J Res Health Sci*. 2021 Aug 12;21(3):e00525. doi: 10.34172/jrhs.2021.58. PMID: 34698659; PMCID: PMC8957684.
- Malladi, Srinivas, Danilo G. Macalinao, Xin Jin, Lan He, Harihar Basnet, Yilong Zou, Elisa de Stanchina, et Joan Massagué. 2016. « Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT ». *Cell* 165 (1): 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.025>.
- Man, Kevin, Sarah S. Gabriel, Yang Liao, Renee Gloury, Simon Preston, Darren C. Henstridge, Marc Pellegrini, et al. 2017. « Transcription Factor IRF4 Promotes CD8⁺ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection ». *Immunity* 47 (6): 1129-1141.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.021>.
- McCarl, C.-A., S. Khalil, J. Ma, M. Oh-hora, M. Yamashita, J. Roether, T. Kawasaki, et al. 2010. « Store-Operated Ca²⁺ Entry through ORAI1 Is Critical for T Cell-Mediated Autoimmunity and Allograft Rejection ». *The Journal of Immunology* 185 (10): 5845-58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001796>.
- Meier, Pascal, et Karen H. Vousden. 2007. « Lucifer's Labyrinth—Ten Years of Path Finding in Cell Death ». *Molecular Cell* 28 (5): 746-54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.016>.
- Mempel, Thorsten R., Sarah E. Henrickson, et Ulrich H. von Andrian. 2004. « T-Cell Priming by Dendritic Cells in Lymph Nodes Occurs in Three Distinct Phases ». *Nature* 427 (6970): 154-59. <https://doi.org/10.1038/nature02238>.
- Metzelder, S K, C Michel, M von Bonin, M Rehberger, E Hessmann, S Inselmann, M Solovey, et al. 2015. « NFATc1 as a Therapeutic Target in FLT3-ITD-Positive AML ». *Leukemia* 29 (7): 1470-77. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.95>.
- Miederer, Anna-Maria, Dalia Alansary, Gertrud Schwär, Po-Hsien Lee, Martin Jung, Volkhard Helms, et Barbara A. Niemeyer. 2015. « A STIM2 Splice Variant Negatively Regulates Store-Operated Calcium Entry ». *Nature Communications* 6 (1): 6899. <https://doi.org/10.1038/ncomms7899>.
- Mira, Helena, Zoraida Andreu, Hoonkyo Suh, D. Chichung Lie, Sebastian Jessberger, Antonella Consiglio, Juana San Emeterio, et al. 2010. « Signaling through BMPRII Regulates Quiescence and Long-Term Activity of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus ». *Cell Stem Cell* 7 (1): 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.016>.
- Mognol, Giuliana P., Patricia S. de Araujo-Souza, Bruno K. Robbs, Leonardo K. Teixeira, et Joao P.B. Viola. 2012. « Transcriptional Regulation of the *c-Myc* Promoter by NFAT1 Involves Negative and Positive NFAT-Responsive Elements ». *Cell Cycle* 11 (5): 1014-28. <https://doi.org/10.4161/cc.11.5.19518>.
- Mognol GP, Carneiro FR, Robbs BK, Faget DV, Viola JP. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis*. 2016 Apr 21;7(4):e2199. doi: 10.1038/cddis.2016.97. PMID: 27100893; PMCID: PMC4855676.
- Mognol, Giuliana P., Roberto Spreafico, Victor Wong, James P. Scott-Browne, Susan Togher, Alexander Hoffmann, Patrick G. Hogan, Anjana Rao, et Sara Trifari. 2017. « Exhaustion-Associated Regulatory Regions in CD8⁺ Tumor-Infiltrating T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (13). <https://doi.org/10.1073/pnas.1620498114>.
- Mopin, Alexia, Frédéric Leprêtre, Shéhérazade Sebda, Céline Villenet, Meriem Ben Khoud, Martin Figeac, Bruno Quesnel,

- et Carine Brinster. 2022. « Detection of Residual and Chemo-resistant Leukemic Cells in an Immune-Competent Mouse Model of Acute Myeloid Leukemia: Potential for Unravelling Their Interactions with Immunity ». Édité par Khushboo Irshad. *PLOS ONE* 17 (4): e0267508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267508>.
- Morlino, Giulia, Olga Barreiro, Francesc Baixauli, Javier Robles-Valero, José M. González-Granado, Ricardo Villa-Bellosta, Jesús Cuenca, et al. 2014. « Miro-1 Links Mitochondria and Microtubule Dynein Motors To Control Lymphocyte Migration and Polarity ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (8): 1412-26. <https://doi.org/10.1128/MCB.01177-13>.
- Motiani, Rajender K., Iskandar F. Abdullaev, et Mohamed Trebak. 2010. « A Novel Native Store-Operated Calcium Channel Encoded by Orai3 ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (25): 19173-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102582>.
- Motiani, Rajender K., Xuexin Zhang, Kelly E. Harmon, Rebecca S. Keller, Khalid Matrougui, James A. Bennett, et Mohamed Trebak. 2013. « Orai3 Is an Estrogen Receptor A-regulated Ca²⁺ Channel That Promotes Tumorigenesis ». *The FASEB Journal* 27 (1): 63-75. <https://doi.org/10.1096/fj.12-213801>.
- Mrózek, Krzysztof, Guido Marcucci, Deedra Nicolet, Kati S. Maharry, Heiko Becker, Susan P. Whitman, Klaus H. Metzeler, et al. 2012. « Prognostic Significance of the European LeukemiaNet Standardized System for Reporting Cytogenetic and Molecular Alterations in Adults With Acute Myeloid Leukemia ». *Journal of Clinical Oncology* 30 (36): 4515-23. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.4738>.
- Mueller, S. N., et R. Ahmed. 2009. « High Antigen Levels Are the Cause of T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (21): 8623-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809818106>.
- Muller, L., P. Simms, M. Nishimura, S. Watkins, et T. Whiteside. 2015. « 18 Surface Binding Followed by Ca²⁺ Influx Results in Selective Activation of Human Regulatory T Cells (Treg) by Tumor-Derived Exosomes (TEX) ». *Oral Oncology* 51 (5): e33. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.02.020>.
- Müller, Martin R., et Anjana Rao. 2010. « NFAT, Immunity and Cancer: A Transcription Factor Comes of Age ». *Nature Reviews Immunology* 10 (9): 645-56. <https://doi.org/10.1038/nri2818>.
- Mwirigi, Anne, Richard Dillon, et Kavita Raj. 2017. « Acute Leukaemia ». *Medicine* 45 (5): 280-86. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.02.010>.
- Myron Kauffman, H., Maureen A. McBride, Wida S. Cherikh, Pamela C. Spain, William H. Marks, et Allan M. Roza. 2002. « Transplant Tumor Registry: Donor Related Malignancies ». *Transplantation* 74 (3): 358-62.
- Nair, J. S., C. J. DaFonseca, A. Tjernberg, W. Sun, J. E. Darnell, B. T. Chait, et J. J. Zhang. 2002. « Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 Phosphorylation in Response to IFN- γ ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (9): 5971-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.052159099>.
- Ng, Stanley W. K., Amanda Mitchell, James A. Kennedy, Weihsu C. Chen, Jessica McLeod, Narmin Ibrahimova, Andrea Arruda, et al. 2016. « A 17-Gene Stemness Score for Rapid Determination of Risk in Acute Leukaemia ». *Nature* 540 (7633): 433-37. <https://doi.org/10.1038/nature20598>.
- Norde, Wiegert J., Frans Maas, Willemijn Hobo, Alan Korman, Michael Quigley, Michel G.D. Kester, Konnie Hebeda, et al. 2011. « PD-1/PD-L1 Interactions Contribute to Functional T-Cell Impairment in Patients Who Relapse with Cancer After Allogeneic Stem Cell Transplantation ». *Cancer Research* 71 (15): 5111-22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0108>.
- Nurieva, Roza I., Xindong Liu, et Chen Dong. 2011. « Molecular Mechanisms of T-Cell Tolerance: Molecular Mechanisms of T-Cell Tolerance ». *Immunological Reviews* 241 (1): 133-44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01012.x>.
- Oestreich KJ, Yoon H, Ahmed R, Boss JM. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J Immunol*. 2008 Oct 1;181(7):4832-9. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4832. PMID: 18802087; PMCID: PMC2645436.
- Oh-hora, Masatsugu. 2009. « Calcium Signaling in the Development and Function of T-Lineage Cells ». *Immunological Reviews* 231 (1): 210-24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00819.x>.
- Oh-hora, Masatsugu, et Anjana Rao. 2009. « The Calcium/NFAT Pathway: Role in Development and Function of Regulatory T Cells ». *Microbes and Infection* 11 (5): 612-19. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.008>.
- Oh-hora, Masatsugu, Megumi Yamashita, Patrick G Hogan, Sonia Sharma, Ed Lamperti, Woo Chung, Murali Prakriya, Stefan Feske, et Anjana Rao. 2008. « Dual Functions for the Endoplasmic Reticulum Calcium Sensors STIM1 and STIM2 in T Cell Activation and Tolerance ». *Nature Immunology* 9 (4): 432-43. <https://doi.org/10.1038/ni1574>.
- Ommen, Hans Beier, Charlotte Guldborg Nyvold, Karin Brændstrup, Bodil Lind Andersen, Ingrid Beier Ommen, Henrik Hasle, Peter Hokland, et Mette Østergaard. 2008. « Relapse Prediction in Acute Myeloid Leukaemia Patients in Complete Remission Using WT1 as a Molecular Marker: Development of a Mathematical Model to Predict Time from Molecular to

- Clinical Relapse and Define Optimal Sampling Intervals ». *British Journal of Haematology* 141 (6): 782-91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07132.x>.
- Ong, Hwei Ling, Kwong Tai Cheng, Xibao Liu, Bidhan C. Bandyopadhyay, Biman C. Paria, Jonathan Soboloff, Biswaranjan Pani, et al. 2007. « Dynamic Assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 Ternary Complex Is Involved in Store-Operated Calcium Influx ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (12): 9105-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608942200>.
- O'Reilly E, Zeinabad HA, Szegezdi E. Hematopoietic versus leukemic stem cell quiescence: Challenges and therapeutic opportunities. *Blood Rev.* 2021 Nov;50:100850. doi: 10.1016/j.blre.2021.100850. Epub 2021 May 12. PMID: 34049731.
- Osisami, Mary, et Evan Keller. 2013. « Mechanisms of Metastatic Tumor Dormancy ». *Journal of Clinical Medicine* 2 (3): 136-50. <https://doi.org/10.3390/jcm2030136>.
- Ossenkoppele, Gert J., et Gerrit Jan Schuurhuis. 2014. « MRD in AML: It Is Time to Change the Definition of Remission ». *Best Practice & Research Clinical Haematology* 27 (3-4): 265-71. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2014.10.008>.
- Pan, Xiaohui, Run Li, Hongjie Guo, Wenxin Zhang, Xiaqing Xu, Xi Chen, et Ling Ding. 2021. « Dihydropyridine Calcium Channel Blockers Suppress the Transcription of PD-L1 by Inhibiting the Activation of STAT1 ». *Frontiers in Pharmacology* 11 (janvier): 539261. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.539261>.
- Pardoll, Drew M. 2012. « The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy ». *Nature Reviews Cancer* 12 (4): 252-64. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.
- Park, Chan Young, Paul J. Hoover, Franklin M. Mullins, Priti Bachhawat, Elizabeth D. Covington, Stefan Raunser, Thomas Walz, K. Christopher Garcia, Ricardo E. Dolmetsch, et Richard S. Lewis. 2009. « STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1 ». *Cell* 136 (5): 876-90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.014>.
- Parvez, Suhel, Andreas Beck, Christine Peinelt, Jonathan Soboloff, Annette Lis, Mahealani Monteilh-Zoller, Donald L. Gill, Andrea Fleig, et Reinhold Penner. 2008. « STIM2 Protein Mediates Distinct Store-dependent and Store-independent Modes of CRAC Channel Activation ». *The FASEB Journal* 22 (3): 752-61. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9449com>.
- Patel, Jay P., Mithat Gönen, Maria E. Figueroa, Hugo Fernandez, Zhuoxin Sun, Janis Racevskis, Pieter Van Vlierberghe, et al. 2012. « Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia ». *New England Journal of Medicine* 366 (12): 1079-89. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112304>.
- Patron, Maria, Vanessa Checchetto, Anna Raffaello, Enrico Teardo, Denis Vecellio Reane, Maura Mantoan, Veronica Granatiero, Ildikò Szabò, Diego De Stefani, et Rosario Rizzuto. 2014. « MICU1 and MICU2 Finely Tune the Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter by Exerting Opposite Effects on MCU Activity ». *Molecular Cell* 53 (5): 726-37. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.013>.
- Patterson, Shaun D., Xu Huang, Heather G. Jørgensen, and Alison M. Michie. 2021. "Transcriptional Regulation by the NFAT Family in Acute Myeloid Leukaemia" *Hemato* 2, no. 3: 556-571. <https://doi.org/10.3390/hemato2030035>
- Pauken, Kristen E., et E. John Wherry. 2015. « Overcoming T Cell Exhaustion in Infection and Cancer ». *Trends in Immunology* 36 (4): 265-76. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.008>.
- Payne, Kyle K., Rebecca C. Keim, Laura Graham, Michael O. Idowu, Wen Wan, Xiang-Yang Wang, Amir A. Toor, Harry D. Bear, et Masoud H. Manjili. 2016. « Tumor-Reactive Immune Cells Protect against Metastatic Tumor and Induce Immunoediting of Indolent but Not Quiescent Tumor Cells ». *Journal of Leukocyte Biology* 100 (3): 625-35. <https://doi.org/10.1189/jlb.5A1215-580R>.
- Pearce, Erika L., Maya C. Poffenberger, Chih-Hao Chang, et Russell G. Jones. 2013. « Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function ». *Science* 342 (6155): 1242454. <https://doi.org/10.1126/science.1242454>.
- Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013). 2020 Apr 1;103(3):38-40. PMID: 32236160.
- Peng, Stanford L, Andrea J Gerth, Ann M Ranger, et Laurie H Glimcher. 2001. « NFATc1 and NFATc2 Together Control Both T and B Cell Activation and Differentiation ». *Immunity* 14 (1): 13-20. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00085-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00085-1).
- Penna, Aubin, Angelo Demuro, Andriy V. Yeromin, Shenyuan L. Zhang, Olga Safrina, Ian Parker, et Michael D. Cahalan. 2008. « The CRAC Channel Consists of a Tetramer Formed by Stim-Induced Dimerization of Orai Dimers ». *Nature* 456 (7218): 116-20. <https://doi.org/10.1038/nature07338>.
- Pierce GB, Wallace C. Differentiation of malignant to benign cells. *Cancer Res.* 1971 Feb;31(2):127-34. PMID: 5545265.
- Pinto A, Maio M, Attadia V, Zappacosta S, Cimino R. Modulation of HLA-DR antigens expression in human myeloid leukaemia cells by cytarabine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Lancet.* 1984 Oct 13;2(8407):867-8. doi: 10.1016/s0140-6736(84)90900-0. PMID: 6207398.

- Pisco, Angela Oliveira, Amy Brock, Joseph Zhou, Andreas Moor, Mitra Mojtahedi, Dean Jackson, et Sui Huang. 2013. « Non-Darwinian Dynamics in Therapy-Induced Cancer Drug Resistance ». *Nature Communications* 4 (1): 2467. <https://doi.org/10.1038/ncomms3467>.
- Pizzitola, I, F Anjos-Afonso, K Rouault-Pierre, F Lassailly, S Tettamanti, O Spinelli, A Biondi, E Biagi, et D Bonnet. 2014. « Chimeric Antigen Receptors against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in Vivo ». *Leukemia* 28 (8): 1596-1605. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.62>.
- Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, Woods WG, Lange BJ, Sweetser DA, Radich JP, Bernstein ID, Meshinchi S. FLT3 internal tandem duplication in CD34+/CD33- precursors predicts poor outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2764-9. doi: 10.1182/blood-2006-04-012260. Epub 2006 Jun 29. PMID: 16809615; PMCID: PMC1895585.
- Pollyea, Daniel A., et Craig T. Jordan. 2017. « Therapeutic Targeting of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells ». *Blood* 129 (12): 1627-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696039>.
- Pollyea DA, DiNardo CD, Arellano ML, Pigneux A, Fiedler W, Konopleva M, Rizzieri DA, Smith BD, Shinagawa A, Lemoli RM, Dail M, Duan Y, Chyla B, Potturi J, Miller CL, Kantarjian HM. Impact of Venetoclax and Azacitidine in Treatment-Naïve Patients with Acute Myeloid Leukemia and IDH1/2 Mutations. *Clin Cancer Res*. 2022 Jul 1;28(13):2753-2761. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-3467. PMID: 35046058; PMCID: PMC9365354.
- Poole, Andrew, Vijaykumar Karuppiah, Annabelle Hartt, Jaafar N. Haidar, Sylvie Moureau, Tomasz Dobrzycki, Conor Hayes, et al. 2022. « Therapeutic High Affinity T Cell Receptor Targeting a KRASG12D Cancer Neoantigen ». *Nature Communications* 13 (1): 5333. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32811-1>.
- Pores-Fernando, Arun T., et Adam Zweifach. 2009. « Calcium Influx and Signaling in Cytotoxic T-Lymphocyte Lytic Granule Exocytosis ». *Immunological Reviews* 231 (1): 160-73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00809.x>.
- Prakriya, Murali, Stefan Feske, Yousang Gwack, Sonal Srikanth, Anjana Rao, et Patrick G. Hogan. 2006. « Orai1 Is an Essential Pore Subunit of the CRAC Channel ». *Nature* 443 (7108): 230-33. <https://doi.org/10.1038/nature05122>.
- Prakriya M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*. 2015 Oct;95(4):1383-436. doi: 10.1152/physrev.00020.2014. PMID: 26400989; PMCID: PMC4600950.
- Prakriya M, Lewis RS. Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethylidiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors. *J Physiol* 536: 3–19, 2001.
- Prevarskaya, Natalia, Roman Skryma, et Yaroslav Shuba. 2018. « Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? » *Physiological Reviews* 98 (2): 559-621. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>.
- Puissant-Lubrano, Bénédicte, Anne Huynh, Michel Attal, et Antoine Blancher. 2014. « Evolution of Peripheral Blood T Lymphocyte Subsets after Allogenic or Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation ». *Immunobiology* 219 (8): 611-18. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.012>.
- Quintana A, Griesemer D, Schwarz EC, Hoth M. « Calcium-dependent activation of T-lymphocytes ». *Pflugers Arch*. 2005 Apr;450(1):1-12. doi: 10.1007/s00424-004-1364-4. Epub 2004 Nov 26. PMID: 15806400.
- Quintana, Ariel, Carsten Kummerow, Christian Junker, Ute Becherer, et Markus Hoth. 2009. « Morphological Changes of T Cells Following Formation of the Immunological Synapse Modulate Intracellular Calcium Signals ». *Cell Calcium* 45 (2): 109-22. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.07.003>.
- Ramsay, Alan G., Amy J. Johnson, Abigail M. Lee, Güllü Gorgün, Rifca Le Dieu, William Blum, John C. Byrd, et John G. Gribben. 2008. « Chronic Lymphocytic Leukemia T Cells Show Impaired Immunological Synapse Formation That Can Be Reversed with an Immunomodulating Drug ». *Journal of Clinical Investigation*, juin, JCI35017. <https://doi.org/10.1172/JCI35017>.
- Rana, Anshul, Michelle Yen, Amir Masoud Sadaghiani, Seth Malmersjö, Chan Young Park, Ricardo E. Dolmetsch, et Richard S. Lewis. 2015. « Alternative Splicing Converts STIM2 from an Activator to an Inhibitor of Store-Operated Calcium Channels ». *Journal of Cell Biology* 209 (5): 653-70. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412060>.
- Rao, Anjana, Chun Luo, et Patrick G. Hogan. 1997. « TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: Regulation and Function ». *Annual Review of Immunology* 15 (1): 707-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.707>.
- Ravandi, Farhad, Rita Assi, Naval Daver, Christopher B Benton, Tapan Kadia, Philip A Thompson, Gautam Borthakur, et al. 2019. « Idarubicin, Cytarabine, and Nivolumab in Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukaemia or High-Risk Myelodysplastic Syndrome: A Single-Arm, Phase 2 Study ». *The Lancet Haematology* 6 (9): e480-88. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30114-0](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30114-0).
- Michael P Rettig, John Godwin, Norbert Vey, Bernard Fox, Carmen Ballesteros-Merino, Carlo B Bifulco, Daner Li, Daniel Primo, Joan Ballesteros, Jichao Sun, Helene Lelièvre, Jan Baughman, Ross La Motte-Mohs, John Muth, Paul Moore, Ezio

- Bonvini, Jon Wigginton, John F DiPersio, Jan Davidson-Moncada, « Preliminary Translational Results from an Ongoing Phase 1 Study of Flotetuzumab, a CD123 x CD3 Dart®, in AML/MDS: Rationale for Combining Flotetuzumab and Anti-PD-1/PD-L1 Immunotherapies », *Blood*, Volume 130, Supplement 1, 2017, Page 1365, ISSN 0006-4971, https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.1365.1365.
- Reya, Tannishtha, Sean J. Morrison, Michael F. Clarke, et Irving L. Weissman. 2001. « Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells ». *Nature* 414 (6859): 105-11. <https://doi.org/10.1038/35102167>.
- Rhonen, Anna van, Guus A. M. S. van Dongen, Angèle Kelder, Elwin J. Rombouts, Nicole Feller, Bijan Moshaver, Marijke Stigter-van Walsum, Sonja Zweegman, Gert J. Ossenkoppele, et Gerrit Jan Schuurhuis. 2007. « The Novel AML Stem Cell-Associated Antigen CLL-1 Aids in Discrimination between Normal and Leukemic Stem Cells ». *Blood* 110 (7): 2659-66. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-083048>.
- Rhonen, Anna van, Nicole Feller, Angèle Kelder, August H. Westra, Elwin Rombouts, Sonja Zweegman, Marjolein A. van der Pol, Quinten Waisfisz, Gert J. Ossenkoppele, et Gerrit Jan Schuurhuis. 2005. « High Stem Cell Frequency in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis Predicts High Minimal Residual Disease and Poor Survival ». *Clinical Cancer Research* 11 (18): 6520-27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0468>.
- Ritprajak, Patcharee, et Miyuki Azuma. 2015. « Intrinsic and Extrinsic Control of Expression of the Immunoregulatory Molecule PD-L1 in Epithelial Cells and Squamous Cell Carcinoma ». *Oral Oncology* 51 (3): 221-28. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.11.014>.
- Ritter, Alex T., Karen L. Angus, et Gillian M. Griffiths. 2013. « The Role of the Cytoskeleton at the Immunological Synapse ». *Immunological Reviews* 256 (1): 107-17. <https://doi.org/10.1111/imr.12117>.
- Roato, Ilaria, et Riccardo Ferracini. 2018. « Cancer Stem Cells, Bone and Tumor Microenvironment: Key Players in Bone Metastases ». *Cancers* 10 (2): 56. <https://doi.org/10.3390/cancers10020056>.
- Robbs, Bruno K., Andre L. S. Cruz, Miriam B. F. Werneck, Giuliana P. Mognol, et João P. B. Viola. 2008. « Dual Roles for NFAT Transcription Factor Genes as Oncogenes and Tumor Suppressors ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (23): 7168-81. <https://doi.org/10.1128/MCB.00256-08>.
- Robbs, Bruno K., Pedro I. Lucena, et João P.B. Viola. 2013. « The Transcription Factor NFAT1 Induces Apoptosis through Cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK Pathway and Upregulation of TNF- α Expression ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (8): 2016-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.003>.
- Roberts MM, To LB, Gillis D, Mundy J, Rawling C, Ng K, Juttner CA. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1993 Nov;12(5):469-75. PMID: 7905331.
- Roboz, Gail J, et Monica Guzman. 2009. « Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: Seek and Destroy ». *Expert Review of Hematology* 2 (6): 663-72. <https://doi.org/10.1586/ehm.09.53>.
- Roderick, H. Llewelyn, et Simon J. Cook. 2008. « Ca²⁺ Signalling Checkpoints in Cancer: Remodelling Ca²⁺ for Cancer Cell Proliferation and Survival ». *Nature Reviews Cancer* 8 (5): 361-75. <https://doi.org/10.1038/nrc2374>.
- Rodig, Nancy, Timothy Ryan, Jessica A. Allen, Hong Pang, Nir Grabie, Tatyana Chernova, Edward A. Greenfield, et al. 2003. « Endothelial Expression of PD-L1 and PD-L2 down-Regulates CD8⁺ T Cell Activation and Cytolysis ». *European Journal of Immunology* 33 (11): 3117-26. <https://doi.org/10.1002/eji.200324270>.
- Roos, Jack, Paul J. DiGregorio, Andriy V. Yeromin, Kari Ohlsen, Maria Lioudyno, Shenyuan Zhang, Olga Safrina, et al. 2005. « STIM1, an Essential and Conserved Component of Store-Operated Ca²⁺ Channel Function ». *Journal of Cell Biology* 169 (3): 435-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>.
- Ross, K. 2007. « For Organ Transplant Recipients, Cancer Threatens Long-Term Survival ». *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 99 (6): 421-22. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk141>.
- Round, June L, Lisa A Humphries, Tamar Tomassian, Paul Mittelstadt, Min Zhang, et M Carrie Miceli. 2007. « Scaffold Protein Dlg1 Coordinates Alternative P38 Kinase Activation, Directing T Cell Receptor Signals toward NFAT but Not NF- κ B Transcription Factors ». *Nature Immunology* 8 (2): 154-61. <https://doi.org/10.1038/ni1422>.
- Saito, Y., H. Kitamura, A. Hijikata, M. Tomizawa-Murasawa, S. Tanaka, S. Takagi, N. Uchida, et al. 2010. « Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells ». *Science Translational Medicine* 2 (17): 17ra9-17ra9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000349>.
- Saito, Yoriko, Naoyuki Uchida, Satoshi Tanaka, Nahoko Suzuki, Mariko Tomizawa-Murasawa, Akiko Sone, Yuho Najima, et al. 2010. « Induction of Cell Cycle Entry Eliminates Human Leukemia Stem Cells in a Mouse Model of AML ». *Nature Biotechnology* 28 (3): 275-80. <https://doi.org/10.1038/nbt.1607>.

- Samanta, Krishna, Sophie Douglas, et Anant B. Parekh. 2014. « Mitochondrial Calcium Uniporter MCU Supports Cytoplasmic Ca²⁺ Oscillations, Store-Operated Ca²⁺ Entry and Ca²⁺-Dependent Gene Expression in Response to Receptor Stimulation ». Édité par Kevin Currie. *PLoS ONE* 9 (7): e101188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101188>.
- Samelson, Lawrence E. 2002. « Signal Transduction Mediated by the T Cell Antigen Receptor: The Role of Adapter Proteins ». *Annual Review of Immunology* 20 (1): 371-94. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.092601.111357>.
- San Miguel, J.F., A. Martínez, A. Macedo, M.B. Vidriales, C. López-Berges, M. González, D. Caballero, et al. 1997. « Immunophenotyping Investigation of Minimal Residual Disease Is a Useful Approach for Predicting Relapse in Acute Myeloid Leukemia Patients ». *Blood* 90 (6): 2465-70. <https://doi.org/10.1182/blood.V90.6.2465>.
- San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C, Ramos F, Calmuntia MJ, Pérez JJ, González M, Orfao A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1746-51. doi: 10.1182/blood.v98.6.1746. PMID: 11535507.
- Sarry, Jean-Emmanuel, Kathleen Murphy, Robin Perry, Patricia V. Sanchez, Anthony Secreto, Cathy Keefer, Cezary R. Swider, et al. 2011. « Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells Are Rare and Heterogeneous When Assayed in NOD/SCID/IL2R γ -Deficient Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 121 (1): 384-95. <https://doi.org/10.1172/JCI41495>.
- Saudemont, Aurore, et Bruno Quesnel. 2004. « In a Model of Tumor Dormancy, Long-Term Persistent Leukemic Cells Have Increased B7-H1 and B7.1 Expression and Resist CTL-Mediated Lysis ». *Blood* 104 (7): 2124-33. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0064>.
- Schepers, Koen, Timothy B. Campbell, et Emmanuelle Passegué. 2015. « Normal and Leukemic Stem Cell Niches: Insights and Therapeutic Opportunities ». *Cell Stem Cell* 16 (3): 254-67. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.014>.
- Schietinger, Andrea, et Philip D. Greenberg. 2014. « Tolerance and Exhaustion: Defining Mechanisms of T Cell Dysfunction ». *Trends in Immunology* 35 (2): 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.001>.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25. PMID: 747780.
- Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné MC, Buccisano F, Cloos J, Grimwade D, Haferlach T, Hills RK, Hourigan CS, Jorgensen JL, Kern W, Lacombe F, Maurillo L, Preudhomme C, van der Reijden BA, Thiede C, Venditti A, Vyas P, Wood BL, Walter RB, Döhner K, Roboz GJ, Ossenkoppele GJ. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018 Mar 22;131(12):1275-1291. doi: 10.1182/blood-2017-09-801498. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29330221; PMCID: PMC5865231.
- Schurich, Anna, Laura J. Pallett, Danyal Jajbhay, Jessica Wijngaarden, Itziar Otano, Upkar S. Gill, Navjyot Hansi, et al. 2016. « Distinct Metabolic Requirements of Exhausted and Functional Virus-Specific CD8 T Cells in the Same Host ». *Cell Reports* 16 (5): 1243-52. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.078>.
- Schwarz, Eva C., Carsten Kummerow, Anna S. Wenning, Kerstin Wagner, Anne Sappok, Katherina Wagershauser, Désirée Griesemer, et al. 2007. « Calcium Dependence of T Cell Proliferation Following Focal Stimulation ». *European Journal of Immunology* 37 (10): 2723-33. <https://doi.org/10.1002/eji.200737039>.
- Schwinger, Wolfgang, Daniela Weber-Mzell, Birgit Zois, Tanja Rojacher, Martin Benesch, Herwig Lackner, Hans Juergen Dornbusch, et al. 2006. « Immune Reconstitution after Purified Autologous and Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation Compared with Unmanipulated Bone Marrow Transplantation in Children ». *British Journal of Haematology* 135 (1): 76-84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06244.x>.
- Sehgal, Alison, Theresa L Whiteside, et Michael Boyiadzis. 2015. « Programmed Death-1 Checkpoint Blockade in Acute Myeloid Leukemia ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 15 (8): 1191-1203. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1051028>.
- Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 20;1498(1):1-18. doi: 10.1016/s0167-4889(00)00082-3. PMID: 11042346.
- Shaik, Faruk Azam, Clara Lewuillon, Aurélie Guillemette, Bahram Ahmadian, Carine Brinster, Bruno Quesnel, Dominique Collard, Yasmine Touil, Loïc Lemonnier, et Mehmet Cagatay Tarhan. 2022. « Pairing Cells of Different Sizes in a Microfluidic Device for Immunological Synapse Monitoring ». *Lab on a Chip* 22 (5): 908-20. <https://doi.org/10.1039/D1LC01156A>.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107-11. doi: 10.1038/35074122. PMID: 11323675.
- Shao, Mi, Xinyi Teng, Xin Guo, Hao Zhang, Yue Huang, Jiazhen Cui, Xiaohui Si, et al. 2022. « Inhibition of Calcium

- Signaling Prevents Exhaustion and Enhances Anti-Leukemia Efficacy of CAR-T Cells via SOCE-Calcineurin-NFAT and Glycolysis Pathways ». *Advanced Science* 9 (9): 2103508. <https://doi.org/10.1002/adv.202103508>.
- Sharma, Padmanee, et James P. Allison. 2015. « The Future of Immune Checkpoint Therapy ». *Science* 348 (6230): 56-61. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8172>.
- Sharom, Frances J. 2011. « The P-Glycoprotein Multidrug Transporter ». Édité par Frances J. Sharom. *Essays in Biochemistry* 50 (septembre): 161-78. <https://doi.org/10.1042/bse0500161>.
- Shen, Shensi, Stéphan Vagner, et Caroline Robert. 2020. « Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors ». *Cell* 183 (4): 860-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.027>.
- Shiozawa, Yusuke, Aaron M. Havens, Younghun Jung, Anne M. Ziegler, Elisabeth A. Pedersen, Jingcheng Wang, Jianhua Wang, et al. 2008. « Annexin II/Annexin II Receptor Axis Regulates Adhesion, Migration, Homing, and Growth of Prostate Cancer ». *Journal of Cellular Biochemistry* 105 (2): 370-80. <https://doi.org/10.1002/jcb.21835>.
- Shlush, Liran I., Amanda Mitchell, Lawrence Heisler, Sagi Abelson, Stanley W. K. Ng, Aaron Trotman-Grant, Jessie J. F. Medeiros, et al. 2017. « Tracing the Origins of Relapse in Acute Myeloid Leukaemia to Stem Cells ». *Nature* 547 (7661): 104-8. <https://doi.org/10.1038/nature22993>.
- Shlush, Liran I., Sasan Zandi, Amanda Mitchell, Weihsu Claire Chen, Joseph M. Brandwein, Vikas Gupta, James A. Kennedy, et al. 2014. « Identification of Pre-Leukaemic Haematopoietic Stem Cells in Acute Leukaemia ». *Nature* 506 (7488): 328-33. <https://doi.org/10.1038/nature13038>.
- Short, Nicholas J, Michael E Rytting, et Jorge E Cortes. 2018. « Acute Myeloid Leukaemia ». *The Lancet* 392 (10147): 593-606. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31041-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31041-9).
- Sim, Malcolm J. W., Jinghua Lu, Matthew Spencer, Francis Hopkins, Eric Tran, Steven A. Rosenberg, Eric O. Long, et Peter D. Sun. 2020. « High-Affinity Oligoclonal TCRs Define Effective Adoptive T Cell Therapy Targeting Mutant KRAS-G12D ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (23): 12826-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921964117>.
- Smith-Garvin, Jennifer E., Gary A. Koretzky, et Martha S. Jordan. 2009. « T Cell Activation ». *Annual Review of Immunology* 27 (1): 591-619. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132706>.
- Soboloff, Jonathan, Maria A. Spassova, Thamara Hewavitharana, Li-Ping He, Wen Xu, Lorna S. Johnstone, Marie A. Dziadek, et Donald L. Gill. 2006. « STIM2 Is an Inhibitor of STIM1-Mediated Store-Operated Ca²⁺ Entry ». *Current Biology* 16 (14): 1465-70. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.051>.
- Soboloff, Jonathan, Maria A. Spassova, Xiang D. Tang, Thamara Hewavitharana, Wen Xu, et Donald L. Gill. 2006. « Orai1 and STIM Reconstitute Store-Operated Calcium Channel Function ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (30): 20661-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600126200>.
- Sosa, Maria Soledad, Alvaro Avivar-Valderas, Paloma Bragado, Huei-Chi Wen, et Julio A. Aguirre-Ghiso. 2011. « ERK1/2 and P38 α / β Signaling in Tumor Cell Quiescence: Opportunities to Control Dormant Residual Disease ». *Clinical Cancer Research* 17 (18): 5850-57. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2574>.
- Sosa, María Soledad, Paloma Bragado, et Julio A. Aguirre-Ghiso. 2014. « Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field ». *Nature Reviews Cancer* 14 (9): 611-22. <https://doi.org/10.1038/nrc3793>.
- Sperr, Wolfgang R, Stefan Florian, Alexander W Hauswirth, et Peter Valent. 2005. « CD33 as a Target of Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Perspectives ». *Leukemia & Lymphoma* 46 (8): 1115-20. <https://doi.org/10.1080/10428190500126075>.
- Spradling, Allan, Daniela Drummond-Barbosa, et Toshie Kai. 2001. « Stem Cells Find Their Niche ». *Nature* 414 (6859): 98-104. <https://doi.org/10.1038/35102160>.
- Srinivasan, Mathangi, et Kenneth A. Frauwirth. 2007. « Reciprocal NFAT1 and NFAT2 Nuclear Localization in CD8+ Anergic T Cells Is Regulated by Suboptimal Calcium Signaling ». *The Journal of Immunology* 179 (6): 3734-41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3734>.
- Staron, Matthew M., Simon M. Gray, Heather D. Marshall, Ian A. Parish, Jonathan H. Chen, Curtis J. Perry, Guoliang Cui, Ming O. Li, et Susan M. Kaech. 2014. « The Transcription Factor FoxO1 Sustains Expression of the Inhibitory Receptor PD-1 and Survival of Antiviral CD8+ T Cells during Chronic Infection ». *Immunity* 41 (5): 802-14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.013>.
- Stathopoulos, Peter B., Le Zheng, Guang-Yao Li, Michael J. Plevin, et Mitsuhiro Ikura. 2008. « Structural and Mechanistic Insights into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry ». *Cell* 135 (1): 110-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.006>.

Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, Stone RM, DeAngelo DJ, Levine RL, Flinn IW, Kantarjian HM, Collins R, Patel MR, Frankel AE, Stein A, Sekeres MA, Swords RT, Medeiros BC, Willekens C, Vyas P, Tosolini A, Xu Q, Knight RD, Yen KE, Agresta S, de Botton S, Tallman MS. Enasidenib in mutant *IDH2* relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017 Aug 10;130(6):722-731. doi: 10.1182/blood-2017-04-779405. Epub 2017 Jun 6. PMID: 28588020; PMCID: PMC5572791.

Stinchcombe, Jane C., Giovanna Bossi, Sarah Booth, et Gillian M. Griffiths. 2001. « The Immunological Synapse of CTL Contains a Secretory Domain and Membrane Bridges ». *Immunity* 15 (5): 751-61. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00234-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00234-5).

Stinchcombe, Jane C., et Gillian M. Griffiths. 2014. « Communication, the Centrosome and the Immunological Synapse ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1650): 20130463. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0463>.

Stinchcombe, Jane C., Endre Majorovits, Giovanna Bossi, Stephen Fuller, et Gillian M. Griffiths. 2006. « Centrosome Polarization Delivers Secretory Granules to the Immunological Synapse ». *Nature* 443 (7110): 462-65. <https://doi.org/10.1038/nature05071>.

Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):192-7. doi: 10.1182/blood.v97.1.192. PMID: 11133760.

Street, Shayna E.A., Joseph A. Trapani, Duncan MacGregor, et Mark J. Smyth. 2002. « Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon γ ». *Journal of Experimental Medicine* 196 (1): 129-34. <https://doi.org/10.1084/jem.20020063>.

Sun, Hui, Yi Li, Zhi-fen Zhang, Ying Ju, Li Li, Bing-chang Zhang, et Bin Liu. 2015. « Increase in Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) Associated with Minimal Residual Disease (MRD) Detection in Adult Acute Myeloid Leukemia ». *International Journal of Hematology* 102 (5): 579-86. <https://doi.org/10.1007/s12185-015-1865-2>.

Sunshine, Joel, et Janis M Taube. 2015. « PD-1/PD-L1 Inhibitors ». *Current Opinion in Pharmacology* 23 (août): 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.011>.

Sutton, Vivien R., Joanne E. Davis, Michael Cancilla, Ricky W. Johnstone, Astrid A. Ruefli, Karin Sedelies, Kylie A. Browne, et Joseph A. Trapani. 2000. « Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B-Mediated Caspase Activation ». *Journal of Experimental Medicine* 192 (10): 1403-14. <https://doi.org/10.1084/jem.192.10.1403>.

Sutton, Vivien R, Michelle E Wowk, Michael Cancilla, et Joseph A Trapani. 2003. « Caspase Activation by Granzyme B Is Indirect, and Caspase Autoprocessing Requires the Release of Proapoptotic Mitochondrial Factors ». *Immunity* 18 (3): 319-29. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00050-5).

Szczepanski, Miroslaw J., Marta Szajnik, Malgorzata Czystowska, Magis Mandapathil, Laura Strauss, Ann Welsh, Kenneth A. Foon, Theresa L. Whiteside, et Michael Boyiadzis. 2009. « Increased Frequency and Suppression by Regulatory T Cells in Patients with Acute Myelogenous Leukemia ». *Clinical Cancer Research* 15 (10): 3325-32. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3010>.

Takezawa R, Cheng H, Beck A, Ishikawa J, Launay P, Kubota H, Kinet JP, Fleig A, Yamada T, Penner R. A pyrazole derivative potently inhibits lymphocyte Ca^{2+} influx and cytokine production by facilitating transient receptor potential melastatin 4 channel activity. *Mol Pharmacol* 69: 1413–1420, 2006.

Takubo, Keiyo, Nobuhito Goda, Wakako Yamada, Hirono Iriuchishima, Eiji Ikeda, Yoshiaki Kubota, Haruko Shima, et al. 2010. « Regulation of the HIF-1 α Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 7 (3): 391-402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020>.

Tan, Jiaxiong, Shaohua Chen, Yuhong Lu, Danlin Yao, Ling Xu, Yikai Zhang, Lijian Yang, et al. 2017. « Higher PD-1 Expression Concurrent with Exhausted CD8 $^{+}$ T Cells in Patients with de Novo Acute Myeloid Leukemia ». *Chinese Journal of Cancer Research* 29 (5): 463-70. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2017.05.11>.

The Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. « Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia ». *New England Journal of Medicine* 368 (22): 2059-74. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689>.

Thomas, Daniel, et Ravindra Majeti. 2017. « Biology and Relevance of Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells ». *Blood* 129 (12): 1577-85. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696054>.

Thorén, Lina A., Karina Liuba, David Bryder, Jens M. Nygren, Christina T. Jensen, Hong Qian, Jennifer Antonchuk, et Sten-Eirik W. Jacobsen. 2008. « Kit Regulates Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells ». *The Journal of Immunology* 180 (4): 2045-53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2045>.

Toffalori, Cristina, Laura Zito, Valentina Gambacorta, Michela Riba, Giacomo Oliveira, Gabriele Bucci, Matteo Barcella, et al. 2019. « Immune Signature Drives Leukemia Escape and Relapse after Hematopoietic Cell Transplantation ». *Nature*

Medicine 25 (4): 603-11. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0400-z>.

Toledo-Guzmán, Mariel E, Gabriele D Bigoni-Ordóñez, Miguel Ibáñez Hernández, et Elizabeth Ortiz-Sánchez. 2018. « Cancer Stem Cell Impact on Clinical Oncology ». *World Journal of Stem Cells* 10 (12): 183-95. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i12.183>.

Tothova, Zuzana, Ramya Kollipara, Brian J. Huntly, Benjamin H. Lee, Diego H. Castrillon, Dana E. Cullen, Elizabeth P. McDowell, et al. 2007. « FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress ». *Cell* 128 (2): 325-39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.003>.

Touil, Yasmine, Thomas Zuliani, Isabelle Wolowczuk, Klaudia Kuranda, Jirina Prochazkova, Joris Andrieux, Helene Le Roy, et al. 2013. « The PI3K/AKT Signaling Pathway Controls the Quiescence of the Low-Rhodamine123-Retention Cell Compartment Enriched for Melanoma Stem Cell Activity ». *STEM CELLS* 31 (4): 641-51. <https://doi.org/10.1002/stem.1333>.

Tumelty, James, Norman Scholfield, Michael Stewart, Tim Curtis, et Graham McGeown. 2007. « Ca²⁺-Sparks Constitute Elementary Building Blocks for Global Ca²⁺-Signals in Myocytes of Retinal Arterioles ». *Cell Calcium* 41 (5): 451-66. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.005>.

Tyner, Jeffrey W., Cristina E. Tognon, Daniel Bottomly, Beth Wilmot, Stephen E. Kurtz, Samantha L. Savage, Nicola Long, et al. 2018. « Functional Genomic Landscape of Acute Myeloid Leukaemia ». *Nature* 562 (7728): 526-31. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0623-z>.

Umemura, Masanari, Erdene Baljinnyam, Stefan Feske, Mariana S. De Lorenzo, Lai-Hua Xie, Xianfeng Feng, Kayoko Oda, et al. 2014. « Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Regulates Melanoma Proliferation and Cell Migration ». Édité par Laszlo Csernoch. *PLoS ONE* 9 (2): e89292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089292>.

Urbán N, Cheung TH. Stem cell quiescence: the challenging path to activation. *Development*. 2021 Feb 8;148(3):dev165084. doi: 10.1242/dev.165084. PMID: 33558315; PMCID: PMC7888710.

Ustun, Celalettin, Jeffrey S. Miller, David H. Munn, Daniel J. Weisdorf, et Bruce R. Blazar. 2011. « Regulatory T Cells in Acute Myelogenous Leukemia: Is It Time for Immunomodulation? » *Blood* 118 (19): 5084-95. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365817>.

Vaeth M, Yang J, Yamashita M, Zee I, Eckstein M, Knosp C, Kaufmann U, Karoly Jani P, Lacruz RS, Flockerzi V, Kacs Kovics I, Prakriya M, Feske S. ORAI2 modulates store-operated calcium entry and T cell-mediated immunity. *Nat Commun*. 2017 Mar 15;8:14714. doi: 10.1038/ncomms14714. PMID: 28294127; PMCID: PMC5355949.

van Velthoven CTJ, Rando TA. Stem Cell Quiescence: Dynamism, Restraint, and Cellular Idling. *Cell Stem Cell*. 2019 Feb 7;24(2):213-225. doi: 10.1016/j.stem.2019.01.001. PMID: 30735649; PMCID: PMC6413865.

Vanoverberghe K, Vanden Abeele F, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ*. 2004 Mar;11(3):321-30. doi: 10.1038/sj.cdd.4401375. PMID: 14685164.

Vardiman, James W., Jürgen Thiele, Daniel A. Arber, Richard D. Brunning, Michael J. Borowitz, Anna Porwit, Nancy Lee Harris, et al. 2009. « The 2008 Revision of the World Health Organization (WHO) Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Rationale and Important Changes ». *Blood* 114 (5): 937-51. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>.

Vihma, Hanna, Priit Pruunsild, et Tõnis Timmusk. 2008. « Alternative Splicing and Expression of Human and Mouse NFAT Genes ». *Genomics* 92 (5): 279-91. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.06.011>.

Visnjic, Dora, Zana Kalajzic, David W. Rowe, Vedran Katavic, Joseph Lorenzo, et Hector L. Aguila. 2004. « Hematopoiesis Is Severely Altered in Mice with an Induced Osteoblast Deficiency ». *Blood* 103 (9): 3258-64. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-4011>.

Wang, Hai, Cuijuan Yu, Xia Gao, Thomas Welte, Aaron M. Muscarella, Lin Tian, Hong Zhao, et al. 2015. « The Osteogenic Niche Promotes Early-Stage Bone Colonization of Disseminated Breast Cancer Cells ». *Cancer Cell* 27 (2): 193-210. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.017>.

Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, Bładuszyn AR, Yevsa T, Fricke S, Kossatz-Boehler U. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol*. 2020 Aug 7;11:1280. doi: 10.3389/fimmu.2020.01280. PMID: 32849491; PMCID: PMC7426526.

Waldherr L, Tiffner A, Mishra D, Sallinger M, Schober R, Frischau I, Schmidt T, Handl V, Sagmeister P, Köckinger M, Derler I, Üçal M, Bonhenry D, Patz S, Schindl R. Blockage of Store-Operated Ca²⁺ Influx by Synta66 is Mediated by Direct Inhibition of the Ca²⁺ Selective Orai1 Pore. *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 6;12(10):2876. doi: 10.3390/cancers12102876. PMID: 33036292; PMCID: PMC7600887.

- Wang, Mengjie, Jin Bu, Maohua Zhou, Jessica Sido, Yu Lin, Guanfang Liu, Qiwen Lin, Xiuzhang Xu, Jianmei W. Leavenworth, et Erxia Shen. 2018. « CD8 + T Cells Expressing Both PD-1 and TIGIT but Not CD226 Are Dysfunctional in Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients ». *Clinical Immunology* 190 (mai): 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.08.021>.
- Wang, Ruoning, et Douglas R Green. 2012. « Metabolic Checkpoints in Activated T Cells ». *Nature Immunology* 13 (10): 907-15. <https://doi.org/10.1038/ni.2386>.
- Wee, Shimei, Maria Niklasson, Voichita Dana Marinescu, Anna Segerman, Linnéa Schmidt, Annika Hermansson, Peter Dirks, et al. 2014. « Selective Calcium Sensitivity in Immature Glioma Cancer Stem Cells ». Édité par Alfredo Quinones-Hinojosa. *PLoS ONE* 9 (12): e115698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115698>.
- Wei, F., S. Zhong, Z. Ma, H. Kong, A. Medvec, R. Ahmed, G. J. Freeman, M. Krogsaard, et J. L. Riley. 2013. « Strength of PD-1 Signaling Differentially Affects T-Cell Effector Functions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (27): E2480-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305394110>.
- Weigelin, Bettina, Annemieke Th. den Boer, Esther Wagena, Kelly Broen, Harry Dolstra, Rob J. de Boer, Carl G. Figdor, Johannes Textor, et Peter Friedl. 2021. « Cytotoxic T Cells Are Able to Efficiently Eliminate Cancer Cells by Additive Cytotoxicity ». *Nature Communications* 12 (1): 5217. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25282-3>.
- Wetzel, Scott A., Timothy W. McKeithan, et David C. Parker. 2002. « Live-Cell Dynamics and the Role of Costimulation in Immunological Synapse Formation ». *The Journal of Immunology* 169 (11): 6092-6101. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6092>.
- Wherry, E John. 2011. « T Cell Exhaustion ». *Nature Immunology* 12 (6): 492-99. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>.
- Wherry, E. John, et Makoto Kurachi. 2015. « Molecular and Cellular Insights into T Cell Exhaustion ». *Nature Reviews Immunology* 15 (8): 486-99. <https://doi.org/10.1038/nri3862>.
- Williams, Patrick, Sreyashi Basu, Guillermo Garcia-Manero, Christopher S. Hourigan, Karolyn A. Oetjen, Jorge E. Cortes, Farhad Ravandi, et al. 2019. « The Distribution of T-cell Subsets and the Expression of Immune Checkpoint Receptors and Ligands in Patients with Newly Diagnosed and Relapsed Acute Myeloid Leukemia ». *Cancer* 125 (9): 1470-81. <https://doi.org/10.1002/cncr.31896>.
- Wilson, Anne, et Andreas Trumpp. 2006. « Bone-Marrow Haematopoietic-Stem-Cell Niches ». *Nature Reviews Immunology* 6 (2): 93-106. <https://doi.org/10.1038/nri1779>.
- Wu, Hai, Alys Peisley, Isabella A. Graef, et Gerald R. Crabtree. 2007. « NFAT Signaling and the Invention of Vertebrates ». *Trends in Cell Biology* 17 (6): 251-60. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.04.006>.
- Wu, Ling, Weihao Lin, Qing Liao, Hui Wang, Chuang Lin, Lihua Tang, Weidong Lian, et al. 2020. « Calcium Channel Blocker Nifedipine Suppresses Colorectal Cancer Progression and Immune Escape by Preventing NFAT2 Nuclear Translocation ». *Cell Reports* 33 (4): 108327. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108327>.
- Wu, Yanheng, Mingshui Chen, Peihong Wu, Chen Chen, Zhi Ping Xu, et Wenyi Gu. 2017. « Increased PD-L1 Expression in Breast and Colon Cancer Stem Cells ». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 44 (5): 602-4. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12732>.
- Xie, Jiansheng, Hongming Pan, Junlin Yao, Yubin Zhou, et Weidong Han. 2016. « SOCE and Cancer: Recent Progress and New Perspectives ». *International Journal of Cancer* 138 (9): 2067-77. <https://doi.org/10.1002/ijc.29840>.
- Xu, Jin-Mei, Yan Zhou, Long Gao, Shu-Xian Zhou, Wei-Hua Liu, et Xiao-An Li. 2016. « Stromal Interaction Molecule 1 Plays an Important Role in Gastric Cancer Progression ». *Oncology Reports* 35 (6): 3496-3504. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4704>.
- Yamauchi. 2011. « Characterization of Cytarabine-Resistant Leukemic Cell Lines Established from Five Different Blood Cell Lineages Using Gene Expression and Proteomic Analyses ». *International Journal of Oncology* 38 (4). <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.933>.
- Yang, H, C Bueso-Ramos, C DiNardo, M R Estecio, M Davanlou, Q-R Geng, Z Fang, et al. 2014. « Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in Myelodysplastic Syndromes Is Enhanced by Treatment with Hypomethylating Agents ». *Leukemia* 28 (6): 1280-88. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.355>.
- Yeromin, Andriy V., Shenyuan L. Zhang, Weihua Jiang, Ying Yu, Olga Safrina, et Michael D. Cahalan. 2006. « Molecular Identification of the CRAC Channel by Altered Ion Selectivity in a Mutant of Orai ». *Nature* 443 (7108): 226-29. <https://doi.org/10.1038/nature05108>.
- Yokosuka, Tadashi, et Takashi Saito. 2009. « Dynamic Regulation of T-Cell Costimulation through TCR-CD28 Microclusters ». *Immunological Reviews* 229 (1): 27-40. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00779.x>.

- Yokosuka, Tadashi, Masako Takamatsu, Wakana Kobayashi-Imanishi, Akiko Hashimoto-Tane, Miyuki Azuma, et Takashi Saito. 2012. « Programmed Cell Death 1 Forms Negative Costimulatory Microclusters That Directly Inhibit T Cell Receptor Signaling by Recruiting Phosphatase SHP2 ». *The Journal of Experimental Medicine* 209 (6): 1201-17. <https://doi.org/10.1084/jem.20112741>.
- Young, Andrew L., Grant A. Challen, Brenda M. Birmann, et Todd E. Druley. 2016. « Clonal Haematopoiesis Harbours AML-Associated Mutations Is Ubiquitous in Healthy Adults ». *Nature Communications* 7 (1): 12484. <https://doi.org/10.1038/ncomms12484>.
- Yoyen-Ermis, Digidem, Gurcan Tunali, Ece Tavukcuoglu, Utku Horzum, Didem Ozkazanc, Tolga Sutlu, Yahya Buyukasik, et Gunes Esendagli. 2019. « Myeloid Maturation Potentiates STAT3-Mediated Atypical IFN- γ Signaling and Upregulation of PD-1 Ligands in AML and MDS ». *Scientific Reports* 9 (1): 11697. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48256-4>.
- Zajac, Malgorzata, Joanna Zaleska, Anna Dolnik, Lars Bullinger, et Krzysztof Giannopoulos. 2018. « Expression of CD 274 (PD -L1) Is Associated with Unfavourable Recurrent Mutations in AML ». *British Journal of Haematology* 183 (5): 822-25. <https://doi.org/10.1111/bjh.15040>.
- Amer M. Zeidan, James Cavenagh, Maria Teresa Voso, David Taussig, Mar Tormo, Isaac Boss, Wilbert B. Copeland, Vanessa E. Gray, Alessandro Previtalli, Tim O'Connor, Shelonita Rose, CL Beach, Lewis R. Silverman; Efficacy and Safety of Azacitidine (AZA) in Combination with the Anti-PD-L1 Durvalumab (durva) for the Front-Line Treatment of Older Patients (pts) with Acute Myeloid Leukemia (AML) Who Are Unfit for Intensive Chemotherapy (IC) and Pts with Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes (HR-MDS): Results from a Large, International, Randomized Phase 2 Study. *Blood* 2019; 134 (Supplement_1): 829. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2019-122896>
- Zeijlemaker, Wendelien, Angele Kelder, Jacqueline Cloos, et Gerrit Jan Schuurhuis. 2019. « Immunophenotypic Detection of Measurable Residual (Stem Cell) Disease Using LAIP Approach in Acute Myeloid Leukemia ». *Current Protocols in Cytometry* 91 (1). <https://doi.org/10.1002/cpcy.66>.
- Zeiser, Robert, et Luca Vago. 2019. « Mechanisms of Immune Escape after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation ». *Blood* 133 (12): 1290-97. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-846824>.
- Zhan ZY, Zhong LX, Feng M, Wang JF, Liu DB, Xiong JP. Over-expression of Orai1 mediates cell proliferation and associates with poor prognosis in human non-small cell lung carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 May 1;8(5):5080-8. PMID: 26191202; PMCID: PMC4503074.
- Zhang SL, Kozak JA, Jiang W, Yeromin AV, Chen J, Yu Y, Penna A, Shen W, Chi V, Cahalan MD. Store-dependent and -independent modes regulating Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity of human Orai1 and Orai3. *J Biol Chem*. 2008 Jun 20;283(25):17662-71. doi: 10.1074/jbc.M801536200. Epub 2008 Apr 17. PMID: 18420579; PMCID: PMC2427323.
- Zhang, Jiwang, Chao Niu, Ling Ye, Haiyang Huang, Xi He, Wei-Gang Tong, Jason Ross, et al. 2003. « Identification of the Haematopoietic Stem Cell Niche and Control of the Niche Size ». *Nature* 425 (6960): 836-41. <https://doi.org/10.1038/nature02041>.
- Zhang, Shenyuan L., Ying Yu, Jack Roos, J. Ashot Kozak, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, Kenneth A. Stauderman, et Michael D. Cahalan. 2005. « STIM1 Is a Ca²⁺ Sensor That Activates CRAC Channels and Migrates from the Ca²⁺ Store to the Plasma Membrane ». *Nature* 437 (7060): 902-5. <https://doi.org/10.1038/nature04147>.
- Zhang, Z, X Liu, B Feng, N Liu, Q Wu, Y Han, Y Nie, K Wu, Y Shi, et D Fan. 2015. « STIM1, a Direct Target of MicroRNA-185, Promotes Tumor Metastasis and Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer ». *Oncogene* 34 (37): 4808-20. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.404>.
- Zhang, Zhixiong, Yu-Chih Chen, Yu-Heng Cheng, Yi Luan, et Euisik Yoon. 2016. « Microfluidics 3D Gel-Island Chip for Single Cell Isolation and Lineage-Dependent Drug Responses Study ». *Lab on a Chip* 16 (13): 2504-12. <https://doi.org/10.1039/C6LC00081A>.
- Zhou, Qing, Meghan E. Munger, Steven L. Highfill, Jakub Tolar, Brenda J. Weigel, Megan Riddle, Arlene H. Sharpe, et al. 2010. « Program Death-1 Signaling and Regulatory T Cells Collaborate to Resist the Function of Adoptively Transferred Cytotoxic T Lymphocytes in Advanced Acute Myeloid Leukemia ». *Blood* 116 (14): 2484-93. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275446>.
- Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, Weigel BJ, Hirashima M, Munn DH, Murphy WJ, Azuma M, Anderson AC, Kuchroo VK, Blazar BR. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8⁺ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2011 Apr 28;117(17):4501-10. doi: 10.1182/blood-2010-10-310425. Epub 2011 Mar 8. PMID: 21385853; PMCID: PMC3099570.
- Zhou, Xiao, Kim S. Friedmann, H el ene Lyrmann, Yan Zhou, Rouven Schoppmeyer, Arne Kn orck, Sebastian Mang, et al. 2018. « A Calcium Optimum for Cytotoxic T Lymphocyte and Natural Killer Cell Cytotoxicity: A Calcium Optimum for CTL and NK Cell Cytotoxicity ». *The Journal of Physiology* 596 (14): 2681-98. <https://doi.org/10.1113/JP274964>.

Zhou, Yandong, Salvatore Mancarella, Youjun Wang, Chanyu Yue, Michael Ritchie, Donald L. Gill, et Jonathan Soboloff. 2009. « The Short N-Terminal Domains of STIM1 and STIM2 Control the Activation Kinetics of Orai1 Channels ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (29): 19164-68. <https://doi.org/10.1074/jbc.C109.010900>.

Zhu, Hua, Hui Zhang, Feng Jin, Mingzhu Fang, Mark Huang, Chung S. Yang, Tong Chen, Liwu Fu, et Zui Pan. 2014. « Elevated Orai1 Expression Mediates Tumor-Promoting Intracellular Ca²⁺ Oscillations in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma ». *Oncotarget* 5 (11): 3455-71. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1903>.

Zinselmeyer, Bernd H., Sara Heydari, Catarina Sacristán, Debasis Nayak, Michael Cammer, Jasmin Herz, Xiaoxiao Cheng, Simon J. Davis, Michael L. Dustin, et Dorian B. McGavern. 2013. « PD-1 Promotes Immune Exhaustion by Inducing Antiviral T Cell Motility Paralysis ». *Journal of Experimental Medicine* 210 (4): 757-74. <https://doi.org/10.1084/jem.20121416>.

Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, Hoth M. Potent inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *J Biol Chem* 279: 12427–12437, 2004.

Zeichner SB, Arellano ML. Secondary Adult Acute Myeloid Leukemia: a Review of Our Evolving Understanding of a Complex Disease Process. *Curr Treat Options Oncol*. 2015 Aug;16(8):37. doi: 10.1007/s11864-015-0355-3. PMID: 26143266.