



HAL
open science

Dérégulation de l'hétérochromatine et des rétro-éléments dans les cellules souches hématopoïétiques avec l'âge : conséquences et applications potentielles pour le traitement de la leucémie myélomonocytaire chronique

Donia Hidaoui

► To cite this version:

Donia Hidaoui. Dérégulation de l'hétérochromatine et des rétro-éléments dans les cellules souches hématopoïétiques avec l'âge : conséquences et applications potentielles pour le traitement de la leucémie myélomonocytaire chronique. Cancer. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UP-ASL071 . tel-04538106

HAL Id: tel-04538106

<https://theses.hal.science/tel-04538106>

Submitted on 9 Apr 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.

Dérégulation de l'hétérochromatine et des rétro-
éléments dans les cellules souches hématopoïétiques
avec l'âge :
Conséquences et applications potentielles pour le traitement
de la leucémie myélomonocytaire chronique

*Deregulation of heterochromatin and retroelements in hematopoietic
stem cells with age :
Implications and potential applications for the treatment of chronic
myelomonocytic leukemia*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582, Cancérologie : biologie – médecine -santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Science de la vie et santé
Graduate School : Life Sciences and health
Référent : Faculté de Médecine

Mention de l'unité de recherche : Cellules souches hématopoïétiques et
développement des hémopathies myéloïdes
(*Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, INSERM*),
sous la direction de **Françoise PORTEU**, directrice de recherche.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 29 novembre 2022, par

Donia HIDAOU

Composition du Jury

Jean SOULIER PU-PH, Université Paris	Président
Raphaël ITZYKSON PU-PH, Université Paris	Rapporteur et examinateur
Elina ZUEVA Ingénieur de recherche, Université Paris Sciences et Lettres – U932	Rapportrice et examinatrice
David GARRICK Chargé de recherche, Université Paris – INSERM U976	Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, le Dr Elina Zueva et le Pr Raphaël Itzykson, d'avoir accepté d'être rapporteurs, Pr Jean Soulier et Dr David Garrick d'être examinateurs à cette thèse. Je les remercie également pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture, à l'évaluation de ma thèse et de participer à ma soutenance.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon comité de suivi de thèse Dr Estelle Duprez, Dr Claire Francastel, Dr Thierry Heidmann, Pr Sophie Postel-Vinay, de m'avoir donnée de précieux conseils pour mener à bien cette thèse.

Je remercie l'Ecole Doctorale de Cancérologie Paris-Saclay de m'avoir accordée une bourse pour les trois premières années de ma thèse, ainsi que la Société Française d'Hématologie et également le Dr Eric Solary, pour avoir financé ma dernière année thèse.

Je souhaite remercier les patients qui acceptent d'être prélevés afin de nous fournir du matériel biologique et également au Groupe Francophone des Myélodysplasies qui nous transmette les échantillons de patients.

Je tiens à remercier Françoise Porteu, pour sa confiance, ses conseils, ses enseignements. Tu m'as accueillie dans ton laboratoire durant mon stage de M2 et guidée jusqu'à la fin de ma thèse. Je te suis très reconnaissante de la manière dont tu m'as formée durant tout le long de ce projet de thèse.

J'adresse mes remerciements à nos collaborateurs qui ont contribué aux analyses bioinformatiques, Rabie Chelbi, Vincent Alcazer et Stephane Depil.

Je remercie également les différentes plateformes de l'IGR qui ont participé à ce projet, la plateforme d'Imagerie et de Cytométrie avec Cyril, Phillipe, Yann et Tudor, la plateforme Génomique avec Nathalie Droin, Audrey, Maëla et Marie et également la plateforme animalerie, en particulier Dr Patrick Gonin, Christophe et Laure.

Je tiens à remercier les personnes travaillant dans l'administration, plus particulièrement Mehdi, Rahma, Béatrice, Paule, Léa Poisot et également le personnel de Paris Saclay.

Merci à Emilie, pour ton aide, ta disponibilité, et ta bienveillance ainsi que ton implication dans mon projet.

Merci à Nathalie D. qui malgré à un emploi du temps très chargé, a su m'accorder du temps pour m'aiguiller en génomique.

Merci à Aline, pour ta gentillesse et ton aide en génomique.

Merci à Richard, pour ta pédagogie, ta rigueur et également ta bonne humeur.

Merci à Karima, pour ta sympathie, ta contribution dans les expériences *in vivo*.

Merci à Yanis, pour tes conseils, et tes encouragements.

Merci à Margot, pour ta positivité et pour ta contribution dans la gestion des échantillons de patients.

Merci à Inès et à Loïck, que j'ai vraiment apprécié d'encadrer et qui ont participé à ce projet, même si cela n'a pas été facile.

Merci à Soso ma deuxième maman et à Laurence, qui contribuent énormément au laboratoire, sans elles, nous ne pourrions pas travailler, un grand merci.

Merci à tous les membres et anciens du bureau 201, le bureau le plus bruyant de l'unité (Cynthia, Elodie, Léa, Marco, Mathieu, Suzana), avec qui on a beaucoup, beaucoup, beaucoup discuté et rigolé. Je ne doute pas que vous allez maintenir cette réputation avec les nouveaux 😊.

Merci aux copines du labo de m'avoir soutenu et pour les bons moments passés ensemble.

- Aygun, une championne des ChIP-seq, Cut&Tag, ATAC-seq (et surtout une fan de Chimpanzé « chuut ») ; on a partagé de très bons moments du master 2 jusqu'à cette fin de thèse ; tu es bien plus qu'une collègue, une vraie amie ; tu es une personne formidable, toujours prêt à aider ; tu as le don de me jouer des tours ; je garderai en mémoire ton jeu de cache-cache derrière la blouse 😊. seni özleyeceğim Aygün
- Amandine, the CurlyHair girl et ma complice pour les blagues ; on se connaît depuis la fac et on s'est retrouvé à l'IGR ; tu es une personne super gentille, adorable et attentionné (les petits croissants qu'on découvre en arrivant le matin posé sur le bureau <3) ; tu vas me manquer Amandiine ; qui sait, on se retrouvera peut-être en recherche clinique 😊
- Camélia, une future grande chercheuse ; ma copine et voisine de bureau, tu m'excuseras pour ma « métastase », que j'ai essayé de contenir pour réduire l'invasion à ton bureau mdr.

- Valentine, une amatrice de tortue et une « guedin » ; j'ai bien compris qu'il fallait faire attention au karma. Ah oui, j'ai oublié aussi de te raconter : « un soir sans rer »... (tu as la ref 😊)
- Anne, une fitgirl en devenir ; la suite sera écrite en Allemand pour toi ; *Du bist bereits am Ende des zweiten Jahres deiner Doktorarbeit. Die Zeit vergeht so schnell. Ich werde unsere Trainingseinheiten im Fitnessstudio vermissen. Ich hoffe, dass wir unsere gemeinsamen Sporteinheiten auch nach der Verteidigung fortsetzen können. Du wirst es schaffen Anne, die Dissertation ist wie ein Marathon, es ist lang, aber so befriedigend, es zu beenden.*
- Dana, une polyglotte super funny ; tellement impressionnée, par tes cultures, tes voyages Dana ; tu as toujours le smile et tu apportes toujours un good mood que j'adore.

▪ سأفتقدك يا دانا

Merci à toi Maxime ; j'aurai un jour ma revanche sur tes blagues ; je suis encore là jusqu'au 30 novembre 😊

Merci à toi Jean-Edouard, pour ton aide pour les prélèvements sanguins ; hâte de connaître le résultat de ton RNA-seq, je croise les doigts pour que ça donne qqchse 😊

Merci à toi, Guillaume, aussi connu sous le nom de Mr Monk (tu me pardonneras) ; pourquoi ce surnom ? tu es organisé, tout est carré avec toi ; je n'ai aucun doute pour toi pour l'avenir ;

Merci également aux autres futurs docteurs, Anaïs (une grande philosophe en devenir), Agathe (une future Québécoise), Hélène (une partie carte a suffi pour découvrir une autre personnalité de toi 😊), Jean (à mon Cher Jean, note à moi-même, ne jamais lui poser la question : « comment vas-tu ? », il répondra simplement « et toi »), vous êtes les prochains.

Merci aux techniciens (Nathalie B.), ingénieurs, post-doctorants (Brahim, Mira, Larissa) et chercheurs (William, Isabelle, Caroline, Monica, Antonio, Hana), pour votre aide, conseils et aussi à nos discussions de l'actualité à la pause déjeuner.

Merci à l'ensemble des membres de l'unité, et particulièrement Lucie, d'apporter ce regard philosophique qui nous permet de réfléchir différemment, Delphine, d'être disponible et de trouver une solution à chaque problème (ta capacité à retenir des références de produits, ou des numéros de DA, m'impressionnera toujours), Najet, de veiller sur le laboratoire.

Merci à Chéo, mon chéri, de m'avoir remonté le moral dans les moments difficiles et de ton amour. Je t'aime mon cœur.

Merci à toute ma famille, pour leur soutien et leur amour, de m'avoir soutenu tout au long de mes études et d'avoir cru en moi.

Je dédie cette thèse, à mes parents, à Dalila et à Hamza.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	13
INTRODUCTION	16
Partie I. Les cellules souches hématopoïétiques	16
1. Généralités sur l'hématopoïèse	17
2. Définition fonctionnelle des CSH	20
3. Définition phénotypique des CSH	25
4. Epigénétique dans les CSH	28
a. Généralités sur l'épigénétique.....	28
b. Méthylation de l'ADN : régulation et rôle dans les CSH.....	33
c. Principales modifications post-traductionnelles des histones : régulation et rôle dans les CSH.....	34
i. L'acétylation des histones.....	34
ii. La méthylation des histones.....	36
d. Les ARN non codant.....	40
e. La méthylation de l'adénine en N6 des ARN.....	41
5. Vieillesse des CSH	42
a. Altérations fonctionnelles des CSH avec l'âge.....	42
b. Altérations moléculaires dans les CSH.....	44
i. Remaniement de marques épigénétiques.....	45
ii. Dérégulation de la réparation des dommages à l'ADN.....	46
ii. Accumulation des espèces réactives à l'oxygène (ROS).....	47
iii. Raccourcissement des télomères.....	47
iv. Accumulation des cellules sénescentes.....	48
v. Changements de polarités.....	48
Partie II. Les éléments transposables	50
1. La découverte des éléments transposables	51
2. Classification des éléments transposables	52
a. Les rétro-éléments avec LTR.....	55
b. Les rétro-éléments sans LTR.....	56
i. Short Intersersed Nuclear Elements (SINE).....	57
ii. Long Intersersed Nuclear Elements (LINE).....	58
3. Fonctions physiologiques	61
a. Les réarrangements génétiques causés par les RE.....	61
i. La recombinaison.....	61
ii. Transduction des séquences flanquantes.....	62

iii. La formation de rétrogènes chimériques.....	63
b. La régulation en cis de l'activité des gènes par les RE.....	63
i. Les RE, des promoteurs de la transcription des gènes de l'hôte et aussi des régulateurs antisens.....	64
ii. Les RE, des enhancers et des silencers transcriptionnels des gènes cellulaires.....	65
iii. Les RE, jouant un rôle dans l'épissage des gènes de l'hôte.....	66
iv. Les RE jouant un rôle dans la terminaison prématurée de la transcription.....	66
4. Régulation des rétro-éléments.....	67
a. La méthylation de l'ADN.....	67
b. Les modifications post-traductionnelles des histones.....	69
c. L'interférence par ARN.....	73
d. La méthylation de l'adénine en N6 des ARN.....	74
5. Les rétro-éléments avec l'âge.....	74
6. Les rétro-éléments dans l'oncogenèse.....	77
7. Les rétro-éléments dans l'induction de la réponse immune.....	81
a. Généralités sur le système de signalisation interféron.....	81
b. Les RE et le système interféron, deux forces motrices de l'évolution qui s'opposent.....	85
c. Les RE et la réponse IFN dans les cancers.....	86
Partie III. La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC).....	91
1. Les critères de diagnostics de la LMMC.....	92
a. Les critères selon le groupe Franco-Américain-Britannique.....	92
b. Les critères selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé.....	92
c. La répartition des sous-types de monocytes, un autre critère.....	94
2. Les anomalies moléculaires dans la LMMC.....	95
a. Les anomalies cytogénétiques (chromosomiques).....	95
b. Les anomalies génétiques (mutations).....	96
c. L'architecture du clone leucémique.....	97
3. La modélisation de la LMMC.....	99
a. Des modèles murins transgéniques.....	99
b. Des modèles de xénogreffes.....	100
4. Les approches thérapeutiques.....	102
PROJETS DE THESE.....	104
PARTIE 1 : ARTICLE PUBLIÉ.....	107
THE NF-KB PATHWAY REGULATES HETEROCHROMATIN AT INTRONIC YOUNG LINE-1 ELEMENTS AND HEMATOPOIETIC STEM CELL GENE EXPRESSION DURING IRRADIATION STRESS.....	107
PARTIE 2 : ARTICLE EN PREPARATION.....	137

HETEROCHROMATIN CHANGES IN HSCS FROM CMML PATIENTS CONFER SENSITIVITY TO THE COMBINATION OF G9A/GLP INHIBITORS AND DNA HYPOMETHYLATING AGENTS VIA DEREPRESSION OF RETROELEMENT	137
MATERIEL ET METHODES (PARTIE 2)	139
RESULTATS (PARTIE 2)	153
CONCLUSION (PARTIE 2)	189
DISCUSSION/PERSPECTIVES	190
1. Les altérations de l'hétérochromatine dans les CSH avec l'âge et dans une maladie liée au vieillissement, la LMMC.....	191
2. Rôle des rétro-éléments dans l'hématopoïèse lors du vieillissement et dans les leucémies.....	194
3. La coévolution entre les RE et les gènes immunitaires.....	197
4. Mécanismes d'échappement à l'effet suppresseur de tumeurs RE.....	199
5. Causes de la résistance aux traitements hypométhylants de l'ADN (HMA).....	201
6. Autres stratégies thérapeutiques pour améliorer la réponse immune induite par les HMA.....	204
7. Prédiction de la réponse aux traitements épigénétiques.....	209
8. Etudes pré-cliniques effectuées sur des modèles de souris LMMC.....	210
CONCLUSIONS	212
BIBLIOGRAPHIE	214

Liste des abréviations

0-9 :

- 3'-UTR : 3' *Untranslated transcribed region*
- 5-azacytidine : AZA
- 5-hmC : 5-hydroxy-méthyl-cytosine
- 5-mC : 5-méthyl-cytosine

A :

- ADN-db : ADN double brin
- ARN-db : ARN double brin
- Ago : Argonaute
- APE : Endonucléase apurinique
- ARNi : L'interférence par ARN

B :

- BER : Réparation par excision de base

C :

- CA-FC : Cobblestone Area Forming Cell
- CD80 : *Cluster of differentiation 80*
- CFU : Colony Forming Unit
- CHD3 : *Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3*
- CHIP : Hématopoïèse clonale de signification indéterminée
- CLP : Progéniteurs lymphoïdes communs
- CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
- CMP : Progéniteurs myéloïdes
- CPNPC : Cancer du poumon non à petites cellules
- CSH : Cellules souches hématopoïétiques
- CSL : Cellules souches leucémiques
- CSPH : CSH et progéniteurs
- CTLA-4 : *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 protein*
- CyToF : *Cytometry by Time of Flight*

D :

- DAC : Décitabine
- DCs : Cellules dendritiques
- DDR : *Dna Damage Response*
- DHX33 : *NOD-like receptor family*
- DMR : *Differentially methylated region*
- DNMTs : ADN méthyltransférases

E :

- ECL : *Enhanced ChemiLuminescence*
- ENV : Enveloppe
- Ep : Précurseurs érythroïdes
- EoBP : Progéniteurs d'éosinophile-basophiles
- ERV : Rétrovirus endogènes
- ES : *Embryonic stem*

F :

- FAB : Groupe Franco-Américain-Britannique
- FOXO : *Foxhead O*
- FLT3-L : *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*

G :

- GFM : Groupe Francophone des Myélodysplasies
- GMP : Progéniteurs granulomacrophagiques
- GSEA : *Gene Set Enrichment Analysis*
- GST : Gènes suppresseurs de tumeurs
- GSVA : *Gene Set Variation of Analysis*

H :

- H3K4me3 : Tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3
- H3K9me1 : Mono-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3
- H3K9me2 : Di-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3

- H3K9me3 : Tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3
- H3K27me3 : Tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3
- HAT : Histones acétyltransférases
- HDAC : Histones déacetylases
- HERV : Rétrovirus endogènes humains
- HGPS : Syndrome de Progéria Gilford Hutchinsonson
- HMA : *DNA hypomethylating agents*
- HMT : Histones méthyltransférases
- HP1 : *Heterochromatin protein 1*
- hTR : *Human telomerase RNA*
- HRP : Peroxydase de Raifort
- HUSH : *Human silencing hub*

I :

- IFN : Interféron
- IKK : *IkappaB kinase*
- IL3 : *Interleukin 3*
- ILCs : Cellules lymphoïdes innées
- iPSC : *Induced pluripotent stem cells*
- INT : Intégrase
- IRF2BP2 : *Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2*
- ISG : *Interferon stimulated genes*
- ISGF3 : *Interferon stimulated gene factor 3*
- ISRE : *IFN-stimulated regulatory element*

K :

- KAP1 : *KRAB domain associated protein 1*
- KDM : Histones déméthylases
- KO : *Knock-out*
- KRAB-ZFP : *Kruppel-associated box domain zinc finger proteins*
- KRIP1 : *KRAB-A-interacting protein 1*

L :

- LAM : Leucémie myéloïde aigue

- LGP2 : *Probable ATP-dependent RNA helicase*
- Lin⁻ : Lignée négative
- LINE : *Long interspersed nuclear elements*
- LINE 1 : L1
- LLA : Leucémie lymphoblastique aigue
- LLC : Leucémie lymphocytaire chronique
- LMC : Leucémie myéloïde chronique
- LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique
- LMPP : Progéniteur multipotent biaisé lymphoïdes
- LncARN : Long ARN non codant
- LSK : Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺
- LTC-IC : *Long Term Culture-Initiating Cell*
- LT-CSH : Cellules souches hématopoïétique à long-terme
- LTR : *Long terminal repeat*

M :

- m6A : Méthylation de l'adénine en N6 de l'ARN
- MAVS : *Mitochondrial antiviral-signaling protein*
- MDA5 : *Melanoma differentiation-associated protein 5*
- MEP : Progéniteurs érythro-mégacaryocytaires
- miARN : *Micro interfering ARN*
- Mkp : Précurseurs mégacaryocytaires
- MO1 : Monocytes classiques
- MO2 : Monocytes intermédiaires
- MO3 : Monocytes non classiques
- MPP : Progéniteurs multipotents
- MPP8 : *MPHOSPH8, M-Phase Phosphoprotein 8*

N :

- NER : Réparation par excision des nucléotides
- NGS : *Next-generation sequencing*
- NHEJ : Jonctions des extrémités non homologues
- NK : *Natural killer cells*
- NLRP3 : *NOD-like receptor family*
- NMP : Néoplasies myéloprolifératives
- NOD : *Non-obese diabetes*

O :

- OAS : *2'-5'- oligoadenylate synthetase*
- OMS : Organisation mondiale de la santé
- ORF : *Open reading frame*

P :

- PD-1 : *Programmed cell death protein 1*
- PD-L1 : *Programmed death ligand 1*
- PD-L2 : *Programmed death ligand 2*
- P/S : Pénicilline/streptomycine
- piARN : *Piwi-interacting ARN*
- PKR : Protein kinase R
- PPHLN1 : PERIPHILINE 1

S :

- SCID : *Severe combined immunodeficiency*
- SCF : *Stem cell factor*
- SEM : *Standard error of the mean* (erreur standard de la moyenne)
- SINE : *Short interspersed nuclear elements*
- siARN : *small interfering RNA*
- SMD : Syndrome myélodysplasique
- SP : *Side population*
- STAT : *Signal transducers and activators of transcription*
- ST-CSH : Cellules souches hématopoïétique à court-terme
- SVF : Sérum de veau foetal

T :

- TBK1 : *TANK-binding kinase 1*
- TCR : *T-cell receptor*
- TERT : *Telomerase reverse transcriptase*
- TET : *Ten-Eleven Translocation, ADN déméthylases*

- PRC2 : *Polycomb Repressive Complex 2*
- Pro-CD : Précurseurs dendritiques
- Pro-NK : Précurseurs des cellules naturelles tueuses
- PRR : *Pattern-recognition receptors*

Q :

- qPCR : PCR quantitative
- PD-L1 : *Programmed death ligand 1*

R :

- rasiARN : *Repeat associated short interfering RNA*
- RE : Rétro-éléments
- RIG-1 : *Retinoic acid-inducible gene 1*
- RISC : *RNA-induced silencing complex*
- RLR : *Retinoic acid-inducible gene-like receptors*
- RH : Ribonucléase H (ou Rnase H)
- RNase L : Endoribonucléase L
- RNP : Particules ribonucléiques
- ROS : Espèces réactives à l'oxygène
- RT : Transcriptase inverse

- TIF-1 β : *Transcription intermediary factor 1 β*
- TIR : *Terminal inverted repeats*
- TLR : *Toll-like receptors*
- TNF : *Tumor necrosis factor*
- TPO : *Thrombopoïétine*
- TRAF : *TNF receptor-associated factor*
- TRAP : *Telomere repeat amplification protocol*
- TRIM28 : *Tripartite motif-containing 28*
- TSD : *Terminal side duplication*

V :

- VAF : *Variant allele frequency*
- vWF : *Von Willebrand factor*

W :

- WES : *Whole Exome Sequencing*
- WGS : *Whole Genome Sequencing*
- WT : *Wild-type*

Table des illustrations

Introduction

Figure 1. Modèle classique pyramidal de l'hématopoïèse humaine adulte.....	17
Figure 2. Chronologie des différents modèles de l'hématopoïèse.....	19
Figure 3. Localisation de l'hématopoïèse chez l'embryon et le fœtus de l'Homme.....	20
Figure 4. Les différents tests <i>in vitro</i> pour étudier le potentiel des cellules hématopoïétiques.....	22
Figure 5. Tests de reconstitution hématopoïétique <i>in vivo</i>	24
Figure 6. Régulation de la méthylation de l'ADN.....	30
Figure 7. KAP1, un acteur majeur de l'hétérochromatine.....	32
Figure 8. Un état métastable de la chromatine dans les cellules souches, caractérisé par une chromatine bivalente.....	40
Figure 9. Les altérations moléculaires des CSH lors du vieillissement.....	44
Figure 10. Les différents pigments du grain de maïs.....	51
Figure 11. Deux mécanismes de transposition des éléments transposables.....	53
Figure 12. Classification des éléments transposables proposés par Wicker <i>et al.</i>	54
Figure 13. Quatre superfamilles au sein des rétroéléments avec LTR.....	56
Figure 14. Structure des éléments SINE.....	57
Figure 15. La structure des cinq superfamilles au sein des LINE.....	59
Figure 16. Le cycle de rétro-transposition des éléments L1.....	60
Figure 17. Remaniements génomiques par les rétro-éléments.....	61
Figure 18. Les différents mécanismes des RE pour modifier le transcriptome.....	63
Figure 19. Les différents mécanismes de répression des RE.....	71
Figure 20. Modèle d'acquisition de la marque H3K27me3 sur les éléments transposables suite à une déméthylation.....	72
Figure 21. Rôle physiopathologique des rétro-éléments.....	81
Figure 22. Mécanismes d'actions des différents senseurs d'acide nucléiques.....	83
Figure 23. La voie de la signalisation JAK/STAT canonique induite par les IFN-I.....	84
Figure 24. Les rétro-éléments, le talon d'Achille des cellules cancéreuses.....	87
Figure 25. Principaux checkpoints immunitaires.....	90
Figure 26. La répartition anormale des sous-populations monocytaires dans la LMMC.....	94
Figure 27. Modèles de pathogenèse de la LMMC. (Tiré de Itzykson et al. 2017).....	99
Tableau 1. Marqueurs phénotypiques des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques murines.....	26
Tableau 2. Marqueurs phénotypiques des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques humaines.....	27
Tableau 3. Quelques exemples d'enzymes régulant les marques d'histones.....	31
Tableau 4. Critères de diagnostic pour la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2016.....	93

Tableau 5. Fréquences relatives des mutations somatiques chez les patients atteint de LMMC.....	97
---	----

Matériel & Méthodes (Partie 2)

Figure 1. Prélèvements des cultures liquides de CD34⁺ de patients et/ou de sujets sains dans les différentes conditions de traitements (NT, UNC0638, DAC, DAC+UNC0638)... 143

Tableau 1. Marquage des cellules Lin⁻ murines..... 142

Tableau 2. Les mutations identifiées avec une VAF supérieure à 30% dans les monocytes de patients..... 144

Tableau 3. Liste des amorces utilisés pour étudier la VAF des patients..... 145

Tableau 4. Listes des amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR..... 146

Tableau 5. Les anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence..... 147

Tableau 6. Les anticorps utilisés pour les expériences de Western Blot..... 148

Tableau S1. Données des sujets âgés sains et patients..... 152

Résultats (Partie 2)

Figure 1. Etude des changements dans les marques de l'hétérochromatine dans les cellules CD34⁺ de patients LMMC..... 156

Figure 2. Etat de l'hétérochromatine dans les cellules CD34⁺ de patients atteints de LMMC analysé par ATAC-seq..... 158

Figure 3. Etude de l'accessibilité de la chromatine au niveau des RE après le traitement par la combinaison HMA et inhibiteurs H3K9 di-méthyltransférase..... 160

Figure 4. Etude de l'expression des ERV après le traitement par la combinaison..... 164

Figure 5. La clonogénicité des CD34⁺ de patients LMMC est altérée par la combinaison, HMA et inhibiteurs de G9A/GLP, contrairement aux sujets sains..... 166

Figure 6. La clonogénicité, la survie et la prolifération des CSH et des progéniteurs de LMMC est affectée par la combinaison DAC+UNC..... 170

Figure 7. Induction des voies de mort cellulaire, de l'immunité et de l'IFN par la combinaison HMA et inhibiteurs G9A/GLP..... 174

Figure 8. Induction des voies de mort cellulaire, de l'immunité et de l'IFN par la combinaison HMA et inhibiteurs G9A/GLP..... 176

Figure 9. Augmentation de la marque H3K9me2 et de la sensibilité à la combinaison DAC+UNC0638 des CSPH *Tet2*^{-/-} avec l'âge..... 179

Figure 10. Effet du CM-272 *in vivo* dans les souris *Tet2*^{-/-}..... 182

Figure S1..... 184

Figure S2..... 185

Figure S3..... 186

Figure S4..... 187

Discussions/Perspectives (Partie 2)

Figure 1. Diminution de l'ARNm et de la protéine KAP1 dans les CD34+ de patients atteints de LMMC.....	193
Figure 2. Diminution de l'ARNm et de la protéine SPOP dans les CD34+ de patients atteints de LMMC.....	194
Figure 3. Présence de foci γ-H2AX à l'état basal dans les CD34⁺ de patients atteints de LMMC.....	196
Figure 4. Les rétro-éléments, deux rôles antagonistes : oncogène et suppresseur de tumeurs.....	197
Figure 5. Le switch épigénétique, un mécanisme de résistance aux HMAs.....	202

Introduction

Partie I. Les cellules souches hématopoïétiques

1. Généralités sur l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus physiologique de renouvellement en continu et régulé des cellules matures du sang : plaquettes, érythrocytes et leucocytes, comprenant les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes. Elles assurent diverses fonctions dépendant du type cellulaire tel que le transport de l'oxygène (les érythrocytes), l'hémostase (les plaquettes), la défense contre les pathogènes (les neutrophiles et les monocytes).

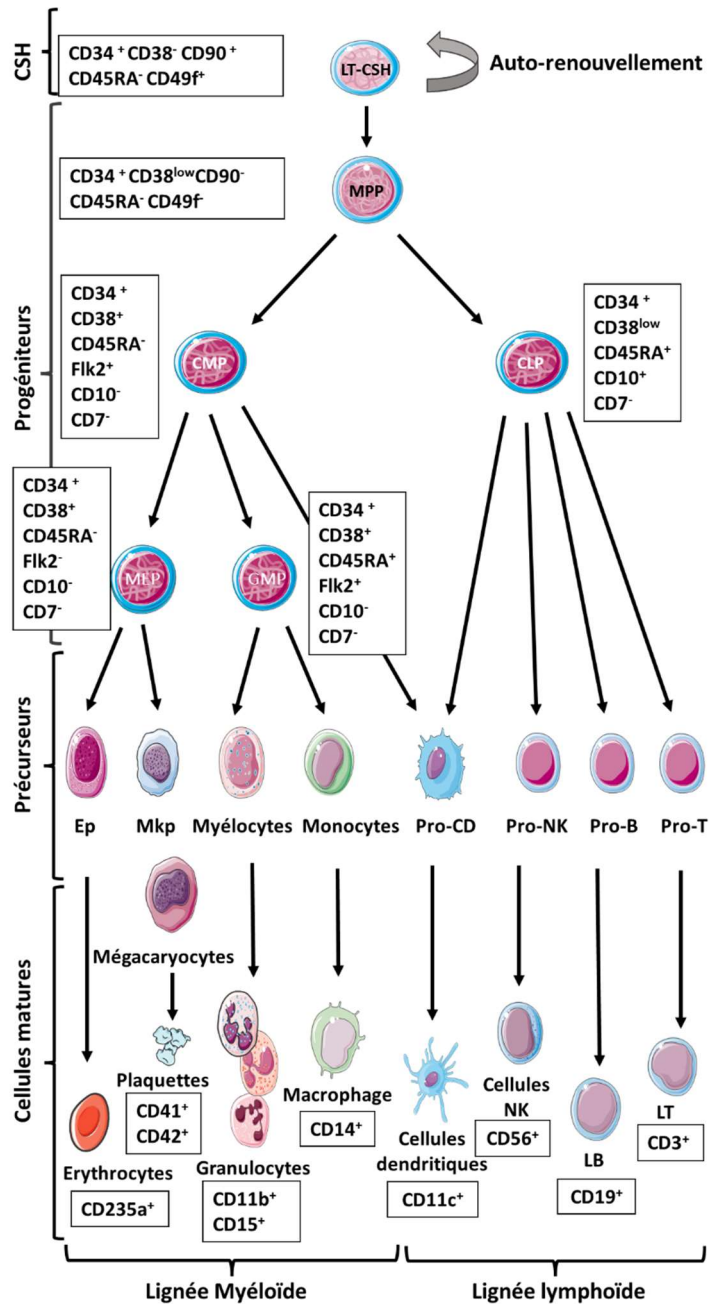


Figure 1. Modèle classique pyramidal de l'hématopoïèse humaine adulte.

En haut de la hiérarchie, les cellules souches hématopoïétiques long terme (LT-CSH) s'auto-renouvellent et sont aussi capables de générer des progéniteurs multipotents (MPP). Ces MPP se différencient en progéniteurs myéloïdes (CMP) ou progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Les CMP entrent dans la voie de différenciation myéloïde en donnant naissance à des progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP) et des progéniteurs granulomacrophagiques (GMP). Les progéniteurs CLP produisent des précurseurs dendritiques (Pro-CD), les cellules naturelles tueuses (Pro-NK), les lymphocytes Pro-T et Pro-B. Les progéniteurs MEP génèrent des précurseurs érythroïdes (Ep), mégacaryocytaires (Mkp). Les progéniteurs GMP produisent aussi des deux types de précurseurs : les monocytes et les myélocytes. Tous les précurseurs subissent des étapes de maturations pour donner naissance à des cellules effectrices à la base de la pyramide. Les panels en noirs indiquent les marqueurs moléculaires de surface pour isoler les différentes populations hématopoïétiques humaines.

L'hématopoïèse repose sur un modèle « hiérarchique » et fait intervenir différents « intermédiaires » allant d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) à une cellule spécialisée mature. Au cours de ce processus, les intermédiaires perdent leur capacité de s'auto-renouveler et acquièrent progressivement les caractéristiques d'une cellule mature. De façon schématique, le système hématopoïétique est divisé en quatre compartiments : les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures. Les CSH sont placées en haut de la hiérarchie et vont produire différents types de progéniteurs. Ces derniers vont changer morphologiquement pour donner naissance à des précurseurs qui subiront des étapes de maturations [Figure 1]. Ce modèle classique présentant l'hématopoïèse comme une structure stable et hautement compartimentée a été remis en question par les nouvelles avancées technologiques incluant les analyses omics et les transplantations de cellules uniques (Laurenti et Göttgens 2018; Konturek-Ciesla et Bryder 2022). Le modèle révisé de la hiérarchie hématopoïétique apporte trois éléments nouveaux : l'hétérogénéité au sein même des populations, la représentation de la différenciation sous forme d'un continuum et non d'un processus discret et la flexibilité de l'hématopoïèse pour répondre aux besoins (Velten et al. 2017; Buenrostro et al. 2018; Laurenti et Göttgens 2018) [Figure 2].

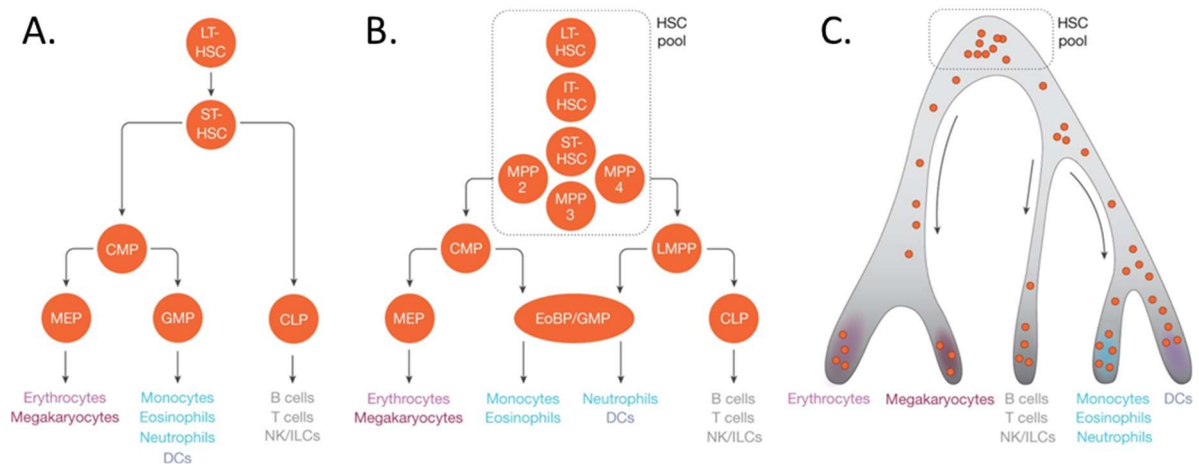


Figure 2. Chronologie des différents modèles de l'hématopoïèse.

(Tiré de Laurenti et Gottgens, 2018)

A. Modèle hiérarchique de l'hématopoïèse apparu dans les années 2000 : Dans ce modèle, les CSH sont représentées comme une population homogène et qui se divisent en deux branches myéloïdes et lymphoïdes via respectivement les progéniteurs myéloïdes (CMP) et les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) ; **B. Dans les années 2005 à 2015, le modèle est révisé** : le pool de CSH est plus hétérogène en termes d'auto-renouvellement (axe vertical) et de différenciation (axe horizontal) ; les branches myéloïdes et lymphoïdes restent associées plus bas dans la hiérarchie par l'intermédiaire de la population de progéniteur multipotent biaisé lymphoïde (LMPP) ; le compartiment granulocytes-monocytes (GMP) est montré comme étant assez hétérogène ; **C. Depuis 2016** : les analyses transcriptomiques à l'échelle d'une seule cellule ont fait émerger la notion de continuum lors de la différenciation. Chaque point rouge représente une cellule unique et sa localisation le long d'une trajectoire de différenciation. *LT, long terme ; ST, court terme ; MEP, progéniteurs érythro-mégacaryocytaires ; DCs, cellules dendritiques ; NK, cellules naturelles tueuses ; ILCs, cellules lymphoïdes innées ; EoBP, progéniteur d'éosinophile-basophiles.*

Avant la naissance, l'hématopoïèse démarre chez l'Homme dès le 21^{ème} jour de l'embryogenèse et est produite dans la région aorte-gonade-mésonephros et dans le sac vitellin. Les cellules hématopoïétiques migrent dans les ganglions lymphatiques, la rate et le foie à partir du troisième mois de gestation. Elles prennent définitivement leur place dans la moelle osseuse dans les derniers mois de la vie intra-utérine (Mikkola et Orkin 2006). Ainsi chez un adulte sain, la moelle osseuse est le site principal de formation du sang [Figure 3]. Bien qu'une faible quantité de CSH se retrouve transitoirement dans la circulation ou dans d'autres organes, les CSH résident dans la moelle osseuse durant toute la vie d'un individu (Sean J. Morrison et Scadden 2014). La moelle osseuse est aussi le lieu où sont produits les progéniteurs hématopoïétiques immatures. La différenciation de ces progéniteurs se poursuit dans la moelle osseuse ou dans d'autres organes hématopoïétiques dépendant du type de progéniteurs. Par exemple les progéniteurs lymphoïdes restant dans la moelle osseuse produisent des

lymphocytes B tandis que ceux migrant dans le thymus génèrent des lymphocytes T (Schwarz et Bhandoola 2006; LeBien et Tedder 2008).

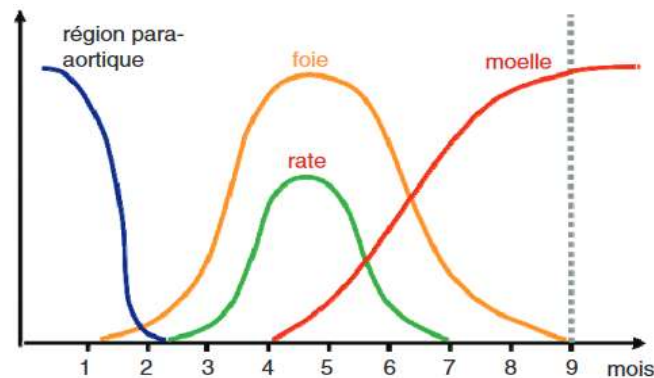


Figure 3. Localisation de l'hématopoïèse chez l'embryon et le fœtus de l'Homme.

(Tiré du livre Hématologie, 2014, Elsevier Masson)

Le sang apparaît en moins d'un mois de l'embryogenèse chez l'Homme et est produit dans la région aorte-gonades-mésophros et le sac vitellin (*courbe bleue*). Ensuite le foie et la rate prennent le relais entre le 2^{ème} et 7 mois de la vie (*courbes jaune et verte*). Puis la moelle osseuse devient le site majeur de production de cellules sanguines dans les deux derniers mois de la vie intra-utérine (*courbe rouge*). Enfin, la moelle devient le site exclusif de l'hématopoïèse après la naissance.

La majorité des cellules matures du sang ont une durée de vie courte, nécessitant un renouvellement constant. Il est estimé qu'environ 10^{11} cellules hématopoïétiques sont produites par jour chez l'Homme. Le maintien d'un pool de cellules durant toute la vie d'un individu est rendu possible par les CSH.

2. Définition fonctionnelle des CSH

Au XIX^e siècle, l'allemand F. Neumann est le premier à avoir postulé que les cellules sanguines étaient produites dans la moelle osseuse. Il a aussi émis une théorie, controversée à l'époque et validée depuis, selon laquelle des cellules particulières pourraient être à l'origine de toutes les lignées sanguines. Dans les années 50, les travaux de Lorenz et ceux de Jacobson montrent que l'injection de cellules de la moelle osseuse et de la rate venant d'une souris adulte donneuse empêche la mort des souris irradiées de façon létale (Jacobson et al. 1950; Lorenz et al. 1951). Une décennie plus tard, Till et McCulloch réalisent les premières estimations du nombre de CSH en comptant le nombre de colonies hématopoïétiques formées dans la rate des souris injectées (Till et McCulloch 1961).

Résidant principalement dans la moelle osseuse, les CSH sont rares. Chez la souris, la fréquence des CSH dans la moelle osseuse est d'environ 0.01% du total des cellules nucléées (Challen et al. 2009). Il est possible d'isoler environ 4000-5000 CSH à partir des os longs d'une souris; Ce nombre peut varier selon l'âge, le sexe, la souche de la souris et la méthode de purification (Challen et al. 2009). Le nombre de CSH humaines capable de donner des leucocytes à tout moment est estimé entre 50 000 – 200 000 cellules (Lee-Six et al. 2018). Les CSH sont multipotentes, pouvant donner naissance à toutes les cellules matures du sang. Elles sont capables de s'auto-renouveler c'est-à-dire de produire des cellules multipotentes sans différenciation, maintenant ainsi une réserve constante de CSH primitives. Une propriété fondamentale de ces cellules est leur état de quiescence réversible, permettant d'éviter l'épuisement fonctionnel des CSH et de les protéger des agressions comme la radiothérapie, la chimiothérapie. Bien qu'elles aient un potentiel d'auto-renouvellement très élevé, elles se divisent rarement, environ une fois par an chez l'Homme (Abascal et al. 2021). Les CSH quiescentes ont également un métabolisme réduit par rapport à des CSH cyclantes. Même si cet état de dormance est généralement considéré comme un mécanisme de protection essentielle pour minimiser les stress endogènes, il n'empêche pas l'accumulation de mutations avec l'âge (Abascal et al. 2021; Urbán et Cheung 2021). En effet, des cassures de l'ADN, des réarrangements chromosomiques sont observées dans les CSH quiescentes (Mohrin et al. 2010; de Laval et al. 2013).

Les tests clonogéniques *in vitro* mettent en évidence la multipotence des CSH en utilisant leur capacité clonale. En effet des CSH cultivées dans un milieu semi-solide approprié qui réduit leur mobilité sont capables de former des colonies à partir d'une seule cellule. Ces colonies sont nommées les CFU (*Colony Forming Unit*) (Bradley et Metcalf 1966). Les cellules se différencient vers un lignage donné et forment un type de CFU selon les facteurs de croissance présents dans le milieu (Gunsilius, Gastl, et Petzer 2001)[Figure 4A]. Néanmoins les CFU constituent une population de cellules hétérogènes. D'autres expériences tel que les CA-FC (*Cobblestone Area Forming Cell*) et les LTC-IC (*Long Term Culture-Initiating Cell*) permettent d'analyser le potentiel « souche » *ex vivo* des cellules en réalisant des tests de culture à long terme sur des cellules stromales productrices de cytokines (Sutherland et al. 1989; Ploemacher et al. 1989)[Figure 4B-C]. La limite de ces tests est qu'il est difficile d'établir un lien entre les CSH et les cellules capables d'être cultivées à long terme.

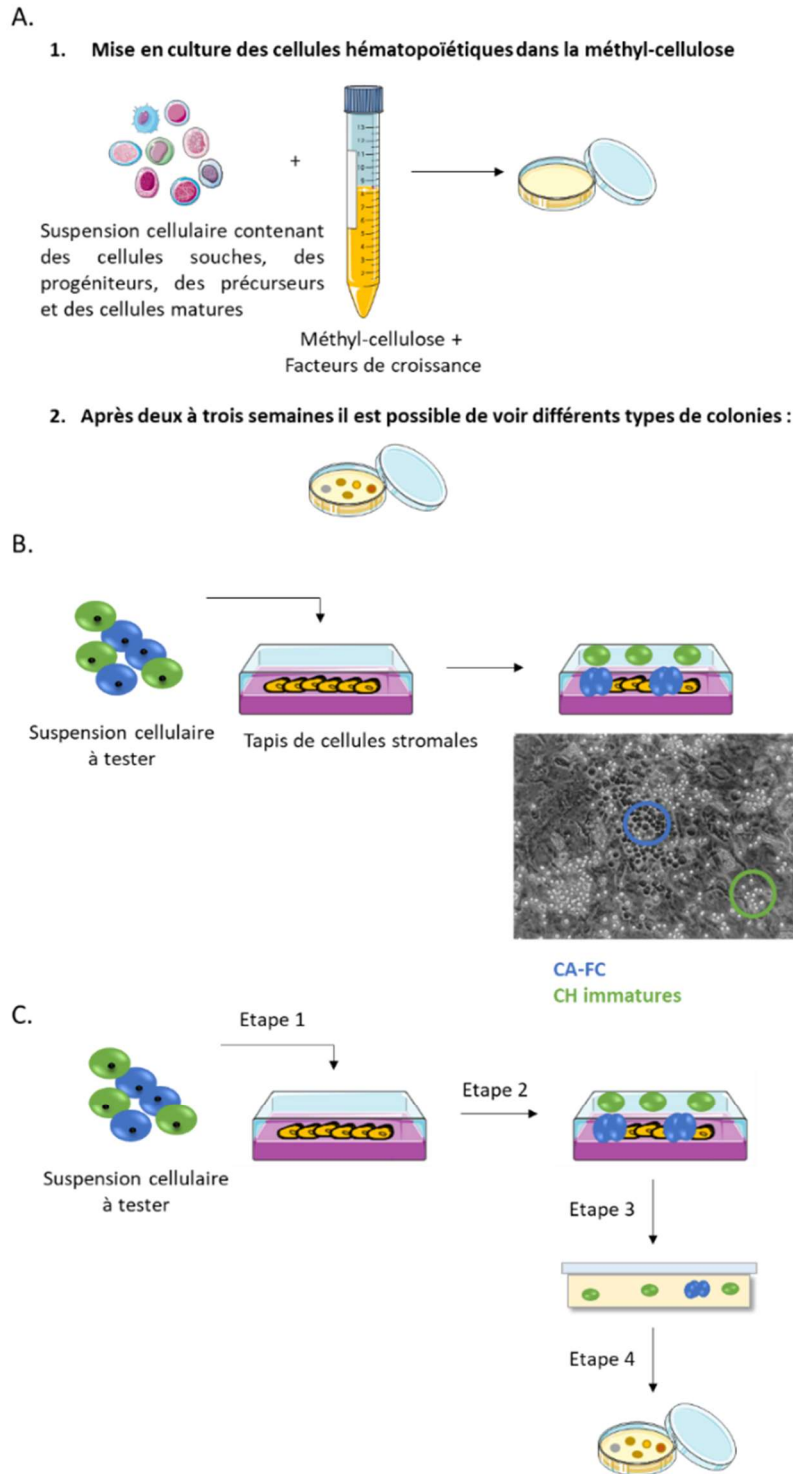


Figure 4. Les différents tests *in vitro* pour étudier le potentiel des cellules hématopoïétiques.

A. Test clonogénique ou Colony-Forming Cell (CFC) assay. La suspension cellulaire contenant différents types de cellules sont mises en culture dans un milieu semi-solide tel que la méthylcellulose avec différentes cytokines. Selon l'espèce il est possible d'avoir des colonies dès une semaine de culture. Une colonie provient initialement d'une seule cellule ;

B. CA-FC ou Cobblestone Area-Forming Cell. Cette technique consiste à co-cultiver une

population cellulaire à tester sur un tapis de cellules stromales. Les cellules hématopoïétiques (CH) immatures, bien rondes se localisent dans le surnageant de culture. Des foyers hématopoïèse sont identifiables par la morphologie des cellules qui est pavimenteuse dans la couche adhérente et sont formées à partir de cellules souches appelés CA-FC. L'image est tirée du livre *Hematopoietic Stem Cell Protocols, Methods in molecular medicine*, de Haan & Ploemacher, 2002 ; **C. La LTC-IC ou Long-Term Culture-Initiating Cell.** 1^{ère} étape : Ensemencement de la population à tester sur le tapis de cellules stromales ; 2^{ème} étape : Co-culture pendant 28 à 35 jours avec changement de la moitié du milieu toutes les semaines ; 3^{ème} étape : Récupération des cellules (adhérentes et non adhérentes) et mise en culture en méthylcellulose ; 4^{ème} étape : Détermination du nombre total de colonies après une ou deux semaines de culture. Si tous les types de colonies de la lignée myéloïde sont observables sur la méthylcellulose alors on peut conclure rétrospectivement que la population testée initialement contenait des cellules long terme, des cellules hématopoïétiques plus immatures que les CA-FC J28-J35.

Il est communément établi que le test de reconstitution hématopoïétique à long-terme est le seul test pour prouver la présence de CSH dans une population donnée. Il consiste dans un premier temps à irradier de façon létale une souris dans le but de détruire les cellules hématopoïétiques, laissant des espaces libres dans la moelle osseuse prêts à recevoir de nouvelles CSHs, puis dans un second temps d'injecter différentes doses de la population à étudier dans le but de déterminer un pourcentage de reconstitution hématopoïétique (reconstitution non compétitive) et/ou de quantifier le nombre de CSHs initialement présent dans l'échantillon en effectuant des injections en dilution limite (reconstitution compétitive) [Figure 5]. Ce test a permis d'identifier deux types de CSHs chez la souris (Harrison et Zhong 1992; S. J. Morrison et Weissman 1994; S. J. Morrison et al. 1997) :

- **Les CSH à court-terme (ST-CSH)** : ce sont des cellules pouvant reconstituer l'hématopoïèse uniquement sur 4 à 12 semaines.
- **Les CSH à long-terme (LT-CSH)** : ce sont des cellules ayant un potentiel de reconstitution à long terme de plus de 6 mois, pouvant être transplantées dans des hôtes secondaires voire tertiaires (Domen et Weissman 1999)

L'émergence de la xénotransplantation a permis de tester *in vivo* le potentiel de repeuplement d'une population de cellules humaines et de faire de grandes avancées sur l'étude de l'hématopoïèse chez l'Homme. Elle consiste à injecter l'échantillon à étudier en intra-veineuse ou intra-osseux dans des souris génétiquement immunodéficientes SCID (*severe combined immunodeficiency*) ou NOD (*non-obese diabetes*)/SCID et irradiées à des doses sub-létales. De plus des injections de cellules en dilution limite permettent de déterminer la fréquence de CSH présentes dans l'échantillon. Néanmoins ce test présente certains inconvénients. Notamment,

l'hématopoïèse humaine peut être étudiée sur une période limitée (6-12 semaines) due à une courte espérance de vie de la souris SCID (Doulatov et al. 2012). Il est donc impossible d'étudier la cinétique de greffe de cellules humaines ou de distinguer des sous-types de CSH qui permettent une reconstitution court-terme et long terme. La réussite de la reconstitution est notamment limitée par le manque de cytokines humaines nécessaire pour le développement et la maintenance des lignages cellulaires. L'utilisation de souris humanisée permettant de produire des cytokines humaines a permis d'améliorer la reconstitution de lignages à partir de cellules de sang cordon ou de moelle osseuse humaine (Q. Chen, Khoury, et Chen 2009; Y. Zhang et al. 2017).

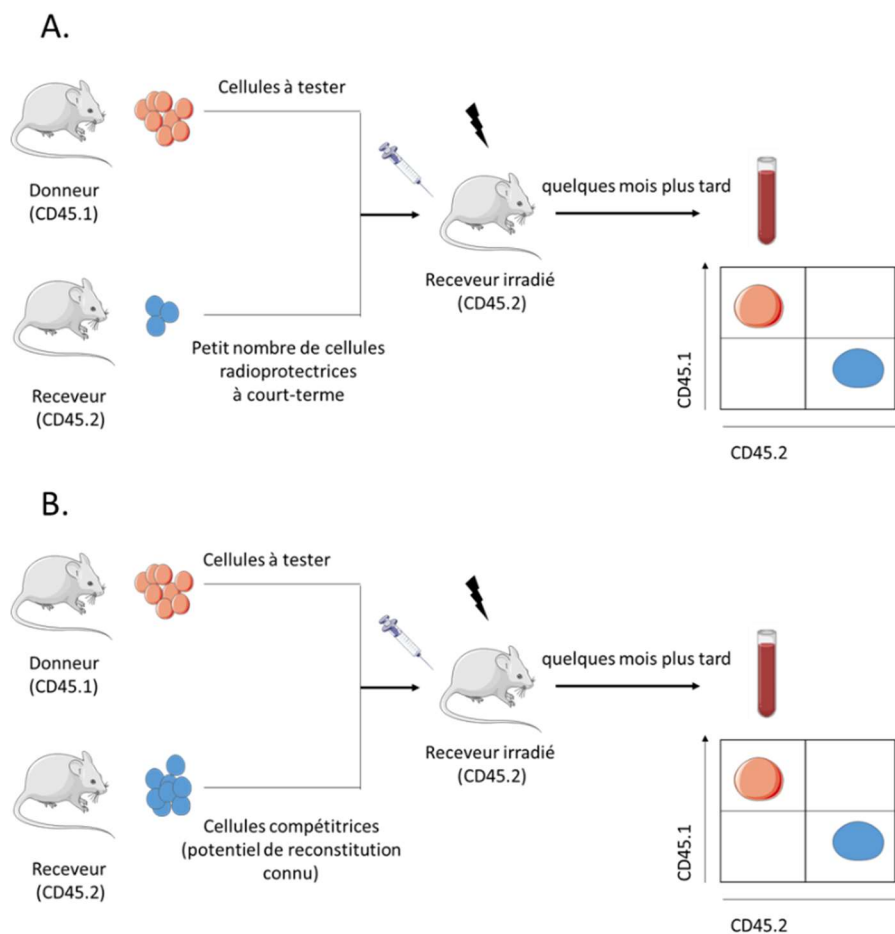


Figure 5. Tests de reconstitution hématopoïétique in vivo.

A. Test de reconstitution non compétitive (qualitatif) : Ce test consiste à injecter les cellules à tester dans la souris receveuse irradiée létalement pour déterminer la capacité des cellules injectées à reconstituer l'hématopoïèse. Un petit nombre de CSH de la souris receveuse est injectée en simultanément pour permettre la radioprotection le temps que les CSH potentiellement contenues dans la population à tester puissent migrer dans la moelle et reconstituer l'hématopoïèse dans la souris receveuse ; **B. Test de reconstitution compétitive (quantitatif) :** Ce test met en compétition deux types de populations, une population à tester dont le potentiel de reconstitution est inconnu et une population

donnée dont le potentiel de reconstitution est connu. Il permet de quantifier le nombre de de CSH-LT présent au sein de la population à tester. Dans ces deux tests, les souris donneuses et receveuses ont un même fond génétique (C57BL6) mais elles possèdent deux allèles différents pour le CD45. Ceci permet de discriminer les cellules issues de la souris donneuse et celles de la souris receveuse.

3. Définition phénotypique des CSH

La cytométrie en flux avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant des marqueurs portés par les cellules souches et des colorants vitaux discriminant les cellules en division a permis d'isoler et d'étudier les CSH.

Les marqueurs de CSH murines

En 1988, Spangrude *et al.* sont les premiers à proposer un phénotype des CSH murines. Ils définissent ces cellules par l'absence de marqueurs de surface spécifique des lignages associés à une maturation terminales des cellules (Lignage négative : Lin⁻) tel que CD4 et CD8 (les lymphocytes T), B220 (les lymphocytes B), Mac-1 (les cellules myélomonocytiques) (Spangrude, Heimfeld, et Weissman 1988). Puis ils ont mis en évidence différents marqueurs de surface cellulaire des CSH murines. Les cellules avec un phénotype Thy-1^{Low} Sca⁺ sont capables de repeupler la moelle osseuse d'une souris irradiée sur une longue période (plus de 3 mois) et de produire des lymphocytes T, B et des cellules myélomonocytaires. Elles représentent approximativement 0.05% de la moelle totale d'une souris. Au début des années 90, la présence de certains antigènes comme le Sca et Kit ont permis d'enrichir les Lin⁻ en CSH. Les cellules Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺ sont communément appelés les cellules LSK. Elles contiennent 3 types cellulaires : les LT-CSH, les ST-CSH, et les progéniteurs multipotents (MPP) qui ne sont pas capables de s'auto-renouveler (S. J. Morrison et Weissman 1994)

A la fin des années 90 jusqu'au début des années 2000, les LT-CSH sont enrichies dans la fraction LSK par la sélection négative pour les marqueurs CD34 et Flk2 (appelé aussi Flt3 ou CD135) (Osawa et al. 1996; Christensen et Weissman 2001). Seulement 40% de cette population nommé LSK CD34⁻ Flk2⁻ est capable de reconstituer à long terme l'hématopoïèse (Takano et al. 2004; Adolfsson et al. 2005). En 2005, une méthode alternative fondée sur les récepteurs de la familles SLAM (CD150, CD244 et CD48) a permis d'isoler des CSH (Kiel et al. 2005). En effet, Kiel *et al.* montrent que 50% des cellules LSK CD150⁺ CD48⁻ peuvent reconstituer à long terme. La combinaison de ces deux méthodes permet de distinguer les LT-CSH (LSK CD34⁻ Flk2⁻ CD150⁺ CD48⁻) et les différentes populations de MPP (Wilson et al. 2008; Cabezas-Wallscheid et al. 2014). [Tableau 1].

LT-CSH	ST-CSH	MPP	LMPP	CLP	CMP	GMP	MEP
Lin⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻
SCA⁺	SCA ⁺	SCA ⁺	SCA ⁺	SCA ^{low}	SCA ⁻	SCA ⁻	SCA ⁻
KIT⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺
CD34⁻	CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	Flk2 ⁺	CD34 ^{high}	CD34 ^{low}	CD34 ^{low}
CD150⁺	CD150 ⁺	CD150 ⁻	Flk2 ⁺	CD127 ⁺	FCγR ⁻	FCγR ⁺	FCγR ⁻
CD48⁻	Flk2 ⁺	Flk2 ⁺	CD127 ⁺				
Flk2⁻							

Tableau 1. Marqueurs phénotypiques des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques murines

D'autres marqueurs en plus peuvent être utilisés pour identifier les CSH murines, tels que l'EPCR (CD201). En 2006, B. Balazs *et al.* mettent en évidence que les cellules de la moelle osseuse isolées uniquement sur l'expression de l'EPCR présentent des niveaux de prise de greffe *in vivo* comparable à ceux des CSH purifiées selon les méthodes conventionnelles citées ci-dessus (Balazs et al. 2006). De plus, l'enrichissement des populations cellulaires en CSH, d'abord par les méthodes conventionnelles, et isolées ensuite sur la base de l'expression de l'EPCR montre que le phénotype des CSH est toujours associée à une forte expression de ce marqueur ; ce qui suggère une corrélation « explicite » de l'EPCR avec l'activité des CSH murines de la moelle osseuse (Balazs et al. 2006).

Les populations enrichies en CSH fondées sur ces méthodes sont constituées en partie de cellules n'ayant pas de potentiel « souche ». De plus, les CSH ne peuvent pas être décrites comme un groupe homogène de cellules. Le degré d'hétérogénéité comportementale et moléculaire existant dans les sous-types de CSH nouvellement identifiés sont à prendre en compte (Schroeder 2010). En 2007, Masson *et al.*, montrent qu'une fraction de CSH définie phénotypiquement exprime le facteur de von Willebrand (vWF), une protéine impliquée dans l'agrégation plaquettaire (Månsson et al. 2007). Cette fraction de CSH présente un biais de différenciation plaquettaire et aussi fréquemment un biais de différenciation vers le lignage myéloïde à long-terme alors que les CSH n'exprimant pas ce facteur sont biaisées vers la lignée lymphoïde (Sanjuan-Pla et al. 2013). Seules les CSH vWF⁺ peuvent donner naissance à des CSH vWF⁻, suggérant que les CSH biaisées vers la lignée mégacaryotaire/plaquettaire se situent au sommet de la hiérarchie des CSH (Sanjuan-Pla et al. 2013). Les CSH avec une expression élevée de CD150 sont enrichies en transcrits vWF et ont un biais

myéloïde (Kent et al. 2009; Beerman et al. 2010; Sanjuan-Pla et al. 2013). L'expression de CD41 ou c-Kit est retrouvée dans un sous-type de CSH biaisés mégacaryocytaire (Gekas et Graf 2013; Shin et al. 2014).

Les technologies de séquençage de cellule unique offrent davantage de possibilités d'étudier cette hétérogénéité des CSH et permettent une dissection à haute résolution de l'hématopoïèse (Pan Zhang et al. 2022).

Les marqueurs de CSH humaines

A la fin des années 80, le CD34 est le premier marqueur de surface utilisé pour purifier les CSH humaines. Des essais de culture *in vitro* ont montré que la population CD34⁺ est très hétérogène composée de cellules multipotentes et oligopotentes (Seita et Weissman 2010). Le CD34 en association avec le CD90 (Thy1) a permis de définir une population capable de générer tous les lignages hématopoïétiques dans des souris SCID (Baum et al. 1992). Parmi les CD34⁺, seulement 10% n'expriment pas le CD38 et sont plus enrichis en cellules productrices de colonies de plusieurs lignages (Huang et Terstappen 1994; Miller et al. 1999). Les CSH humaines expriment d'autres marqueurs tel que FLT3, CD49f (Sitnicka et al. 2003; Notta et al. 2011) et ne présentent pas ou peu CD45A (Majeti, Park, et Weissman 2007). Plusieurs études ont montré que les cellules CD34⁺ CD38⁻ CD90⁺ CD45RA⁻ CD49f⁺ sont capables de reconstituer l'hématopoïèse à long terme dans des souris NOD/SCID et sont l'équivalent des LT-CSH murines (Notta et al. 2011). La population CD34⁺ CD38⁻ CD90⁻ CD45RA⁻ CD49f⁻ est quant à elle capable de reconstituer l'hématopoïèse transitoirement et correspond à une fraction enrichie en ST-CSH et de progéniteurs multipotents (MPP). Au cours de la différenciation, le marqueur CD38 est progressivement exprimé [Tableau 2].

LT-CSH	ST-CSH/ MPP	CLP	CMP	GMP	MEP
Lin⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻
CD34⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺
CD38⁻	CD38 ^{low}	CD38 ^{low}	CD38 ⁺	CD38 ⁺	CD38 ⁺
Thy1⁺	Thy1 ⁻	CD45RA ⁺	CD45RA ⁻	CD45RA ⁺	CD45RA ⁻
CD45RA⁻	CD45RA ⁻	CD10 ⁺	Flk2 ⁺	Flk2 ⁺	Flk2 ⁻
CD49f⁺	CD49f ⁻	CD7 ⁻	CD10 ⁻	CD10 ⁻	CD10 ⁻
			CD7 ⁻	CD7 ⁻	CD7 ⁻

Tableau 2. Marqueurs phénotypiques des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques humaines

Capacité des CSH à exclure des colorants fluorescents

L'autre stratégie de purification de CSH est fondée sur l'utilisation de colorants tel que le Hoechst (colorant qui se fixe sur les molécules d'ADN). Les CSH ont une forte expression de transporteurs membranaires Bcrp1/ABCG2 qui leur permettent d'éjecter les colorants (Zhou et al. 2001). Une petite population distincte appelé « side population, SP » retenant faiblement les colorants est identifiée comme très enrichi en CSH (Goodell et al. 1996). De façon similaire, les CSH fixent faiblement le colorant Rhodamine 123 due à une faible activité mitochondriale (M. Kim et al. 1998). Il existe d'autres colorants ou substrats pour isoler des fractions enrichies en CSH, bien que le Hoechst et la Rhodamine123 soient les plus souvent utilisés.

4. Epigénétique dans les CSH

L'hématopoïèse est un processus finement régulé et implique le contrôle de l'expression des gènes qui maintiennent la balance entre l'auto-renouvellement des CSH et leur propre différenciation en tous les lignages cellulaires du sang. Lorsque les CSH s'auto-renouvellent, au moins une des deux cellules filles héritent d'un profil d'expression génique hautement similaire voir identique à la cellule souche mère. Au contraire, des changements importants du profil transcriptomique des CSH sont observées au cours de la différenciation (Vedi et al. 2016).

a. Généralités sur l'épigénétique

L'épigénétique est un des acteurs majeurs de la régulation de l'hématopoïèse. Elle est définie par l'étude dans les changements de l'expression des gènes et / ou des génomes qui sont héréditaires durant la méiose et/ou mitose qui ne résulte pas un changement de la séquence nucléotidique de l'ADN et ce en absence du ou des facteurs qui ont induit ce changement (Fincham 1997; Allis et Jenuwein 2016). Les modifications épigénétiques ont des conséquences sur la structure de la chromatine et par conséquent sur l'expression des gènes. Les modifications épigénétiques sont réversibles et peuvent aussi être altérées en réponse à des signaux environnementaux (Aggarwal et al. 2015; Kramer et Challen 2017).

Les mécanismes épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARN non codants.

La méthylation de l'ADN a lieu principalement dans le contexte dinucléotides CpG qui sont retrouvés dans les promoteurs de gènes et conduit le plus souvent à la répression du gène. Elle requiert la liaison du groupe méthyl sur le carbone 5 des cytosines (5-mC) par les ADN méthyltransférases (DNMTs) (Gujar, Weisenberger, et Liang 2019). Ces enzymes sont classés en deux groupes :

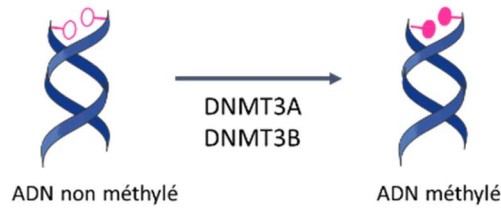
- **les DNMT de maintien** (DNMT1) qui permettent après la réplication de l'ADN de méthyler le brin nouvellement synthétisé pour assurer la pérennité des profils de méthylation.
- **les DNMT de novo** (DNMT3a, DNMT3b) qui établissent initialement les profils de méthylation de l'ADN indépendamment de la réplication de l'ADN [Figure 6].

La déméthylation de l'ADN peut se faire de manière active par l'intervention d'enzymes tel que (H. Wu et Zhang 2014) :

- **des glycosylases**, des enzymes de réparation de la base endommagés (BER) qui clivent la base azotée en laissant le squelette sucre-phosphate intact
- **des nucléases**, des enzymes de réparation du nucléotide endommagés (NER) qui clivent le squelette sucre-phosphate
- **par des ADN déméthylases**, les enzymes *Ten-Eleven Translocation* (TET) qui hydroxylent la 5-mC en 5-hydroxy-méthyl-cytosine (5-hmC) [Figure 6].

En revanche la déméthylation passive survient après plusieurs divisions cellulaires successives en absence de la machinerie de maintenance de méthylation d'ADN (H. Wu et Zhang 2014).

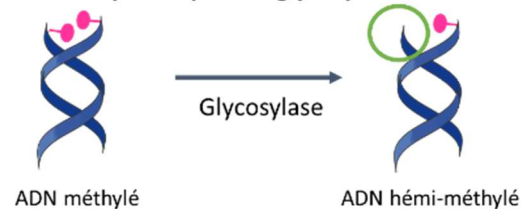
- **Les ADN méthyl-transférases *de novo***



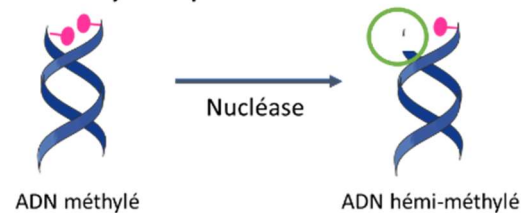
- **Les ADN méthyl-transférases de maintien Post réplcatif**



- **Déméthylation par des glycosylases**



- **Déméthylation par des nucléases**



- **Déméthylation par des ADN déméthylases**

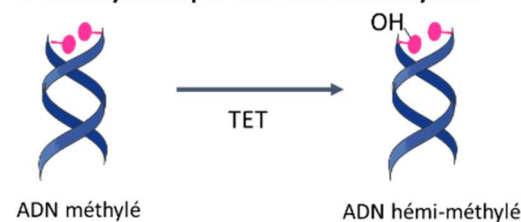


Figure 6. Régulation de la méthylation de l'ADN.

La méthylation de l'ADN est effectuée par les ADN méthyl-transférases de novo (DNMT3A/3B) et de maintien (DNMT3). La déméthylation de l'ADN peut être réalisée par des glycosylases, par des nucléases ou bien par des ADN déméthylases (TET).

Les queues histones peuvent subir des modifications covalentes réversibles dont les deux les plus communes sont l'acétylation/désacétylation par les histones acétyltransférases (HAT)/désacétylases (HDAC), la méthylation/déméthylation par les histones méthyltransférases (HMT) /déméthylases (KDM) (Sharma et Gurudutta 2016) [Tableau 3].

Enzymes	Catégories	Marques épigénétiques	Effet transcriptomique
MOZ, CBP	HAT	Acétylation	Activation
SUV39H1, SUV39H2, SETDB1, SETDB2	HMT	H3K9me3 <i>(majoritairement)</i>	Répression
G9A, GLP	HMT	H3K9me1/2	Répression
PRC2 (EZH1, EZH2)	HMT	H3K27me3	Répression

Tableau 3. Quelques exemples d'enzymes régulant les marques d'histones

L'ADN est chargé négativement du fait des groupements phosphates alors que les histones sont chargées positivement par la présence de lysines et arginines, ce qui favorise l'interaction électrostatique entre l'ADN et les histones. L'acétylation des histones diminue la charge positive des histones, provoquant la décompaction de la chromatine et facilitant ainsi l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle.

La méthylation des histones peut avoir lieu sur des résidus lysines et des arginines. Les modifications les plus étudiées sont celles touchant les résidus lysines de l'histone H3. Contrairement à l'acétylation, la méthylation des histones n'altère pas la charge globale du nucléosome. Elle joue un rôle important dans le recrutement de protéines qui régulent l'accessibilité de l'ADN (Sims et al. 2006). L'effet activateur et répresseur de la marque épigénétique est dépendant de plusieurs paramètres dont le type d'histone, la position de la lysine méthylée de l'histone et le niveau de méthylation (mono-, di-, tri).

Les ARN non-codants sont classés en deux catégories : les petits ARN non codant (miARN, siARN, piARN...) et les long ARN non codant (LncARN) dont la longueur dépasse 200 nucléotides (Z. Zhang et al. 2021; Statello et al. 2021). Les mécanismes d'action des ARN non-codant ne seront pas approfondis dans le mémoire. Ce choix répond à une préoccupation résidant dans la volonté de limiter le volume du présent mémoire. Néanmoins cette notion sera abordée sommairement à la section 1.4.D.

Il existe une connexion étroite entre la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARN non codant. Fuks *et al.* montrent que l'histone méthyltransférase SUV39H1, responsable de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3), est capable d'interagir avec les DNA méthyltransférases DNMT3A et

DNMT1. De plus les protéines se liant à l'ADN méthylé, MeCP2 et MBD1, favorisent le dépôt de la marque H3K9me3 renforçant la répression de la chromatine (Fuks et al. 2003). L'interaction la plus décrite entre les LncARN et la méthylation des histones concerne le LncARN HOTAIR et le complexe PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) qui médie la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) et réprime la transcription des gènes cibles (Portoso et al. 2017). Le c5orf66-AS1, un LncARN présent dans le premier intron de *C5ORF66*, est retrouvée hyperméthylé et ainsi réprimé dans les adénocarcinomes gastriques, démontrant l'étroite connexion entre certains LncARN et la méthylation de l'ADN (W. Guo et al. 2018).

Les interactions de différentes marques épigénétiques répressives caractérisent l'hétérochromatine. Elle est définie comme un état compacté de l'ADN identifié par la méthylation de l'ADN, l'hypo-acétylation des histones et des méthylations des histones (H3K27me3, H3K9me3, H3K9me2). Le recrutement de co-represseur tel que la protéine KAP1 (*KRAB domain associated protein 1*), aussi appelé KRIP1 (*KRAB-A-interacting protein 1*) ou TRIM28 (*tripartite motif-containing 28*) ou TIF-1 β (*transcription intermediary factor*) au niveau de séquences spécifiques de l'ADN joue un rôle majeur dans l'apposition de la marque H3K9me3 et la formation de l'hétérochromatine [Figure 7].

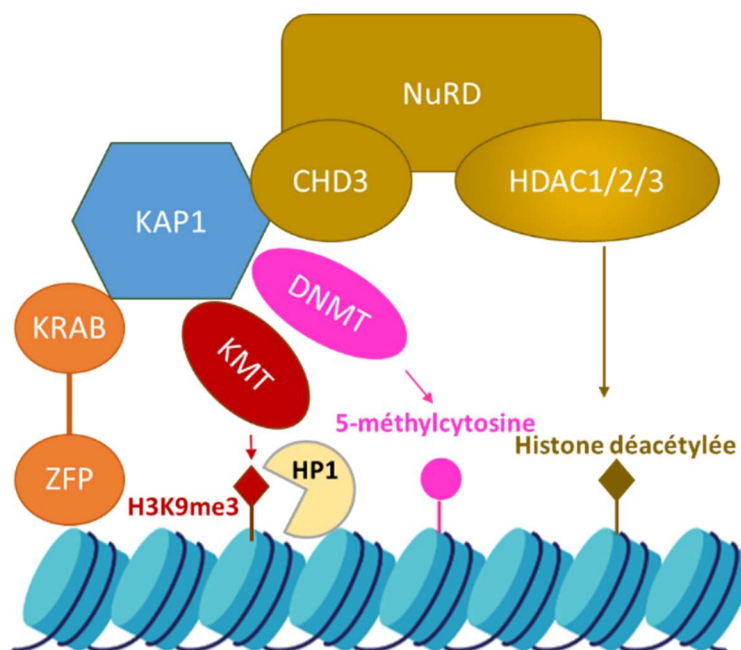


Figure 7. KAP1, un acteur majeur de l'hétérochromatine.

KAP1 recrute :

- des régulateurs transcriptionnels appelé KRAB-ZFPs (Kruppel-associated box domain zinc finger proteins). Ce sont des protéines ayant un domaine doigt zinc qui

interagissent avec l'ADN et un domaine KRAB qui réprime la transcription (Groner et al. 2010).

- des modificateurs d'histones tel que SETDB1, SUV39H1 et HDAC1/2 qui aboutissent aussi à la répression transcriptionnelle (Groner et al. 2010).
- des enzymes remodelant la chromatine tel que CHD3 (*chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3*) et HP1 (*heterochromatin protein 1*) qui reconnaissent les histones méthylées et favorisent la compaction de la chromatine (Groner et al. 2010).

b. Méthylation de l'ADN : régulation et rôle dans les CSH

Les modifications dans la méthylation de l'ADN influencent le profil transcriptomique durant l'hématopoïèse et sont souvent associés à des pathologies hématopoïétiques (Gore et Weinstein 2016).

DNMT3A et DNMT3B ayant un rôle dans la méthylation *de novo* de l'ADN sont impliqués dans la répression des gènes d'auto-renouvellement dans les CSH (Tadokoro et al. 2007). Une perte de *Dnmt3a* conduit à l'expansion de la population CSH due à une augmentation de l'expression des gènes d'auto-renouvellement (*Runx1* et *Gata3*) aux dépens des gènes de différenciation. La délétion de *Dnmt3a* et *Dnmt3b* dans les CSH améliorent l'auto-renouvellement via l'activation de la signalisation β -caténine (Challen et al. 2014). De plus, *DNMT3A* est l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans les maladies myéloïdes tel que la leucémie myéloïde aiguë (LAM) et les syndromes myélodysplasiques (SMD) (Kramer et Challen 2017). Par contre *DNMT3B* est rarement muté dans ces pathologies bien qu'il ait une fonction de suppresseur de tumeur (Schulze et al. 2016).

La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans le contrôle de l'engagement des CSH vers une lignée donnée au dépend d'autres. Broske *et al.* montrent qu'une réduction de l'activité de DNMT1 dans les CSH murines conduit à des défauts dans leur potentiel de repopulation et une altération dans leur capacité à s'engager dans la voie de différenciation lymphoïde. Ces résultats suggèrent que DNMT1 est impliqué dans la régulation de l'auto-renouvellement des CSH et aussi dans la décision du devenir des CSH (Bröske et al. 2009). Bien que *DNMT1* soit rarement muté dans les LAM, elle est retrouvée surexprimée. Elle réprime l'expression de *CDKN2B*, un gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine P15. L'expression de *CDKN2B* est perdue dans environ 80% des cas de LAM, et une hyper-méthylation de son promoteur est fréquemment associée à une transformation de la maladie vers un phénotype plus grave (Fares, Wolff, et Bies 2011). DNMT1 apparaît comme être une cible thérapeutique prometteuse pour cette pathologie.

Tout comme *DMNT3A*, *TET2* est un des gènes les plus fréquemment retrouvés mutés dans les hémopathies malignes myéloïdes (Delhommeau et al. 2009; Langemeijer et al. 2009; Abdel-Wahab et al. 2009). Des CSH murines déficientes pour *Tet2* ont une augmentation de leur capacité d'auto-renouvellement et de repopulation comparés, aux CSH sauvages (Moran-Crusio et al. 2011; Zhe Li et al. 2011a; Quivoron et al. 2011). A long terme, certaines souris *Tet2*^{-/-} développent un phénotype proche de la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) incluant une monocytose, une splénomégalie et une hématopoïèse extra-médullaire, avec une longue période de latence et une pénétrance variable (Moran-Crusio et al. 2011; Zhe Li et al. 2011a; Quivoron et al. 2011). D'autres souris *Tet2*^{-/-} présentent une accumulation d'une population anormale de cellules B prédisposant aux développements de tumeurs lymphoïdes (Quivoron et al. 2011; Mouly et al. 2018). Le développement d'une malignité complète dépend de l'apparition de mutations additionnelles (Quivoron et al. 2011; Pan et al. 2017; Mouly et al. 2018).

Des souris *Tet2*^{-/-} déplétées en *Tet3* développent une leucémie myéloïde avec une pénétrance totale et hautement agressive en quelques semaines (An et al. 2015). Bien que *TET1* soit rarement muté dans les pathologies hématopoïétiques humaines, sa délétion dans les CSH murines conduit à une augmentation de cellules B et induit le développement de lymphome de type B (Cimmino et al. 2015). Une dichotomie pour la régulation épigénétique des CSH dans leur potentiel B est ainsi observée avec DNMT1 qui semble nécessaire pour les engager vers la lignée B et TET1 qui restreint la production des cellules B (Bröske et al. 2009; Cimmino et al. 2015; Kramer et Challen 2017).

c. Principales modifications post-traductionnelles des histones : régulation et rôle dans les CSH

i. L'acétylation des histones

Les enzymes responsables du dépôt (HAT) ou de l'effacement (HDAC) des marques d'acétylation des histones régulent l'auto-renouvellement des CSH, leur prolifération et leur différenciation vers les progéniteurs hématopoïétiques engagés. Les CSH murines délétées pour *Cbp* (une HAT) ont des anomalies d'auto-renouvellement et un biais de différenciation vers la lignée myéloïde (Chan et al. 2011). Les souris déficientes pour *Moz* (une HAT) ont des CSH présentant des défauts de reconstitution du système hématopoïétique et une réduction des progéniteurs de tous les lignages (T. Thomas et al. 2006). Les CSH et progéniteurs (CSPH) en absence d'activité HAT de MOZ ont une

augmentation de l'expression de *P16^{Ink4a}* (un répresseur du cycle cellulaire), provoquant leur sénescence. MOZ est décrit comme capable d'interagir directement sur le promoteur de *P16^{Ink4a}*, suggérant qu'il pourrait introduire des changements du profil d'acétylation des histones, et altérer la liaison des régulateurs transcriptionnels de *P16^{Ink4a}*. La perte de *P16^{Ink4a}* restaure la capacité proliférative des progéniteurs ayant un défaut de l'activité HAT de MOZ. Ces résultats mettent en évidence que l'activité HAT de MOZ est requise pour réprimer l'expression de *P16^{Ink4a}* et pour protéger les CSH d'entrer précocement en sénescence (Perez-Campo et al. 2014).

Les HDAC sont aussi impliqués dans le développement de tous les lignages et à différents stades cellulaires, de la CSH aux cellules matures effectrices (Pan Wang, Wang, et Liu 2020). Les HDAC interagissent avec de nombreux facteurs de transcriptions et/ou d'autres cofacteurs régulant le niveau d'acétylation des histones permettant de moduler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'hématopoïèse. HDAC1 et HDAC2 sont des régulateurs essentiels de la production des CSH et assurent un rôle majeur dans l'homéostasie de l'hématopoïèse. La délétion simultanée de *Hdac1* et *Hdac2* conduit à la perte des CSH, aboutissant à une aplasie médullaire (Heideman et al. 2014). L'inhibition de l'expression de *HDAC1* dans les CD34⁺ humain de la moelle osseuse conduit à la réduction des colonies érythroïdes et à l'augmentation des colonies granulocyte/macrophage. Ce résultat suggère que HDAC1 joue un rôle important dans la détermination du lignage durant l'hématopoïèse (Wada et al. 2009). La perte de HDAC3 favorise l'expansion des CD34⁺ sans affecter le potentiel de différenciation. HDAC3 est ainsi un régulateur négatif de l'expansion des CSH humaines (Elizalde et al. 2012).

Des inhibiteurs de HDAC sont utilisés pour traiter les leucémies car ils permettent la réexpression de gènes suppresseurs de tumeurs dans les CSPH leucémiques. Ces agents empêchent la prolifération des CSPH leucémiques et favorisent leur différenciation (Minucci et Pelicci 2006). L'utilisation d'acide valproïque, un inhibiteur de HDAC permet de sensibiliser les cellules de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC) aux récepteurs de mort (Lagneaux et al. 2007).

ii. La méthylation des histones

H3K27me3

H3K27me3 est une marque répressive déposée par le complexe répresseur polycomb 2 (PRC2) composé de plusieurs protéines dont deux avec une activité catalytique : EZH1 et EZH2.

Ezh1 n'est pas requis pour l'hématopoïèse foétale alors que sa délétion dans les CSH adultes altère la lymphopoïèse (Hidalgo et al. 2012). Des expériences de transplantation de CSH de souris adultes délétées pour *Ezh1* montrent l'implication de cet acteur de l'épigénétique dans l'auto-renouvellement et la maintenance des CSH adultes. Les CSH avec une inactivation de *Ezh1* ont une augmentation des transcrits *P16^{Ink4a}* et *Arf*, deux activateurs du programme de sénescence. La délétion de la région *Cdkn2a* (codant pour *P16^{INK4A}* et *ARF*) dans les CSH *Ezh1^{-/-}* restaure la prolifération et la survie des CSH. Ces résultats suggèrent le rôle important de EZH1 dans la protection des CSH adultes de la sénescence (Hidalgo et al. 2012).

Les embryons de souris déficients en *Ezh2* meurent d'anémie à cause d'une expansion insuffisantes des CSH et progéniteurs et d'une érythropoïèse défectueuse dans le foie foetal (Mochizuki-Kashio et al. 2011). La délétion de *Ezh2* dans les CSH de souris adultes affecte la différenciation mais pas l'auto-renouvellement (Mochizuki-Kashio et al. 2011) ; Les souris avec un knock-out (KO) conditionnel de *Ezh2* ont un blocage de la différenciation des cellules B à cause d'un défaut de réarrangement de la chaîne lourde des immunoglobulines et un blocage de la différenciation des lymphocytes T au stade $CD4^+ CD8^-$ dans le thymus (I.-H. Su et al. 2003; I.-H. Su et al. 2005). Dérégulé dans de nombreux cancers, EZH2 peut avoir un rôle oncogène ou suppresseur de tumeur dépendant du contexte cellulaire. Des mutations perte de fonction de *EZH2* sont fréquemment retrouvés par exemple chez les patients atteints de myélofibrose (Rinke et al. 2020). A l'inverse, les patients avec une SMD à haut risque ou une LAM ont une surexpression de *EZH2* (F. Xu et al. 2011; Rinke et al. 2020). Dans des modèles de souris LAM (exprimant *Moz-Tif2* ou *MLL-Af10*) et de souris xénogreffées par des cellules de patients, l'utilisation d'un inhibiteur de EZH1 et EZH2 conduit à une diminution du nombre de cellules souches leucémiques, empêche la progression de la maladie et prolonge la survie des souris (Fujita et al. 2018).

H3K9me2

Le complexe hétérodimérique G9A (*EHMT2*) et GLP (*EHMT1*) dépose les marques H3K9me1 et H3K9me2, associés le plus souvent à une répression de la transcription. Les deux protéines sont aussi capables de se fixer sur les modifications H3K9me1/2, favorisant la propagation de H3K9me2 le long de la chromatine (R. Collins et Cheng 2010). L'absence de *G9a* durant le développement embryonnaire de la souris est létale, suggérant le rôle essentiel de G9A dans l'embryogenèse (Tachibana et al. 2002). Bien que H3K9me2 puisse être retrouvée dans les régions de l'euchromatine et l'hétérochromatine, la perte de *G9a* dans les cellules souches embryonnaires (ES, *embryonic stem*) provoque une diminution de cette marque principalement dans l'euchromatine (Tachibana et al. 2002). Le niveau de méthylation de H3K9 dans les régions de l'hétérochromatine peut être régulé par d'autres HMT tel que SUV39H1 (Peters et al. 2001). En 2012, Chen et al. montrent par des expériences d'immunofluorescence que la marque H3K9me2 est diffuse dans le noyau des CSH humaines immatures (CD34⁺ CD90⁺ CD38^{low} CD45RA⁻) alors qu'elle s'organise en foyers dans les CSPH (cellules CD34⁺) (X. Chen et al. 2012). Cette différence de répartition sera discutée ultérieurement. Schones et al. mettent en évidence par des analyses de ChIP-seq dans les cellules CD34⁺ de sujet sain une localisation préférentielle de la marque H3K9me2 aux régions déméthylées de l'ADN (Schones et al. 2014). Le traitement avec l'UNC0638, un inhibiteur de G9A/GLP, retient les CSPH dans un état de « souche » et retarde leur engagement vers la lignée myéloïde. Ces résultats démontrent l'importance de G9A et GLP dans la spécification des CSPH (X. Chen et al. 2012). KDM3B est une H3K9me1/2 déméthylase impliquée dans l'activation transcriptionnelle de l'oncogène *LMO2* dans la leucémie lymphoblastique aigue (LLA) (J.-Y. Kim et al. 2012). En 2018, Li et al. montrent que l'inactivation de *Jmjd1b*, une enzyme déméthylant H3K9me2, induit chez les souris un phénotype de type SMD (S. Li et al. 2018). Ainsi, bien que les niveaux globaux de H3K9me2 augmentent au cours de l'hématopoïèse, les histones déméthylases ciblant H3K9me2 sont également nécessaires à l'activation correcte des gènes pendant la maturation et la différenciation des CSH (X. Chen et al. 2012; J.-Y. Kim et al. 2012; S. Li et al. 2018).

Dans des modèles de souris LAM (exprimant *HoxA9* et *Meis*, deux gènes fréquemment mutés dans cette pathologie), la perte de *G9a* provoque un retard de la progression de la maladie et une réduction de la fréquence des cellules souches leucémiques (Lehnertz et al. 2014).

H3K9me3

H3K9me3 est une marque répressive retrouvée dans les régions de l'hétérochromatine. Elle est déposée principalement par les méthyltransférases SUV39H1, SUV39H2 et SETDB1, et est reconnue par les protéines HP1 (Koide et al. 2016; Monaghan et al. 2019). Les protéines HP1 interagissent avec des protéines adaptatrices telles que KAP1 (codé par le gène *TRIM28*), qui coordonne la compaction de la chromatine en s'associant et en recrutant des acteurs de l'épigénétique, tels que des HDAC, des DNMT et des ARN d'interférences (Maison et Almouzni 2004). La délétion de *Trim28* restreinte au tissu hématopoïétique des souris conduit à une anémie hypoproliférative sévère (Barde et al. 2013). En 2014, Miyagi *et al.* montrent que la délétion de *Trim28* dans les souris induit la division et l'apoptose des CSH, aboutissant à une diminution drastique du pool de CSH dans la moelle osseuse (Miyagi et al. 2014). La perte de *Kap1* dans les CSPH murines (LSK) déclenche l'expression ectopique de gènes non hématopoïétiques et une diminution significative des protéines HP1. Ces résultats suggèrent le rôle critique de l'axe KAP1-HP1 dans la répression des gènes non hématopoïétiques dans les CSH (Miyagi et al. 2014). Deux années plus tard, de façon similaire, Koide *et al.* observent que la perte de *Setdb1* codant pour une méthyltransférase qui coopère avec KAP1 et HP1, conduit à une déplétion des CSPH (Koide et al. 2016). Ils constatent également que les CSPH déficientes en *Setdb1* ont une expression ectopique de gènes non hématopoïétiques tel que des gènes impliqués dans la voie de la néoglucogenèse, altérant l'homéostasie métabolique (Koide et al. 2016). L'ensemble de ces résultats souligne le rôle crucial de H3K9me3 dans la préservation de la signature transcriptionnelle spécifique des CSH (Miyagi et al. 2014; Koide et al. 2016).

Uguarte *et al.* montrent qu'une condensation progressive de la chromatine a lieu au cours de la différenciation cellulaire des CSH murines, impliquant la relocalisation de H3K9me3 (Uguarte et al. 2015). La perte de *Suv39h1* et de *Suv39h2* diminue le potentiel de reconstitution hématopoïétique des CSH murines et induit un biais de différenciation vers le lignage myéloïde aux dépens de la lignée lymphoïde (Keenan et al. 2020). La voie SUV39H1-H3K9me3-HP1 participe au maintien de la répression des loci *Th1*, assurant la stabilité du lignage des lymphocytes T auxiliaires *Th2* (Allan et al. 2012). Djeghloul *et al.* mettent en évidence que SUV39H1 est aussi impliquée dans le potentiel de différenciation B des CSH (Djeghloul et al. 2016). Des souris déficientes pour *Suv39h1* développent des lymphomes B tandis que la surexpression de *Suv39h1* conduit à une altération de la différenciation érythroïde (Peters et al. 2001; Czvitkovich et al. 2001). En 2020, Chu et al. montrent que l'expression de *SUV39H1* diminue dans les CD34⁺ de patients atteints de LAM avec réarrangement du gène *MLL* par rapport à

des individus sains et aussi dans les cellules souches leucémiques (CSL, c-Kit+) de modèles de souris LAM (induits par les fusions MLL-AF9 et MLL-NRIP3) (Chu et al. 2020). De plus, la surexpression de *Suv39h1* augmente la latence de la leucémie et diminue la fréquence des CSL dans les modèles de souris LAM tandis que la perte de *Suv39h1* accélère la progression de la maladie avec une nombre accrue de CSL (Chu et al. 2020). Ces données mettent en évidence l'implication de SUV39H1 dans la différenciation des cellules hématopoïétique et sa dérégulation dans le développement et/ou la progression de maladies hématopoïétiques.

H3K4me3

H3K4me3 est une marque activatrice retrouvée dans des régions promotrices et aux sites d'initiations de la transcription des gènes. Cette marque protège les promoteurs de la méthylation de l'ADN, et ainsi permet de garder une chromatine ouverte et accessible à la machinerie transcriptionnelle (Kramer et Challen 2017). Dans les CSH, des gènes codant pour des facteurs de transcription impliqué dans l'engagement cellulaire tels que C/EBP α , Ebf1, Pax5, Meis1, Gata2 et Gata3 ont des promoteurs bivalents ayant à la fois des marques activatrices tel que H3K4me3 et des marques répressives comme H3K27me3 (Kramer et Challen 2017). Chen *et al.* montrent qu'en plus d'être enrichie dans les îlots CpG la marque H3K9me2 est aussi présente au niveau des sites d'initiation de transcription, là où est retrouvée H3K4me3 (X. Chen et al. 2012). Les gènes avec des promoteurs bivalents ne sont généralement pas exprimés, ou très faiblement (Kramer et Challen 2017). Ces promoteurs sont dans un état métastable prêts à être activés ou réprimés. Lorsque les CSH s'engagent vers une voie de différenciation, une réduction de promoteurs bivalents est observée. En effet, lors du processus de différenciation, la marque activatrice ou répressive prendra le dessus, dépendant du gène, du type cellulaire (Weishaupt, Sigvardsson, et Attema 2010) [Figure 8].

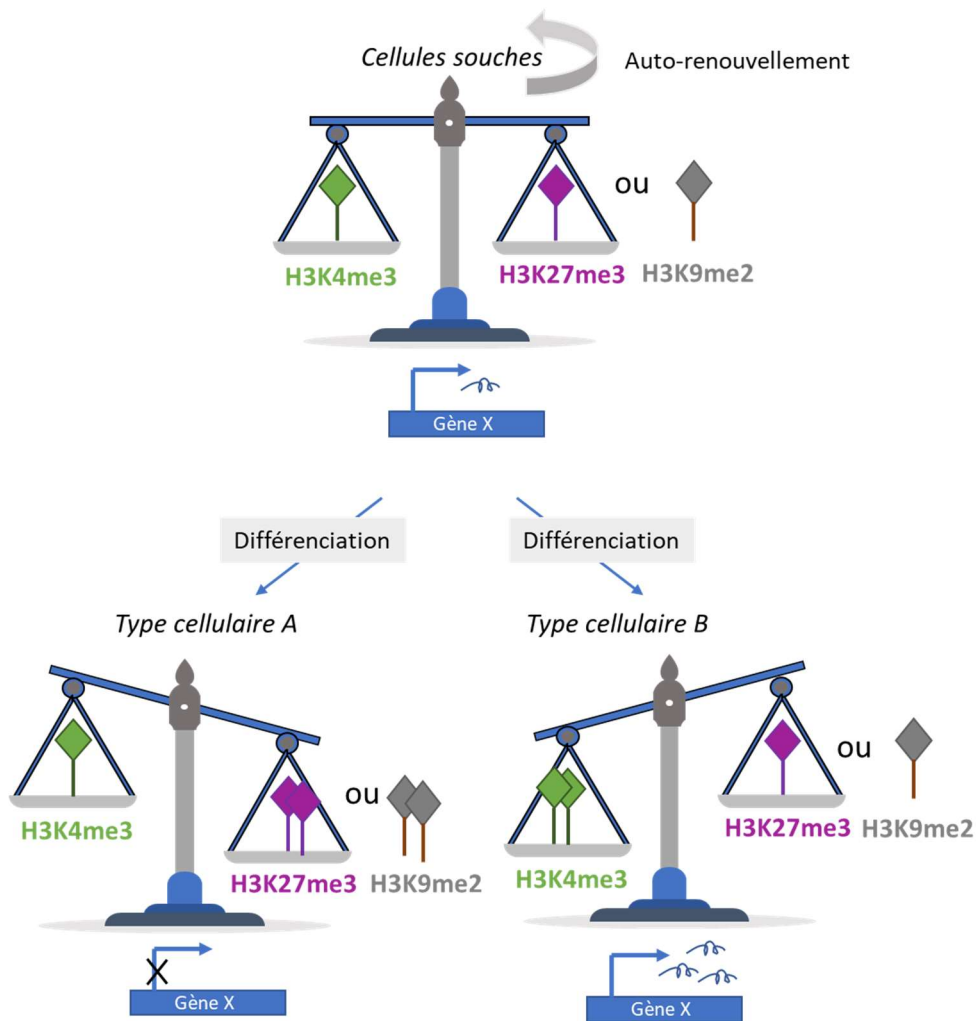


Figure 8. Un état métastable de la chromatine dans les cellules souches, caractérisé par une chromatine bivalente.

Le gène X possède à la fois la marque activatrice H3K4me3 et la marque répressive H3K27me3 (ou H3K9me2), conduisant à une minime ou une quasi-absence d'expression dans les cellules souches. Au cours de la différenciation, la marque H3K27me3 (ou H3K9me2) prend le dessus dans le type cellulaire A conduisant à une répression de l'expression du gène X. A l'inverse, dans le type cellulaire B, la marque H3K4me3 prend l'avantage conduisant à une activation de l'expression du gène X.

d. Les ARN non codant

Les LncARN régulent de nombreux processus biologiques dans les CSH (Xu Zhang et Hu 2016). Venkatraman *et al.* mettent en évidence que l'expression de *H19*, un LncARN, a un rôle critique dans la maintenance des CSH en quiescence (Venkatraman et al. 2013). La comparaison du transcriptome des CSH et des cellules hématopoïétiques engagées dans un lignage a permis d'identifier 159 LncARN enrichis dans les CSH (Luo

et al. 2015). L'inhibition de l'expression de deux des LncARN (*LncHSC-1/2*) enrichis dans les CSH murines compromet l'auto-renouvellement des CSH et leur destin cellulaire (Luo et al. 2015).

Les miARN jouent un rôle important à toutes les étapes de l'hématopoïèse (Vasilatou et al. 2010). En 2010, Guo *et al.* montrent que la forte expression de *miR-125a* dans les CSH murines permet d'augmenter la taille du pool de CSH en inhibant l'expression de *Bak1*, un gène pro-apoptotique (S. Guo et al. 2010). La même année, Ooi *et al.* observent que la surexpression de *miR-125b* dans les CSH induit un biais de différenciation vers la lignée lymphoïde en ciblant des gènes pro-apoptotiques *Klf13* et *Bmf* (Ooi et al. 2010). En 2016, Djeghloul et al. montrent que la surexpression de *miR-125b* (ciblant *SUV39H1*) dans les CSH humaines ($CD34^+CD38^-$) de sang de cordon entraîne une diminution de la lymphopoïèse B et un biais de différenciation myéloïde (Djeghloul et al. 2016).

De nombreuses études ont permis d'identifier le rôle oncogène ou suppresseur de tumeur des LncARN et des miARN dans les hémopathies malignes (Mardani et al. 2019; Dieter, Lourenco, et Lemos 2020). Par exemple Yazdi *et al.* mettent en évidence le potentiel oncogène de *PVT1*, un long ARN non codant dans le développement de la LLA (Yazdi et al. 2018). *MiR-155* a un rôle suppresseur de tumeur dans la LAM (Palma et al. 2014; Xiaoyu Zhang et al. 2018). He *et al.* ont identifié un cluster de microARN, *miR17~92* comme un potentiel oncogène dans les lymphomes des cellules B (He et al. 2005). La présence des LncARN et des miARN peut être de bon ou mauvais pronostic (Becerra et García-Alcocer 2020; Dieter, Lourenco, et Lemos 2020; Neaga et al. 2020). La surexpression du LncARN *CASC15* est associée à un meilleur pronostic dans le cadre de la LAL à lymphocytes B de l'enfant avec une translocation $t(12;21)$ et dans la LAM de l'enfant avec une translocation $t(8;21)$ (Fernando et al. 2017). La dérégulation de *miR-335-3p* est associée à un phénotype sévère et contribue au développement d'une chimiorésistance dans la LLA de l'enfant (Pouyanrad, Rahgozar, et Ghodousi 2019).

e. La méthylation de l'adénine en N6 des ARN

La méthylation de l'adénine en N6 (m6A) est la modification la plus abondante, fréquente et conservée des ARN eucaryotes. Tous les types d'ARN (ARNm, ARNt, ARNr, ARN non codant) peuvent être régulés par cette modification. Elle est impliquée dans divers mécanismes : l'épissage, la stabilité, la translocation et la traduction de l'ARN (X. Jiang et al. 2021). En 2019, Cheng *et al.* révèle que la modification m6A a un rôle clé dans le choix du destin des CSH dans le processus de différenciation en modulation

l'ARNm Myc (Cheng et al. 2019). Plus récemment, Yin *et al.* mettent en évidence que la marque m6a sur l'ARNm IGF2BP2 est impliqué dans la maintenance de la fonction CSH en restreignant l'activité mitochondriale (Yin et al. 2022).

Ainsi les marques épigénétiques de l'ADN, des ARN et des protéines (histones) ont un rôle majeur dans les CSH.

5. Vieillessement des CSH

a. Altérations fonctionnelles des CSH avec l'âge

L'homéostasie du système hématopoïétique est un équilibre dynamique entre les mécanismes d'auto-renouvellement, de différenciation, de survie et de mort cellulaire. Des altérations de cette homéostasie sont observées lors d'un stress, du vieillissement et dans les hémopathies malignes.

Aussi bien chez l'Homme que chez la souris le nombre de cellules ayant un phénotype CSH dans la moelle osseuse augmente au cours du vieillissement mais elles présentent plusieurs défauts fonctionnels (S. J. Morrison et al. 1996; G. de Haan et Van Zant 1999; Rossi et al. 2005; Chambers et al. 2007; Pang et al. 2011). L'augmentation du nombre de CSH avec l'âge peut être expliquée par un mécanisme de compensation pour pallier la perte de fonction des CSH avec l'âge (Pang et al. 2011). Une autre raison (non exclusive à la précédente) est le fait que les CSH âgées seraient beaucoup moins quiescentes que les CSH jeunes et ainsi subiraient plus de divisions (Pang et al. 2011). En 2008, Wilson *et al.* observent que les LT-CSH primitives se divisent cinq fois durant toute la vie de la souris. Quelques années plus tard, une étude de Bernitz *et al.* montrent que la cinquième division conduit à la perte totale du potentiel des LT-CSH et ainsi initie de façon irréversible le déclin du système hématopoïétique (Bernitz et al. 2016). Des essais de transplantation en série de CSH murines et humaines âgées mettent en évidence qu'elles ont une baisse de leur capacité d'auto-renouvellement et de reconstitution à long terme (Kamminga et al. 2005; Rossi et al. 2005; Yahata et al. 2011). Cependant on ne sait pas si la dégénérescence de l'hématopoïèse est le résultat d'un véritable changement dans l'auto-renouvellement ou bien d'un changement clonal dans la composition du compartiment des CSH. Ce point est actuellement débattu.

En 2016, Grover *et al.* mettent en évidence par des analyses de RNA-seq à l'échelle unicellulaire une expansion des CSH biaisées vers la différenciation plaquettaire dans les souris âgées (Grover et al. 2016). En 2021, grâce à l'analyse des transcriptomes de 15 000 CSPH murines, Hérault *et al.* identifient de nouveaux et rares sous-types de CSH

qui s'accumulent avec l'âge (Hérault et al. 2021). Bien que la trajectoire de différenciation des CSHP ne soit globalement pas modifiée, la répartition des CSHP âgées le long de cette trajectoire est altérée. En effet, Hérault *et al.* mettent en évidence une diminution de cellules à des stades terminaux de différenciation (destinées à devenir lymphocytes, des neutrophiles et des mastocytes) en faveur des stades initiaux essentiellement celui de LT-CSH (Hérault et al. 2021).

Des anomalies dans le potentiel de différenciation des CSH sont observées avec l'âge. En effet, la transplantation des CSH âgées dans des souris jeunes induit un biais de différenciation des CSH au profit de la lignée myéloïde (Liang, Van Zant, et Szilvassy 2005). De plus, la répartition des progéniteurs myéloïdes (GMP) et lymphoïdes (CLP) change avec l'âge des souris. Rossi *et al.* montrent que des souris âgées ont 1.7 fois plus de GMP et 2.3 fois moins de CLP que les souris jeunes (Rossi et al. 2005). Ce biais dans le potentiel de différenciation est corrélé à des changements de l'expression de gènes dit « pro-myéloïde » et « pro-lymphoïdes ». L'analyse du transcriptome de CSH murines et humaines met en évidence une activation de l'expression de gènes myéloïdes et une diminution de l'expression de gènes lymphoïdes avec l'âge (Rossi et al. 2005; Pang et al. 2011; Rundberg Nilsson et al. 2016).

Grâce à l'étude de plus de 400 transplantations à l'échelle unicellulaire, Yamamoto *et al.* identifient une population de CSH dite « latente » trouvée exclusivement dans la moelle osseuse des souris âgées (Yamamoto et al. 2018). Ces CSH « latentes » sont capables de s'auto-renouveler mais elles ne parviennent pas pour la majorité à se différencier, en particulier vers le lignage lymphoïde après une transplantation primaire. Néanmoins, elles sont capables, après des transplantations uniquement secondaires, de différencier vers tous les lignages. Ces données remettent en question le dogme traditionnel du vieillissement des CSH et les approches actuelles pour définir et tester les CSH (Yamamoto et al. 2018).

Plusieurs études rapportent que le déclin de l'hématopoïèse et du système immunitaire au cours du vieillissement confère un fort risque de développer des maladies infectieuses, des maladies auto-immunes et des leucémies (Warren et Rossi 2009; Kuranda et al. 2011; Geiger, de Haan, et Florian 2013).

Les anomalies observées avec l'âge ne sont pas dues uniquement à des changements intrinsèques aux CSH (*cf. Section 1.5.B*). La niche hématopoïétique et d'autres facteurs extrinsèques à la cellule sont aussi impliqués dans le vieillissement des CSH (Latchney et Calvi 2017). La capacité des cellules à être recruté de la circulation vers la niche vasculaire puis endostéale est appelé le « homing ». Des expériences de

transplantations montrent qu'avec l'âge les CSH présentent des défauts dans leur capacité de homing. En effet, des CSH âgées transplantées dans des souris jeunes et des CSH jeunes transplantées dans des souris âgées ont une capacité de homing similaire mais réduite comparé à des CSH jeunes transplantées dans des souris jeunes (Liang, Van Zant, et Szilvassy 2005). En 2009, Köhler *et al.* observent que les CSH âgées ont une réduction de leur adhérence aux cellules stromales (Köhler et al. 2009).

b. Altérations moléculaires dans les CSH

Les altérations moléculaires des CSH observées au cours du vieillissement sont résumées dans la figure 9.

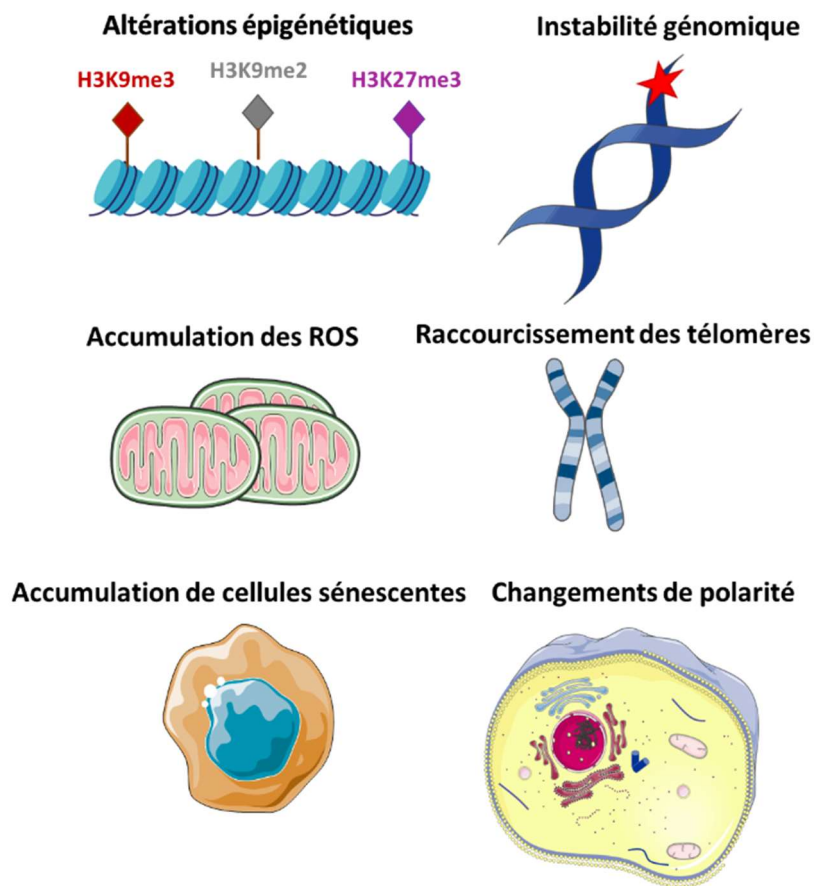


Figure 9. Les altérations moléculaires des CSH lors du vieillissement.

Ce schéma représente les six grandes altérations moléculaires observées dans les CSH âgées décrites dans ce mémoire :

- Un remaniement des marques épigénétiques
- Dérégulation de la réparation des dommages à l'ADN
- Accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS)
- Raccourcissement des télomères
- Accumulation des cellules sénescentes
- Changements de polarité

i. Remaniement de marques épigénétiques

La perte de marqueurs de l'hétérochromatine est observée dans les maladies de vieillissement prématuré tel que le syndrome de Progeria Gilford Hutchinson (HGPS), le syndrome de Werner (Scaffidi et Misteli 2006; W. Zhang et al. 2015).

Sun *et al.* mettent en évidence une réduction de l'expression des régulateurs de l'épigénétique tels que *Ezh2*, *Dnmt1*, *Tet1* et *Tet3* dans les CSH murines âgées. De plus ils observent des remaniements du profil de méthylation de l'ADN et des histones dans les CSH au cours du vieillissement, notamment une augmentation de la méthylation de l'ADN au promoteur de *Runx1*, de la marque répressive H3K27me3 au locus *Ft3*, de la marque activatrice H3K4me3 au promoteur de *Oxr1* (senseur du stress oxydatif) (D. Sun et al. 2014). Dans les CSH de l'Homme et de la souris l'expression de *SUV39H1* et le niveau de H3K9me3 diminuent avec l'âge et aboutissent à une relaxation de l'hétérochromatine. Une surexpression de *SUV39H1* permet d'améliorer le potentiel de différenciation des CSH humaines âgées vers la lignée lymphoïde B (Djeghloul et al. 2016). La restauration de l'expression de *Suv39h1* permet d'augmenter l'espérance de vie chez la drosophile (Wood et al. 2016). Ainsi l'ensemble de ces données suggère une diminution globale de l'hétérochromatine lors du vieillissement. En général, les modifications de la méthylation liées à l'âge comprennent une hypométhylation globale et une hyperméthylation sur des sites spécifiques tel que des promoteurs (Xiao et al. 2016).

Les technologies de séquençage NGS (*next generation sequencing*) utilisées sur des cellules hématopoïétiques provenant d'individus sans maladie hématologique a permis d'identifier plusieurs mutations somatiques récurrentes dans des gènes associés à des hémopathies malignes. La majorité de ces mutations sont sans conséquence fonctionnelle mais certaines peuvent conférer un avantage compétitif à la cellule mutée par rapport aux autres cellules au niveau de la survie, de la prolifération et ainsi favoriser l'émergence clonale (Jaiswal et Ebert 2019). Chez les sujets sains de plus de 70 ans, la prévalence de ces mutations clonales peut dépasser 10% (Busque et al. 2012; Xie et al. 2014; Jaiswal et al. 2014; Genovese et al. 2014). Cette hématopoïèse clonale de signification interminée (CHIP) augmente avec l'âge, témoignant d'une instabilité génomique. Les études de CHIP au cours du vieillissement chez l'Homme montrent que les mutations les plus fréquentes touchent des gènes impliqués dans l'épigénétique tels que *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* (Jaiswal et al. 2014; Zink et al. 2017). Adelman *et al.* montrent que les CSH humaines âgées subissent une reprogrammation épigénétique comprenant une redistribution de la méthylation de l'ADN, une réduction

des marques activatrices H3K27ac, H3K4me1 et H3K4me3. Ces remaniements de l'épigénome ciblent des voies du développement embryonnaire dont l'engagement cellulaire et des voies du cancer, qui sont altérées de façon similaires chez les patients LAM quel que soit leur âge (Adelman et al. 2019). Des analyses de cytométrie de masse à l'échelle unicellulaire (CyToF) révèlent une augmentation de la variabilité de l'épigénome dans les cellules T entre des individus sains avec l'âge, suggérant que le vieillissement n'affecte pas les marques épigénétiques de façon uniforme avec le temps (Cheung et al. 2018).

ii. Dérégulation de la réparation des dommages à l'ADN

Les CSH âgées murines et humaines ont un nombre important de lésion à l'ADN, notamment une augmentation des foci γ H2AX, un marqueur des cassures double brin (CDB) (Rossi et al. 2007; Rube et al. 2011; Moehrl et al. 2015). Rossi et ses collègues testent l'hypothèse selon laquelle l'accumulation des dommages à l'ADN pourrait être le principal mécanisme du déclin des CSH âgées. Ils étudient des modèles de souris présentant des déficiences dans les voies de maintenance de l'intégrité génomique tel que la réparation par excision des nucléotides (NER), la maintenance des télomères, la voie des jonctions d'extrémités non homologues (NHEJ) dans le but d'examiner les réserves des CSH et les fonctions de ces cellules lors du vieillissement. Ces défauts n'épuisent pas le pool de CSH avec l'âge mais elles altèrent les capacités fonctionnelles des CSH, comprenant une perte du potentiel de reconstitution et de prolifération, une augmentation de l'apoptose (Rossi et al. 2007).

Les CSH adultes à l'état de quiescence utilisent la voie du NHEJ pour réparer les CDB (de Laval et al. 2013). Notre équipe a mis en évidence que la thrombopoïétine (TPO) limite la mutagenèse et la perte de fonction à long-terme des CSH induits par des dommages à l'ADN en stimulant une voie dépendante de la DNA-PK, une kinase du NHEJ (de Laval et al. 2013). L'effet protecteur de cette cytokine sur l'intégrité génomique des CSH nécessite une coopération des voies ERK, NF- κ B et IEX-1 (de Laval et al. 2014). Rossi *et al.* montrent qu'une déficience de KU80 (une protéine clé du NHEJ) affecte les capacités fonctionnelles des CSH murines semblable à ceux observés lors du vieillissement (Rossi et al. 2007). Ainsi le maintien de l'intégrité génomique est essentiel pour empêcher le déclin fonctionnel des CSH avec l'âge (J. Lee et al. 2019).

ii. Accumulation des espèces réactives à l'oxygène (ROS)

L'état de quiescence des CSH leur permet d'avoir une activité métabolique faible et ainsi de générer de très faible niveau d'espèces réactive à l'oxygène (ROS). Cependant, avec l'âge les CSH accumulent des niveaux de ROS élevés (Porto et al. 2015).

Les facteurs de transcription de la sous-famille *Forkhead O* (FOXO) jouent un rôle essentiel dans la régulation de la quantité des ROS dans les CSH (Tothova et al. 2007). Des souris déficientes en *Foxo* présentent un phénotype similaire au vieillissement, des hauts niveaux de ROS, un biais de différenciation vers la lignée myéloïde et des signes d'épuisement du pool de CSH après des transplantations en séries (Y.-Y. Jang et Sharkis 2007). Yahata *et al.* montrent que le traitement des CSH humaines avec un inhibiteur de la glutathion synthétase, induisant un haut niveau intracellulaire de ROS, augmentent le niveau de lésions à l'ADN et altèrent le potentiel de reconstitution des CSH. A l'inverse, l'utilisation d'anti-oxydant empêche la perte de fonction des CSH (Yahata et al. 2011).

Le métabolisme cellulaire joue un rôle important dans le maintien des fonctions des CSH tout au long de la vie mais les causes moléculaires responsable de l'altération du métabolisme avec l'âge reste encore mal connues (De Haan et Lazare 2018).

iii. Raccourcissement des télomères

Malgré la présence de l'activité télomérase qui maintient la longueur des télomères dans les CSH, elle n'empêche pas leur raccourcissement au cours des divisions cellulaires et avec l'âge. La télomérase est formée d'une protéine catalytique appelée *telomerase reverse transcriptase* (TERT) et d'une molécule d'ARN complémentaire à l'ADN télomérique (hTR). Fali *et al.* montrent grâce à la méthode TRAP (*Telomere Repeat Amplification Protocol*) que les CSH humaines âgées ont une réduction de l'activité télomérase (Fali et al. 2018). Les CSH murines *mTr^{-/-}* ou *mTert^{-/-}* ont une diminution considérable de leur capacité à subir des transplantations en série par rapport aux CSH sauvages (Allsopp, Morin, DePinho, et al. 2003). Rossi *et al.* montrent que la baisse de la capacité de reconstitution et de prolifération des CSH *mTR^{-/-}* est d'autant plus marquée avec l'âge (Rossi et al. 2007). Bien que les CSH murines surexprimant mTERT n'ont pas de raccourcissement de leurs télomères après la quatrième transplantation, elles ne sont pas capables d'étendre leur capacité répliquative à la cinquième transplantation (Allsopp, Morin, Horner, et al. 2003). Ces résultats suggèrent que dans

les CSH le raccourcissement des télomères n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la senescence réplivative.

iv. Accumulation des cellules sénescentes

Les CSPH humains âgés ont une augmentation de l'expression de *CDKN2B* (P15) et de *CDKN1A* (P21), jouant des rôles importants la senescence et l'arrêt de la division cellulaire. Les CSPH âgées ont une forte expression de la β -galactosidase par rapport à des CSPH jeunes (Fali et al. 2018).

L'irradiation de souris à des doses sub-létales (6.5 Gy) conduit à une augmentation de P16^{INK4A} et SA- β -galactosidase dans CSH LSK⁺ de souris irradiées. Ces résultats suggèrent que l'exposition à l'irradiation conduit à une augmentation de la senescence des CSH (Yong Wang et al. 2006).

L'administration d'un médicament anti-apoptotique ABT263 (un inhibiteur des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-xL) par voie orale à des souris âgées ou irradiées provoque une déplétion des cellules sénescentes, incluant les CSH (Chang et al. 2016). De plus les CSH venant de souris âgées traitées à ATB263 ont une amélioration de leur clonogénicité par rapport à celles des souris âgées non traitées et sont capables de reconstituer l'hématopoïèse à long-terme après transplantation. Ces résultats démontrent que la réduction de cellules sénescentes permet de rajeunir les CSH âgées (Chang et al. 2016).

v. Changements de polarités

Une cellule est définie comme étant polarisée lorsque les organites, les ARNm, les miARN et/ou les protéines sont distribuées de façon non symétrique (Florian et Geiger 2010). La disposition des constituants intracellulaires est due aux réseaux microtubulaires, qui sont régulés par un ensemble de protéines dont Cdc42, une RhoGTPase oscillant entre deux états : actif, lié au GTP et inactif, lié au GDP. Des souris *Cdc42GAP^{-/-}* jeunes présentant un gain de l'activité Cdc42 ont un phénotype de vieillissement prématuré avec une augmentation des cellules myéloïdes et une diminution des cellules T dans le sang périphérique (Florian et al. 2012). L'activation constitutive de Cdc42 induit une dépolarisation de Cdc42 lui-même, de la tubuline et de la marque épigénétique H4K16ac. A l'inverse, une réduction de l'activité de Cdc42 par la CASINE rajeunit la fonction des LT-CSH âgées et restaure le niveau et la distribution spatiale de H4K16ac (Florian et al. 2012). En 2018 Grigoryan *et al.* mettent en évidence que l'augmentation de l'activité de Cdc42 dans les CSH âgées provoque

la répression de la lamine A et C et est corrélée à une altération de l'architecture et du volume nucléaire (Grigoryan et al. 2018). Ces changements dans les CSH âgées sont aussi réversibles en diminuant l'activité de Cdc42 dans les CSH âgées (Grigoryan et al. 2018).

Ainsi au moins certains aspects du processus de vieillissement des CSH âgées (la sénescence, les altérations épigénétiques...) semblent être réversibles dans une certaine mesure (Grigoryan et al. 2018; Wahlestedt et al. 2017).

Le vieillissement mène aussi à la dérégulation des éléments transposables. Cet aspect sera discuté dans la section II. 5.

Introduction

Partie II. Les éléments transposables

1. La découverte des éléments transposables

Dans les années 50, au cours de ses travaux de recherche sur les effets des rayons X sur la cytogénétique, la généticienne Barbara McClintock est la première à découvrir des fragments d'ADN capables de se déplacer dans le génome du maïs. Ces « fragments d'ADN sauteurs » sont maintenant appelés éléments transposables. Elle a observé que parmi ses stocks de maïs irradiés certains maïs avaient des cassures chromosomiques spontanées sans une irradiation supplémentaire. Les premiers éléments transposables identifiés laissent des marques très visible à l'œil nu puisqu'ils sont responsables de la variabilité de la pigmentation des grains de maïs (McClintock 1941; McClintock 1956) [Figure 10]. A l'époque il était difficile d'admettre pour les scientifiques l'idée que l'ADN n'était pas une structure stable. Ses observations sont tout d'abord restées incomprises par la communauté scientifique jusqu'à la découverte de la dysgénésie des hybrides chez la drosophile (Picard 1976). Ce phénomène désigne l'incapacité de produire une descendance fertile lors d'un croisement entre des lignées spécifiques de *Drosophila melanogaster* et est causé par la mobilisation des éléments transposables (Rubin, Kidwell, et Bingham 1982; Bingham, Kidwell, et Rubin 1982). En 1980, Orgel et Crick décrivent les éléments transposables comme des « parasites », « égoïstes », et émettent l'hypothèse selon laquelle ces éléments transposables ne confèrent aucun avantage sélectif ; leur émergence serait due uniquement à leur capacité de répllication autonome (Orgel et Crick 1980). L'acceptation de cette hypothèse par les scientifiques a ralenti les recherches sur la significativité évolutive des éléments transposables.



Figure 10. Les différents pigments du grain de maïs.

(Tiré de Feschotte, Jiang, et Wessler 2002)

La variabilité de couleur du grain de maïs est due à l'insertion ou non d'un élément transposable dans un gène codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse du pigment anthocyanine.

Il a fallu attendre quelques années, après avoir découvert que les éléments transposables sont présents en grand nombre et répartis de façon ubiquitaire dans le génome, pour susciter l'intérêt de la communauté scientifique sur leur origine évolutive et leurs potentielles fonctions biologiques (Leib-Mösch et Seifarth 1995). Les avancées dans les méthodes de séquençage ont permis de montrer que quasiment la moitié des génomes humain et murin sont constitués d'éléments transposables (International human genome sequencing consortium, 2001 ; Mouse genome sequencing consortium, 2002).

Au cours de ces deux dernières décennies, les éléments transposables ont été identifiés et leur classification bien établie selon leur origine, structure et fonction. Il est actuellement indéniable que les éléments transposables ont joué un rôle déterminant dans l'évolution de leurs génomes hôtes et qu'ils sont encore impliqués dans la variabilité génomique (Muñoz-Lopez et al. 2016). Nous verrons dans la section II. 3 que les éléments transposables ont bien d'autres fonctions.

2. Classification des éléments transposables

Les éléments transposables sont définis comme des séquences d'ADN présentant des motifs répétés et capables de se déplacer dans le génome. Ils représentent 45% du génome humain. En 1989, David Finnegan propose la première classification des éléments transposables en deux classes se fondant sur leur mode de transposition (Finnegan 1989) [Figure 11].

Les éléments transposables de classe 1 aussi appelés rétro-éléments (RE) se déplacent selon un mécanisme de «copier-coller » *via* un intermédiaire ARN qui est rétro-transcrit grâce à une transcriptase inverse en une molécule d'ADN et qui est ensuite intégré à un autre endroit dans le génome. Les RE sont subdivisés à leur tour en deux sous-catégories selon qu'ils ont ou non des longues répétitions terminales (LTR, *Long Terminal Repeat*) à leurs extrémités (Feschotte et Pritham 2007).

Les éléments transposables de classe II ou transposons à ADN bougent selon le mode « couper-coller » sous forme de fragment d'ADN. Ils ont un cadre de lecture ouvert (ORF, *Open Reading Frame*) codant pour une transposase et qui est encadrée des deux côtés par des répétitions terminales inversées (TIR, *Terminal Inverted Repeats*). La transposase reconnaît les TIR et excise l'élément à leur niveau pour être intégré à une autre position dans le génome (Feschotte et Pritham 2007). Les transposons à ADN

sont inactifs chez l'Homme. Ils ont été majoritairement actifs durant la période d'évolution précoce des primates et jusqu'à il y a environ 37 millions d'années (Pace et Feschotte 2007).

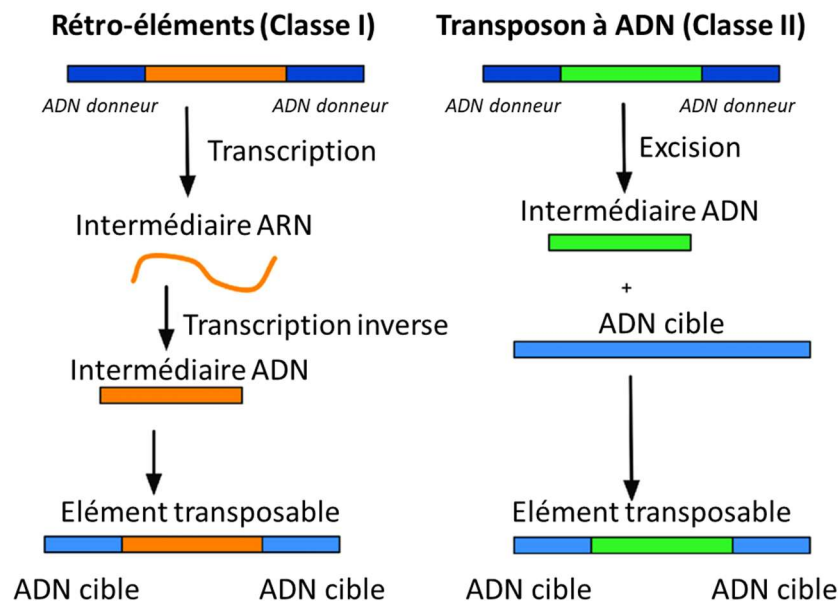


Figure 11. Deux mécanismes de transposition des éléments transposables.

(Adapté de Ågren et Clark 2018)

Les éléments transposables de classe I bougent selon le mode « copier-coller » grâce à un intermédiaire ARN. Les éléments transposables de classe II se déplacent selon le mode « couper-coller » sous forme d'ADN.

En 2007, Wicker *et al.* proposent une classification hiérarchique des éléments transposables pour les eucaryotes en se basant sur la classification de Finnegan et en ajoutant d'autres critères tels que les similarités de séquences et leurs relations structurales (Wicker *et al.* 2007) [Figure 12]. La classification de Wicker est celle la plus utilisée aujourd'hui par la communauté scientifique. Elle inclut les notions « autonome » et « non-autonome », qui sont retrouvées dans les deux classes. Les éléments transposables sont définis comme autonomes s'ils codent toutes les protéines nécessaires à leur transposition. A l'opposé, les éléments transposables non-autonomes ne possèdent pas toute la machinerie nécessaire à leur transposition. Pour la plupart, les éléments transposables non autonomes sont des reliquats mutés des membres de la famille autonome et ont besoin des éléments autonomes pour transposer (Kajikawa et Okada 2002).

Nous allons nous intéresser uniquement aux éléments transposables de classe I (RE) qui est la classe la plus représentée : 43% du génome humain, contre 3% pour les

transposons à ADN. Les RE créent de nouvelles copies d'eux-mêmes lors de la transposition et peuvent atteindre un nombre de copies relativement élevé durant une courte période de l'évolution du fait de leur nature répliquative et leur accumulation continue (Platt, Vandewege, et Ray 2018).

Classification		Structure	TSD
Order	Superfamily		
Class I (retrotransposons)			
LTR	Copia	→ GAG AP INT RT RH →	4-6
	Gypsy	→ GAG AP RT RH INT →	4-6
	Bel-Pao	→ GAG AP RT RH INT →	4-6
	Retrovirus	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6
	ERV	→ GAG AP RT RH INT ENV →	4-6
DIRS	DIRS	↔ GAG AP RT RH YR ↔	0
	Ngaro	→ GAG AP RT RH YR → → →	0
	VIPER	→ GAG AP RT RH YR → → →	0
PLE	Penelope	↔ RT EN →	Variable
LINE	R2	— RT EN —	Variable
	RTE	— APE RT —	Variable
	Jockey	— ORF1 — APE RT —	Variable
	L1	— ORF1 — APE RT —	Variable
	I	— ORF1 — APE RT RH —	Variable
SINE	tRNA	— — —	Variable
	7SL	— — —	Variable
	5S	— — —	Variable
Class II (DNA transposons) - Subclass 1			
TIR	Tc1-Mariner	↔ Tase* ↔	TA
	hAT	↔ Tase* ↔	8
	Mutator	↔ Tase* ↔	9-11
	Merlin	↔ Tase* ↔	8-9
	Transib	↔ Tase* ↔	5
	P	↔ Tase ↔	8
	PiggyBac	↔ Tase ↔	TTAA
	PIF-Harbinger	↔ Tase* ORF2 ↔	3
	CACTA	↔ Tase ORF2 ↔	2-3
Crypton	Crypton	— YR —	0
Class II (DNA transposons) - Subclass 2			
Helitron	Helitron	— RPA — Y2 HEL —	0
Maverick	Maverick	— C-INT — ATP — CYP — POL B —	6

Structural features	
→	Long terminal repeats
↔	Terminal inverted repeats
█	Coding region
—	Non-coding region
—	Diagnostic feature in non-coding region
—	Region that can contain one or more additional ORFs

Protein coding domains					
AP, Aspartic proteinase	APE, Apurinic endonuclease	ATP, Packaging ATPase	C-INT, C-integrase	CYP, Cysteine protease	EN, Endonuclease
ENV, Envelope protein	GAG, Capsid protein	HEL, Helicase	INT, Integrase	ORF, Open reading frame of unknown function	
POL B, DNA polymerase B	RH, RNase H	RPA, Replication protein A (found only in plants)	RT, Reverse transcriptase	Y2, YR with YY motif	
Tase, Transposase (* with DDE motif)		YR, Tyrosine recombinase			

Species groups			
P, Plants	M, Metazoans	F, Fungi	O, Others

Figure 12. Classification des éléments transposables proposés par Wicker *et al.*
(Tiré de Wicker *et al.*, 2007)

Dans cette classification, les éléments sont regroupés en Classe, Sous-classes, Ordres, Superfamilles et Familles. La Classe est déterminée selon le mode de transposition. La Sous-classe se base sur le nombre de brins d'ADN coupés lors de la transposition. L'Ordre prend en compte le type d'enzymes que les éléments transposables codent. La Superfamille se base sur la structure des séquences, leurs domaines protéiques ou leur TSD (Terminal Side Duplication).

a. Les rétro-éléments avec LTR

Constituant 8,3% du génome humain, les rétro-éléments (RE) avec LTR regroupent comme leur nom l'indique des RE avec des séquences LTR et peuvent atteindre une taille de 10kb (Bannert et Kurth 2004; Platt, Vandewege, et Ray 2018).

Les LTR sont des séquences en orientation directe de quelques centaines de bases et situés aux extrémités du RE. Ils contiennent les régions promotrices et régulatrices des séquences codantes du RE et possèdent trois domaines fonctionnels : U3 (pour «unique» en 3' de l'ARN), R (pour «répétée » aux extrémités de l'ARN) et U5 (pour «unique» en 5' de l'ARN). L'ARN issue de la transcription du RE commence et se termine à la région R (Kovalskaya et al. 2006). Ces RE ont une similarité avec les rétrovirus puisqu'ils possèdent au moins deux ORF *gag* et *pol*. Le gène *gag* chez les rétrovirus code pour des protéines constituant la capsid virale. Son rôle dans les RE est encore mal compris. Le gène *pol* code pour des protéines impliquées dans la transposition, incluant la protéase (Aspartic proteinase, AP) et la transcriptase inverse (RT) importante pour la rétrotranscription, une Rnase H (RH) et une intégrase (INT) permettant l'insertion de l'élément dans le génome de l'hôte (Wojciech Makałowski et al. 2019). La transposition des RE avec LTR génère une duplication du site cible (TSD, Target Site Duplication) de 4 à 6 paires de bases.

Au sein des RE avec LTR, il existe quatre superfamilles : (1) Ty1-copia, (2) Ty3-gipsy, (3) BEL-Pao, (4) rétrovirus endogène (ERV) (Wicker et al. 2007) [Figure 13]. Tous les RE avec LTR ont un mécanisme de transposition similaire. Les RE de la superfamille Ty1-copia diffèrent des autres superfamilles par l'ordre des domaines protéiques du gène *pol*. Bien que les superfamilles Ty3-gipsy et BEL-Pao possèdent la même structure, les analyses phylogénétiques montrent qu'ils appartiennent à des superfamilles différentes.

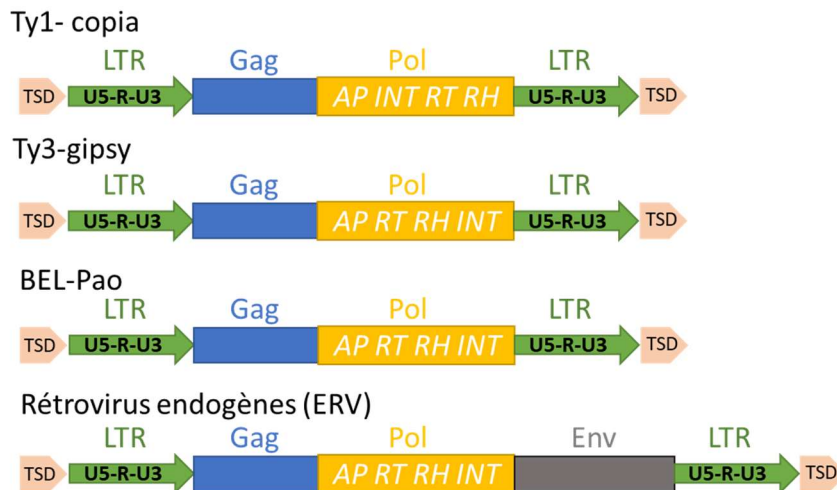


Figure 13. Quatre superfamilles au sein des rétroéléments avec LTR.
 Protéase (Aspartic proteinase, AP); transcriptase inverse (RT); Rnase H (RH); intégrase (INT)

Présent chez tous les vertébrés, les ERV, étant la superfamille majoritaire au sein des RE avec LTR, constituent 7,7% du génome humain (Bannert et Kurth 2004). Ils sont issus d'anciennes infections virales des cellules germinales, avec une rétro-intégration de copies «pro-virales » dans l'ADN chromosomique de l'hôte et une dissémination intra-génomique (Belshaw et al. 2005). Les ERV contiennent en plus des gènes *gag* et *pol*, le gène *env* contrairement aux trois autres superfamilles. Le gène *env* code pour la protéine d'enveloppe ayant un rôle dans l'entrée du rétrovirus exogène dans la cellule cible. La plupart des séquences des ERV ont subi plusieurs délétions et mutations les rendant transcriptionnellement silencieuses et incapables de rétro-transcrire (Gogvadze et Buzdin 2009) . Bien qu'il soit possible de trouver des ERV actifs avec un caractère infectieux chez la souris, aucun ERV humain est connu à ce jour comme infectieux (Kassiotis et Stoye 2016). Les HERV-K, des ERV récemment acquis chez l'Homme et ayant des ORF intacts, sont capables de produire des particules virales dans des lignées cellulaires issues de différents patients atteint de tumeurs germinales mais ils ne peuvent pas se répliquer dans les cellules humaines (Contreras-Galindo et al. 2015; Kassiotis et Stoye 2016)

b. Les rétro-éléments sans LTR

Comme leur nom l'indique les RE sans LTR ne possèdent pas de LTR dans leur séquence et sont constitués à leur extrémité 3' de séquences riches en adénosine. Les RE sans LTR sont les seuls connus pour être actifs dans le génome humain (Mills et al. 2007).

Les RE sans LTR les plus répandus chez les mammifères sont les *Long Interspersed Nuclear Elements* (LINE) et les *Short Interspersed Nuclear Elements* (SINE).

i. Short Intersersed Nuclear Elements (SINE)

Les SINE sont de petits RE allant de 80 à 500 bp et représentent environ 12% du génome humain (Wicker et al. 2007). Les SINE sont des éléments non-autonomes et peuvent transposer uniquement en utilisant la machinerie enzymatique des LINE (Ohshima et al. 1996). Le SINE est reconnu en *trans* par la transcriptase inverse d'un LINE favorisant ainsi la transposition du SINE (Kajikawa et Okada 2002; Kramerov et Vassetzky 2005).

Les séquences SINE sont généralement encadrées par de courtes séquences TSD. Elles sont constituées de trois régions : 1. la région 5' nommée « la tête » issue généralement d'un ARNt et qui contient un promoteur interne pour l'ARN polymérase III ; 2. la région centrale appelée « le corps » qui n'est pas issue d'un ARN et dont l'extrémité 3' est similaire au LINE associé ; 3. la région 3' nommée « la queue » qui est riche en AT ou bien présente une courte répétition en tandem. Néanmoins certains SINE divergent de ce profil structural, avec notamment des régions 5' qui dérivent d'autres ARN cellulaires tel que l'ARN 7SL, l'ARNr 5S, des régions centrales ou des régions 3' absentes (Kramerov et Vassetzky 2005) [Figure 14].

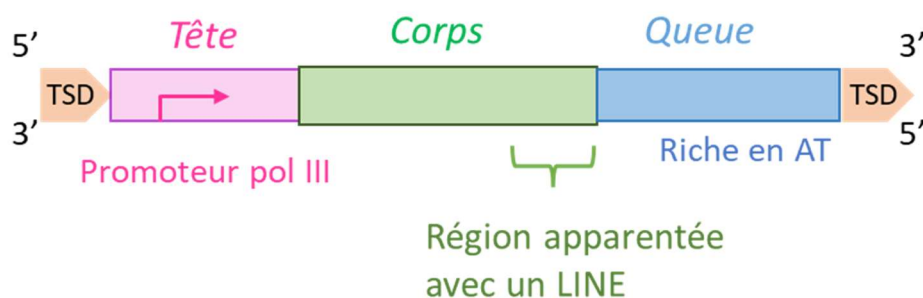


Figure 14. Structure des éléments SINE.

Le génome de la souris (*Mus musculus*) possède quatre grands types de SINE : B1, B2, B4 et ID dont aucun n'est présent chez l'Homme (Maquat 2020). Il existe trois types de SINE dans le génome humain : les éléments Alu, les éléments SVA et les pseudogènes.

Les éléments Alu constituant 10% du génome humain, sont les plus majoritaires au sein de la famille des SINE. Leur dénomination est due à la présence dans leur séquence

d'un site de clivage pour l'enzyme de restriction AluI (Houck, Rinehart, et Schmid 1979). Plus d'un million de copies de ces éléments Alu sont dispersées dans tout le génome humain (Lander et al. 2001). Ils sont fréquemment impliqués dans les réarrangements génomiques de par l'abondance de leurs copies. Ces remaniements du génome dus aux éléments Alu induisent des maladies génétiques telles que des hémopathies ou des maladies neurologiques. Les éléments Alu sont associés approximativement à 0.1% des maladies génétiques humaines (S. Kim et al. 2016).

Les éléments SVA sont appelés ainsi de par leur structure qui se compose d'une région appelée SINE-R, des répétitions d'hexamères et une séquence Alu (SINE-VNTR[*Variable-number-of-tandem-repeats*]-Alus). Ayant une taille typique de 2kb, les éléments SVA sont présent en 3000 copies dans le génome humain (1%) et sont les plus jeunes RE (Ostertag et al. 2003; H. Wang et al. 2005). Ils sont actifs dans le génome grâce aux éléments LINE et peuvent occasionnellement s'insérer dans des gènes et causer des maladies telles que la dystrophie musculaire congénitale de tymape Fukuyama, l'hypercholestérolémie autosomique récessive, la dystonie-parkinsonisme liée à l'X (Kobayashi et al. 1998; Wilund et al. 2002; Makino et al. 2007).

Les pseudogènes sont apparus à la suite de la rétro-transcription d'ARNm cellulaires suivi d'une intégration dans le génome. Ils n'ont pas d'introns, une queue poly-A et sont encadrés par de courtes séquences TSD (Gogvadze et Buzdin 2009). Approximativement 20 000 pseudogènes sont estimés dans le génome humain (Tutar 2012). La plupart des pseudogènes sont inactifs car ils ne possèdent pas de promoteurs fonctionnels (Vanin 1985; Weiner, Deininger, et Efstratiadis 1986). Ces vestiges sont utilisés comme des horloges moléculaires pour estimer les taux de mutations entre les espèces (Graur, Shuali, et Li 1989).

ii. Long Intersersed Nuclear Elements (LINE)

Les LINE sont des éléments composés de longues séquences répétées, de taille variable. Ils sont subdivisés en cinq superfamilles : LINE-1 (L1), LINE-2 (L2), R2, RTE, I et Jockey (Eickbush et Malik 2002) [Figure 15]. Lorsque les LINE ne sont pas mutés, ils synthétisent la transcriptase inverse. Les superfamilles se distinguent par la nature et l'enchaînement de leurs domaines protéiques et aussi sur les relations phylogéniques des transcriptases inverses (Eickbush et Malik 2002).

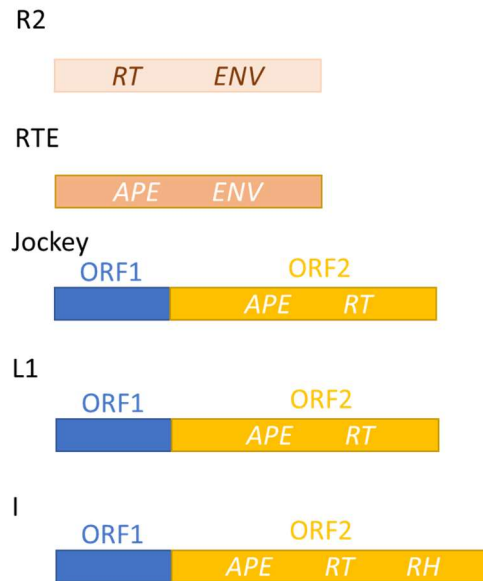


Figure 15. La structure des cinq superfamilles au sein des LINE.
 Transcriptase inverse (RT); enveloppe (ENV); endonucléase apurinique (APE); Rnase H (RH)

Les éléments de la superfamille R2 sont les seuls LINE à avoir un domaine protéique codant pour l'enveloppe (ENV). La superfamille RTE a un seul ORF codant pour une endonucléase apurinique (APE) en plus de la transcriptase inverse. Les éléments des superfamilles Jockey, L1 et I ont au moins deux ORF : le premier, ORF1, ressemble au gène gag des rétrovirus, le second, ORF2, code pour au moins la transcriptase inverse et l'APE (Eickbush et Malik 2002; Martin 2006). Les éléments de la superfamille I ont en plus dans l'ORF2 un domaine pour la RH (Eickbush et Malik 2002). Récemment, une troisième ORF appelé ORF0, localisée en amont de l'ORF1, a été découverte chez les éléments L1 humains mais sa fonction reste encore mal comprise (Denli et al. 2015).

Les éléments L1 sont les plus étudiés car ils sont les plus majoritaires (plus de 500 000 copies L1), représentant près de 20% du génome humain (Lander et al. 2001; P. L. Deininger et al. 2003). Les L1 ont une longueur typique de 6 kb chez l'Homme, comprenant en plus des ORF, une région 5'-UTR contenant des promoteurs sens et antisens pour l'ARN polymérase II et une région 3'-UTR présentant une queue poly-A de longueur variable (Babushok et Kazazian 2007). Les L1 sont les seuls LINE capables de rétro-transposer chez l'Homme (Mills et al. 2007) [Figure 16]. Néanmoins la plupart des L1 existent sous forme de copies inactives à cause notamment de la troncation en 5' qui a lieu au moment du processus d'insertion au site cible (Beck et al. 2010). Moins d'une centaine d'éléments L1 sont capables de rétro-transposer et sont répertoriées

dans le génome humain (Brouha et al. 2003; Beck et al. 2010; P. L. Deininger et al. 2003). Ces L1 actifs créent du polymorphisme mais ils sont aussi à l'origine de défauts génétiques (Khan, Smit, et Boissinot 2006).

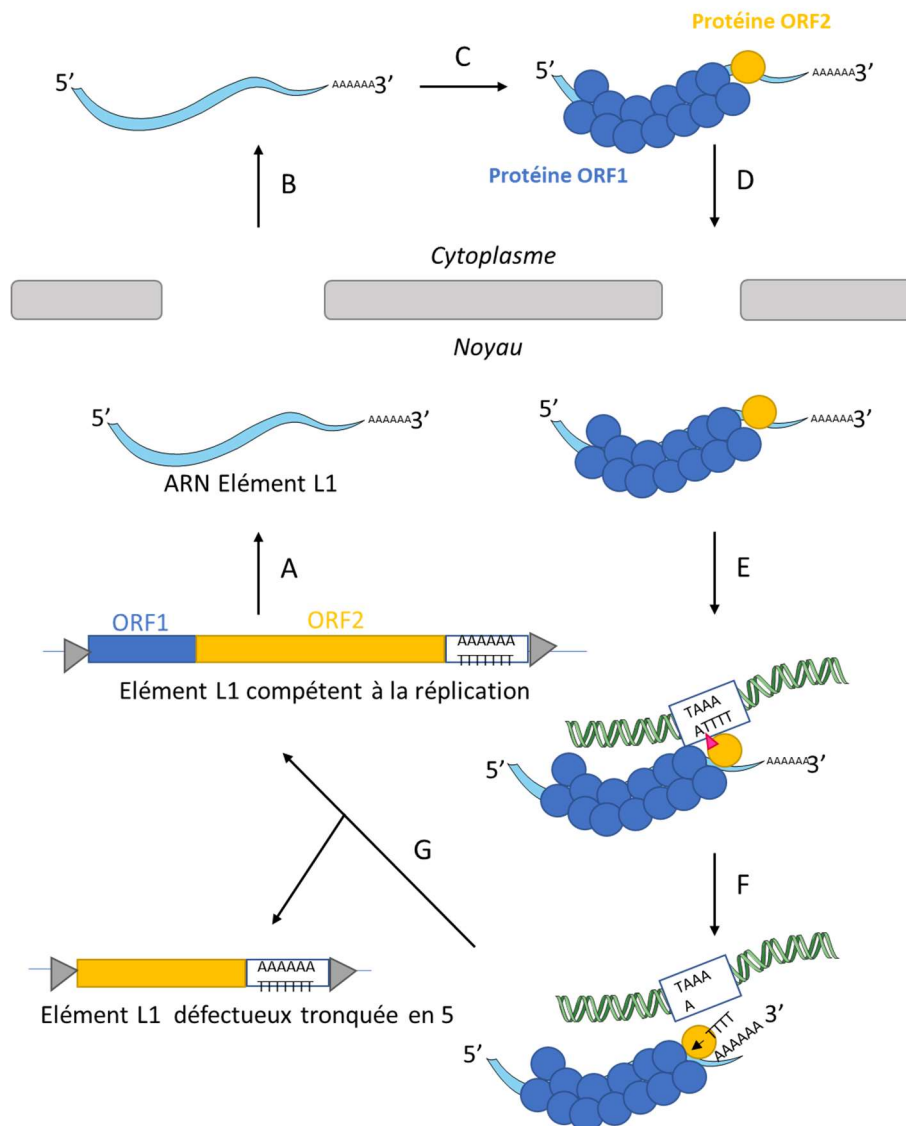


Figure 16. Le cycle de rétro-transposition des éléments L1.

(Adapté de Viollet, Monot, et Cristofari 2014)

A. La répliation des éléments L1 commence par la transcription de l'ARNm bicistronique ;
B. L'ARN de l'élément L1 est exporté dans le cytoplasme ; **C.** La traduction permet la production des protéines ORF1 et ORF2 ; ces protéines se lient à l'ARN de L1 pour former des particules ribonucléiques (RNP) L1 ; **D.** Le RNP L1 est importé dans le noyau ; **E.** L'endonucléase (*triangle rose*) coupe au site cible génomique d'intégration ; **F.** La RT de L1 (*flèche noire*) initie la rétrotranscription de l'ARN L1 ; les étapes finales de ce mécanisme restent encore mal comprises **G.** Une rétrotranscription partielle peut générer des copies de L1 tronquées en 5'.

3. Fonctions physiologiques

a. Les réarrangements génétiques causés par les RE

i. La recombinaison

La structure même des RE, à savoir la présence de motifs répétés et l'abondance de leurs copies dans le génome, favorise des échanges de fragments de chromatine aussi appelé recombinaison (Makałowski 2000). Ce processus peut conduire à des délétions, des insertions, des duplications, ou des translocations réciproques, induisant des effets délétères, avantageux ou nuls (Kidwell et Lisch 2001; P. L. Deininger et al. 2003; Klein et O'Neill 2018) [Figure 17]. Par exemple, au cours de l'évolution, plusieurs étapes de duplications impliquant la recombinaison entre des éléments Alu ont favorisé l'émergence d'une famille de gènes de la glycophorine humaine (W. Makałowski 2000). A l'inverse, des effets délétères ont pu être observés dans de nombreuses maladies humaines (Segal et al. 1999; Kamp et al. 2000; Gogvadze et Buzdin 2009). En effet, dans le cas du syndrome d'Alport, la recombinaison entre des éléments L1 a provoqué une délétion de deux gènes codant pour le collagène de type IV (Segal et al. 1999).

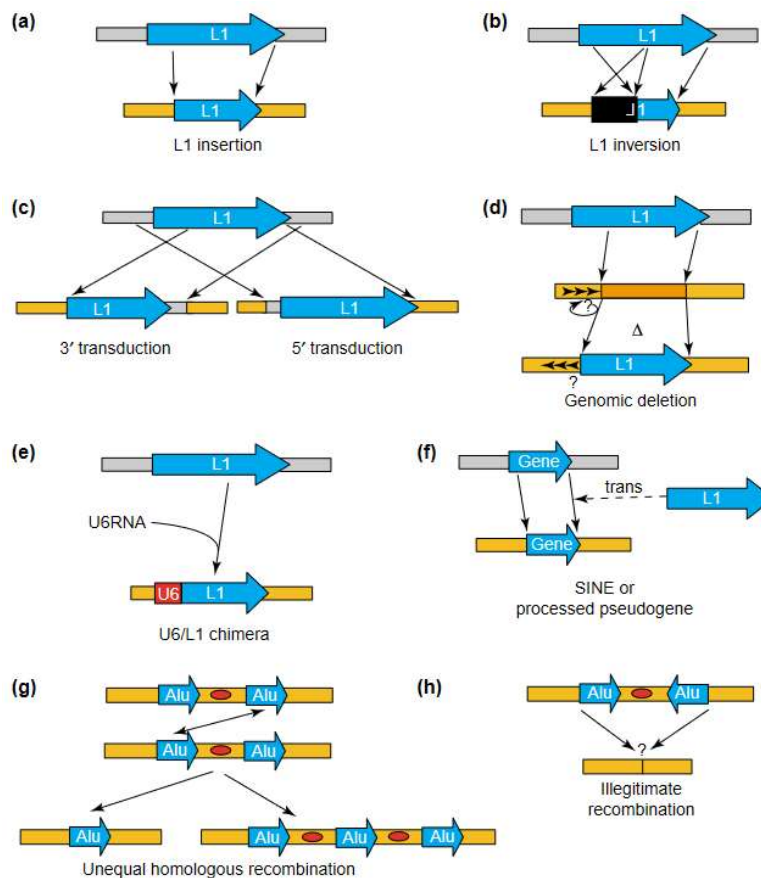


Figure 17. Remaniements génomiques par les rétro-éléments.

(Tiré de Deninger et al., 2003)

A. Insertion ; **B.** Inversion ; **C.** Transduction ; **D.** Délétion ; **E.** Chimère ; **F.** Insertion d'ARN non autonome aidé par un élément en trans ; **G.** Recombinaison homologue inégale, une source de duplication et de délétions chromosomiques ; **H.** Recombinaison hétérogène et illégitime à cause de la présence d'éléments répétés inversés.

ii. Transduction des séquences flanquantes

La cassure de l'ADN provoquée lors de l'excision du RE peut être un facteur de variabilité suivant le mécanisme de réparation de l'hôte (Kidwell et Lisch 2001). Lors de la rétro-transposition l'insertion du RE est aussi responsable de l'instabilité génomique (Kidwell et Lisch 2001). Cependant, le taux de mutations dues aux RE semble très faible chez l'Homme, d'environ 0.2% contre 10% chez la souris (P. L. Deninger et al. 2003). Les effets majeurs des RE ont lieu à l'échelle transcriptomique.

La capacité de transduction de séquences encadrantes en 3' à un nouveau site génomique est observée pour la première fois dans les éléments L1 (Moran 1999; Pickeral et al. 2000; Goodier, Ostertag, et Kazazian 2000) [Figure 17C]. Les éléments de la superfamille L1 ont un faible signal de polyadénylation (polyA), conférant le risque que la transcription ne s'arrête pas à ce signal. En effet, l'ARN polymérase peut continuer à transcrire jusqu'à un autre site de polyA plus efficace, aboutissant à une transduction de la séquence 3' du L1 (Goodier, Ostertag, et Kazazian 2000; Gogvadze et Buzdin 2009). Environ 20% de tous les inserts L1 contiennent de l'ADN transduit à l'extrémité 3' allant de quelques bases jusqu'à 1 kb (Gogvadze et Buzdin 2009). Les transductions liées aux éléments L1 peuvent conduire à des mélanges d'exons et de séquences régulatrices créant de nouveaux gènes ou altérant la transcription (Gogvadze et Buzdin 2009).

La transduction des éléments SVA peut également avoir lieu à l'extrémité 3' et créer de nouvelles familles de gènes tel que *AMAC* (Xing et al. 2006). Réciproquement, lorsque le promoteur d'un gène est localisé en amont d'un RE sans LTR complet, ou ayant une extrémité 5' tronquée, il peut servir de promoteur externe au RE (H. Wang et al. 2005; Damert et al. 2009).

Pris ensemble, l'ADN transduit représente moins d'un 1% du génome humain (Gogvadze et Buzdin 2009).

iii. La formation de rétrogènes chimériques

La capacité de la transcriptase inverse à changer de matrice durant la synthèse de l'ADNc est une caractéristique connue chez les rétrovirus. Elle est indispensable pour la synthèse des séquences LTR rétrovirales (Temin 1993). Cette propriété de la transcriptase inverse peut être aussi observée durant la rétro-transcription des éléments L1, pouvant aboutir ainsi à la formation de rétrogènes chimériques. Ils sont produits lorsque l'ARN est rétro-transcrit en ADNc par la transcriptase inverse et qu'il est inséré à une nouvelle position génomique contenant des séquences flanquantes à l'extrémité 3' des L1 (Gogvadze et Buzdin 2009). En 2003, Buzdin *et al.* montrent que diverses chimères ont été formées pendant au moins 47 millions d'années et que leur formation se poursuit encore aujourd'hui (Buzdin et al. 2003). Certains de ces rétro-transcrits chimériques sont retrouvés exprimés dans les différents tissus humains (Buzdin et al. 2003). Ces éléments chimériques ne sont pas uniquement retrouvés chez l'Homme mais aussi dans d'autres organismes, suggérant ainsi que le changement de matrice lors de la rétrotranscription des L1 est un mécanisme de réarrangement génomique conservé entre les espèces (Elbarbary, Lucas, et Maquat 2016).

b. La régulation en cis de l'activité des gènes par les RE

Dans cette section, nous verrons les différents mécanismes des RE pour modifier le transcriptome [Figure 18].

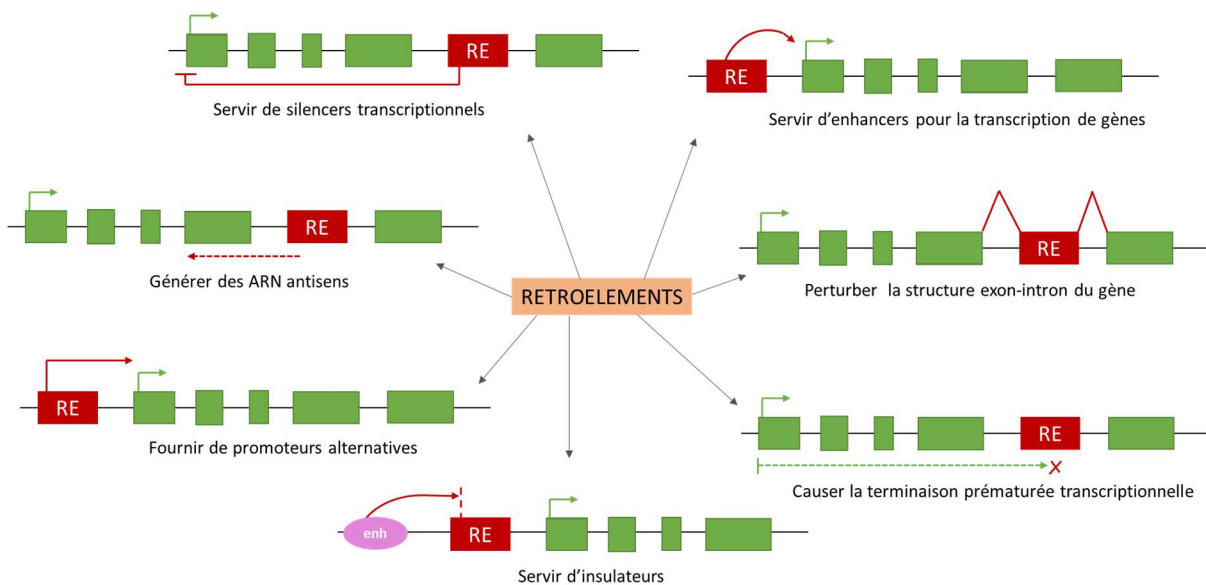


Figure 18. Les différents mécanismes des RE pour modifier le transcriptome.

(Adapté de Gogvadze et Buzdin, 2009)

Les rectangles rouges : les rétro-éléments ; les rectangles verts ; exon d'un gène ; la flèche verte représente le site d'initiation de la transcription ; l'ovale violet représente une séquence enhancer.

i. Les RE, des promoteurs de la transcription des gènes de l'hôte et aussi des régulateurs antisens

Il est estimé que 6 à 30% des transcrits humains et murins sont initiés à partir des RE (Faulkner et al. 2009). Les RE sont des réservoirs de sites de liaisons de facteurs de transcription fonctionnels (Sun et al. 2018). Au cours de l'évolution, la mobilisation des RE dans le génome a permis l'insertion de séquences régulatrices à de nouveaux loci. Lorsqu'un RE s'insère à proximité de régions promotrices d'autres gènes, la sélection peut alors favoriser les séquences régulatrices du RE pour modifier l'expression des gènes adjacents. Avec le temps, les insertions de séquences régulatrices issus de RE, de par leur nature répétée, peuvent faire émerger un réseau de régulation, dans lequel un seul facteur de transcription qui était initialement associé à un RE, peut être relié à des dizaines, voire des centaines de RE et ainsi connecté de nombreux gènes qui n'étaient pas liés auparavant (Platt, Vandeweghe, et Ray 2018; Sundaram et Wang 2018; Hermant et Torres-Padilla 2021). L'avantage de ce réseau est qu'il n'est pas nécessaire d'avoir plusieurs facteurs transcriptions pour activer l'expression de plusieurs gènes et permet ainsi à la cellule de réagir rapidement, par exemple dans le cas d'une infection virale (Chuong, Elde, et Feschotte 2016). Cette notion sera approfondie ultérieurement dans la *section II.7.b*.

Les RE peuvent agir comme des promoteurs alternatifs et ainsi influencer le niveau d'expression des gènes de l'hôte de façon tissu spécifique, en fonction des facteurs de transcriptions qui vont être présents dans le tissu et impliqués (Larouche et al. 2020; Hermant et Torres-Padilla 2021) [Figure 18]. En effet, par exemple, le gène *CA1*, codant pour l'anhydrase carbonique, une enzyme qui aide à maintenir l'homéostasie acido-basique et l'équilibre hydrique, a deux promoteurs, un promoteur proximal et un promoteur distal qui contient un RE appelé *MER74C* (Brady et al. 1989; van de Lagemaat et al. 2003). Le promoteur alternatif *MER74C* permet l'expression de *CA1* spécifiquement dans les érythrocytes tandis que les autres tissus tel que le colon expriment *CA1* grâce au promoteur distal (van de Lagemaat et al. 2003). En 2019, Jönsson *et al.* mettent en évidence que dans les cellules progénitrices neurales, la dérégulation épigénétique de certains éléments L1 fournit des promoteurs alternatifs pour plusieurs gènes codant pour des protéines neuronales (Jönsson et al. 2019). Récemment, Hashimoto *et al.* montrent que les éléments *MLT2A1* et *MLT2A2*, des RE

avec LTR fournissent de nouveaux promoteurs aux gènes humains *ABCE1*, *COL5A1* et *GALNT13* spécifiquement dans l'épiphyse (Hashimoto et al. 2021). Les RE peuvent aussi être les seuls promoteurs de certains gènes humains. Par exemple les séquences antisens Alu et L1 sont les seuls promoteurs connus pour le gène *HYAL-4*, nécessaire au catabolisme de l'acide hyaluronique (van de Lagemaat et al. 2003; Gogvadze et Buzdin 2009). Les RE peuvent servir de régulateurs antisens des gènes de l'hôte (Gogvadze et Buzdin 2009) [Figure 18]. Dans les introns, les RE sont présent préférentiellement en orientation antisens, suggérant une forte pression de sélection négative pour les éléments orientés dans la même direction que la transcription du gène hôte (van de Lagemaat, Medstrand, et Mager 2006). Par exemple des séquences rétrovirales endogènes *HERV-K (HLK-2)* sont trouvés en antisens dans l'intron des gènes *SLC4A8* et *IFT172*. La surexpression des transcrits antisens conduit à une diminution significative de l'expression des gènes *SLC4A8* et de *IFT172* (Gogvadze et Buzdin 2009).

Les LINE et les SINE peuvent agir comme promoteurs de la synthèse des miARN (Piriyapongsa et Jordan 2007; Elbarbary, Lucas, et Maquat 2016). En 2007, Piriyapongsa *et al.* montrent que les membres d'une famille de gènes miARN humains, *hsa-mir-578*, sont dérivés des RE *MADE1*. Ces éléments sont de courtes séquences avec des répétitions inversées de 37pb qui encadrent une séquence interne de 6 pb. De par leur structure, lorsque les éléments *MADE1* sont transcrits, ils forment des boucles en épingle à cheveux très stables et sont ensuite traités par la machinerie de l'ARN interférence (ARNi) pour produire des miARN matures (Piriyapongsa et Jordan 2007).

ii. Les RE, des enhancers et des silenciers transcriptionnels des gènes cellulaires

Les RE peuvent aussi avoir le rôle d'enhancers en régulant positivement la transcription, et ce de façon tissu-spécifique (Elbarbary, Lucas, et Maquat 2016; Sundaram et Wang 2018) [Figure 18]. Cette fonction des RE est observée par exemple dans le cas des amylases humaines (Meisler et Ting 1993). Le locus de l'amylase comprend cinq gènes dont deux gènes pour l'amylase pancréatique (*AMY2A* et *AMY2B*) et trois gènes pour l'amylase salivaire (*AMY1A*, *AMY1B*, *AMY1C*). Les gènes de l'amylase salivaires se distinguent de ceux du pancréas par la présence d'un exon additionnel non traduit à l'extrémité 5' et d'un insert complet de *HERV-E* (un RE) en amont du site d'initiation de la transcription. L'insertion de ce RE active un promoteur cryptique qui favorise la transcription de l'amylase des glandes salivaires. La présence de la partie LTR seul au

lieu du RE complet ne permet pas l'activation du promoteur cryptique et uniquement les gènes de l'amylase pancréatique sont exprimés (Meisler et Ting 1993; Gogvadze et Buzdin 2009).

Au contraire, les RE sont aussi capable d'avoir le rôle de silenciers en régulant négativement la transcription des gènes (Elbarbary, Lucas, et Maquat 2016) [Figure 18]. Par exemple le locus *GH* humain, codant pour les hormones de croissance, a des séquences Alu dont une qui joue le rôle de silencer en diminuant le taux d'acétylation des histones associée au promoteur et ainsi en empêchant le recrutement de l'ARN polymérase II (Trujillo, Sakagashira, et Eberhardt 2006). Sharan *et al.* mettent en évidence que *BRCA2*, un gène suppresseur de tumeur contient dans la partie distale de son promoteur un élément Alu qui réprime sa transcription dans les lignées cellulaires dérivées de cancer du sein (Sharan et al. 1999).

iii. Les RE, jouant un rôle dans l'épissage des gènes de l'hôte

Les RE peuvent affecter l'épissage en retenant un intron, en omettant ou en ajoutant un exon, en fournissant des sites donneurs ou accepteurs d'épissage (Kaer et Speek 2012; Huda et Bushel 2013; Ayarpadikannan et al. 2015) [Figure 18]. Les éléments *ALU* jouent un rôle crucial dans la formation de nouveaux exons (Corvelo et Eyraas 2008; Lin et al. 2008). En effet, ils contiennent des séquences ayant des sites consensus d'épissage en orientation sens et antisens (Gotea et Makałowski 2006). Entre 58 et 28 millions d'années, le gène *p75TNFR* codant pour un récepteur du TNF (*Tumor necrosis factor*) a subi une insertion d'un élément Alu et une série de substitutions de nucléotides qui ont permis de créer un exon alternatif (Singer et al. 2004). Le gène *NOX5* contient aussi un exon dérivant d'éléments Alu et qui est retrouvé dans la plupart des tissus. Une isoforme additionnelle de l'ARNm de *NOX5* sans cet exon est observée dans le foie, le pancréas et les testicules où l'exon est omis (Lin et al. 2008). Les RE avec LTR contribuent aussi à la diversité de l'épissage alternatif des ARNs (van de Lagemaat, Medstrand, et Mager 2006). Par exemple, le gène *VEGFR-3/FLT4* code pour deux isoformes dont un petit transcrit formé grâce à un site accepteur d'épissage dans une séquence rétrovirale endogène présent entre les deux derniers exons (Hughes 2001).

iv. Les RE jouant un rôle dans la terminaison prématurée de la transcription

Les RE autonomes possèdent des signaux de polyA pour produire les protéines nécessaires à leur transposition. Les insertions de ces éléments dans les gènes en

orientation sens peuvent influencer l'expression des gènes adjacents en fournissant de nouveaux signaux de polyA (Mangiavacchi et al. 2021) [Figure 18]. En plus du signal principal de polyA dans la région 3', les éléments L1 ont un site de terminaison transcriptionnel additionnel localisé dans la partie 3' de l'ORF2 en orientation antisens (Han, Szak, et Boeke 2004; Wheelan et al. 2005). Par conséquent, indépendamment de leur orientation dans le gène, les éléments L1 peuvent produire potentiellement des ARN tronqués (Gogvadze et Buzdin 2009). Environ 8% des sites de polyA du génome humain sont associés à des RE (Lee, Ji, et Tian 2008). Les sites de polyA humains qui ne sont pas conservés chez la souris se sont révélés plus fortement associés à des RE que ceux qui sont conservés. Ce résultat suggère que les RE ont contribué à la création ou à la modulation de sites polyA au cours de l'évolution et sont responsables de la spécificité des sites polyA des espèces (J. Y. Lee, Ji, et Tian 2008; Elbarbary, Lucas, et Maquat 2016).

4. Régulation des rétro-éléments

Un équilibre entre l'expression et la répression des RE existe pour qu'ils puissent persister dans l'évolution. En effet, l'expression des RE doit être suffisante pour permettre leur amplification mais elle ne doit pas induire un désavantage pour l'hôte (Bourque et al. 2018). Les RE sont finement régulés par des mécanismes épigénétiques comprenant la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et l'ARN interférent (Slotkin et Martienssen 2007; Friedli et Trono 2015) [Figure 19A]. Le niveau d'expression de ces éléments varie selon le type de tissu et tout au long du cycle de vie de l'organisme (Faulkner et al. 2009; Bourque et al. 2018).

a. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est impliquée dans la répression des RE. Il est d'ailleurs bien établi dans la littérature que l'état de méthylation des éléments L1 sert de marqueur du niveau global de méthylation de l'ADN (Ohka et al. 2011). Pour rappel, les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN sont DNMT3A et DNMT3B impliquées dans la méthylation *de novo* des îlots CpG et DNMT1 jouant un rôle dans la maintenance de la méthylation. Il existe aussi un autre membre de la famille DNMT3, appelé DNMT3L qui est nécessaire pour l'empreinte parentale maternelle et qui interagit avec DNMT3A/B (Hata et al. 2002). DNMT3L peut aussi améliorer l'activité de la méthylation

de l'ADN des enzymes DNMT3A/B mais pas DNMT1 (Suetake et al. 2004). Les méthyltransférases *de novo* de l'ADN ont des rôles qui ne se chevauchent pas au niveau de certaines séquences génomiques. DNMT3B a un rôle dans la régulation de la méthylation de petites séquences répétées localisées au niveau centromérique appelée des satellites mineurs tandis que DNMT3A méthylent préférentiellement l'hétérochromatine péri-centromérique (Okano et al. 1999). Des embryons *Dnmt3b*^{-/-} ont une légère hypométhylation de certaines séquences rétrovirales endogènes dont les éléments IAP, qui n'est pas observée dans les embryons *Dnmt3a*^{-/-}. Les double mutants *Dnmt3a*^{-/-} *Dnmt3b*^{-/-} ont une hypométhylation plus prononcée sur ces séquences, suggérant un degré de redondance de ces deux enzymes au niveau de ces loci (Okano et al. 1999; Crichton et al. 2014). De façon surprenante, la perte des trois enzymes *Dnmt* (*Dnmt1*^{-/-}, *Dnmt3a*^{-/-}, *Dnmt3b*^{-/-}) n'entraîne pas de façon significative la dérégulation des RE sauf pour le cas des éléments IAP (Matsui et al. 2010; Karimi et al. 2011). Pour compenser la perte de méthylation de l'ADN, les cellules ES triple mutant utilisent un autre mécanisme similaire à ce qui se passe durant la reprogrammation épigénétique des embryons au stade de pré-implantation et dans les cellules germinales. L'hypométhylation de l'ADN peut être contrebalancée par des gains de marques d'histones répressives, empêchant ainsi l'expression anormale de gènes et de RE (M. Walter et al. 2016).

Les éléments L1, Alu et SVA sont les seuls RE actifs connus à ce jour dans le génome humain (Xing et al. 2009). La rétrotransposition des RE crée des îlots CpG aux sites d'insertion (Grandi et al. 2015). Il est estimé que la moitié des îlots CpG du génome humain sont localisés au niveau de séquences répétées (Lander et al. 2001). Les îlots CpG créés *de novo* par rétrotransposition sont hypométhylés et peuvent influencer les îlots CpG à proximité et ainsi l'expression des gènes adjacents en modifiant leur statut de méthylation (Grandi et al. 2015; Mita et Boeke 2016). Il est aussi montré à *contrario* que suite à l'insertion *de novo* de RE, ceux-ci peuvent être reconnus et réprimés à travers un changement dynamique de la méthylation de l'ADN (Salvador-Palomeque et al. 2019). En 2018, Ohtani *et al.* montrent de façon intéressante que les RE qui sont apparus récemment au cours de l'évolution ont une forte densité d'îlots CpG par rapport à des RE âgés, suggérant que l'âge du RE pourrait jouer sur le statut de méthylation des RE (Ohtani et al. 2018).

b. Les modifications post-traductionnelles des histones

La méthylation de H3K9 est impliquée dans la répression des RE (Martens et al. 2005; Kabi et Filion 2021). En 2014, Bulut-Karslioglu *et al.* montrent que, dans les cellules ES les enzymes H3K9 KMTs SUV39H sont recrutées spécifiquement sur des RE apparus récemment au cours l'évolution tel que les jeunes RE avec LTR, les jeunes éléments ayant des séquences complètes et intactes (Bulut-Karslioglu et al. 2014). La perte de SUV39H1 et SUV39H2 dans les cellules ES murines ne conduit pas à la réduction de la marque H3K9me3 aux niveaux des éléments IAP et induit une réactivation modeste de certains RE, démontrant une implication d'autres H3K9 KMTs dans ce processus (Martens et al. 2005; Matsui et al. 2010).

La marque H3K9me3 peut être aussi déposée sur les RE par l'enzyme SETDB1. Dans les cellules ES murines *Setdb1*^{-/-}, tous les RE sauf les SINE sont dérèprimés. Une augmentation de l'expression de plus de 69 sous-familles de RE est observée dans les cellules ES murines *Setdb1*^{-/-} tandis que seulement 5 sous-familles sont dérèprimés dans les cellules ES *Dnmt1*^{-/-}*Dnmt3a*^{-/-}*Dnmt3b*^{-/-}, dont 4 qui sont plus fortement dérèglées dans les cellules *Setdb1*^{-/-} (Karimi et al. 2011). Ainsi, le dépôt de la marque H3K9me3 par SETDB1 a un rôle plus important dans la répression des RE que la méthylation de l'ADN dans les cellules ES (Fukuda et Shinkai 2020). SETDB1 réprime aussi les RE dans les cellules somatiques telles que les cellules du cerveau, les lymphocytes B, les lymphocytes T (Tan et al. 2012; Collins et al. 2015; Takikita et al. 2016). Différentes familles de RE sont activées par la déplétion de SETDB1, dépendant du type cellulaire. Par exemple la perte de SETDB1 induit une forte expression des RE de type MLV, MMTV, VL30 dans les cellules pro-B murines alors que dans les cellules ES et les cellules germinales primordiales, MMTV et VL30 restent réprimés et MLV a une expression très faible (Collins et al. 2015). La dérèpression des RE tissu-spécifique induite par la perte de SETDB1 dépend de l'expression de facteurs de transcription spécifiques du tissu (Fukuda et Shinkai 2020).

KAP1 sert d'échafaudage pour un complexe d'induction de l'hétérochromatine impliquant SETDB1, le complexe NuRD contenant des HDAC et HP1, et déclenche le dépôt de la marque H3K9me3 aux RE (Schultz et al. 2002) [Figure 7]. La perte de *Kap1* dans les cellules ES murines provoque une diminution de l'enrichissement de SETDB1 aux RE (Matsui et al. 2010). KAP1 et ses partenaires répresseurs peuvent être recrutés aux sites cibles de façon spécifique par les facteurs de transcription KRAB-ZFP (Friedman et al. 1996; Huntley et al. 2006; Ecco, Rowe, et Trono 2016). Les cellules somatiques expriment des KRAB-ZFP qui sont spécifiques du tissu. Ces facteurs de

transcription régulent ainsi l'expression des RE et également des gènes par ses interactions avec KAP1 et les RE et ce de façon tissu spécifique (Ecco, Rowe, et Trono 2016; Brattås et al. 2017).

Le séquençage du génome humain a permis d'identifier 423 loci indépendants codant pour des KRAB-ZFP, produisant des transcrits alternatifs qui, au total, peuvent potentiellement donner au moins 742 KRAB-ZFP structurellement distinctes (Huntley et al. 2006). Les gènes codant pour les KRAB-ZFP ont eu une expansion rapide probablement pour permettre aux espèces hôtes de répondre à l'émergence de nouveaux RE (Thomas et Schneider 2011). Par exemple le facteur ZNF91, faisant partie de la famille de KRAB-ZFP, a subi une série de modifications structurelles il y a 8 à 12 millions d'années qui lui a permis d'inhiber l'expression des éléments SVA (Jacobs et al. 2014). De plus l'analyse de ChIP-seq de 222 KRAB-ZFP humaines révèle une corrélation entre l'âge estimé des KRAB-ZFP et leur RE cibles (Imbeault, Helleboid, et Trono 2017).

Ainsi les complexes KAP1/KRAB-ZFP sont considérés comme des facteurs pivots pour le recrutement de SETDB1 aux RE (Fukuda et Shinkai 2020). Afin de renforcer la répression des RE, KAP1 recrute des DNMT *de novo* ne nécessitant pas de séquences spécifiques d'ADN, à la différence des KRAB-ZFP (Rowe et Trono 2011) [Figure 19B]. La répression des RE induite par KAP1 a également lieu dans les tissus adultes (Turelli et al. 2014; Fasching et al. 2015; Ecco, Rowe, et Trono 2016).

Le complexe HUSH (*human silencing hub*), composé de FAM208A (aussi appelé TASOR), MPHOSPH8 (aussi appelé MPP8) et PERIPHILINE 1 (PPHLN1), est recruté dans les régions génomiques riche en H3K9me3 et interagit avec SETDB1 et une enzyme ayant une activité ATPase MORC2 (Brummelkamp et van Steensel 2015; Tchasovnikarova et al. 2015) [Figure 19C]. La perte des composants du complexe HUSH réduit le niveau de H3K9me3 et altère la transcription (Tchasovnikarova et al. 2015). En 2018, Robbez-Masson *et al.* montrent que KAP1 et FAM208A interagissent avec à la fois les ERV et les jeunes éléments L1 (Robbez-Masson et al. 2018). Cependant, FAM208A est principalement requis pour réprimer des jeunes éléments L1 tandis que KAP1 est nécessaire pour les deux (Robbez-Masson et al. 2018). Le complexe HUSH et la protéine MORC2 peuvent se lier à des jeunes éléments L1 ayant une séquence intacte et localisée au sein de gènes transcriptionnellement actifs, et promouvoir le dépôt de la marque H3K9me3 pour réprimer la transcription (N. Liu et al. 2018). Non seulement cette voie inhibe la rétrotransposition des éléments L1 mais aussi elle diminue l'expression des gènes de l'hôte (N. Liu et al. 2018). L'ensemble de ces résultats

démontrent que le choix du mécanisme épigénétique impliqué dans la répression des RE dépend grandement de la nature et du statut évolutif de chaque RE.

Les enzymes SUV39H et SETDB1, en plus de contribuer au dépôt de H3K9me3, permettent aussi celui de la marque H3K9me2 (Rea et al. 2000; Schultz et al. 2002). D'autres H3K9 KMT, telles que G9A, responsable du dépôt de la marque H3K9me2, sont requises pour la méthylation de l'ADN aux RE dans les cellules ES murines (Dong et al. 2008). La perte de G9A dans ces cellules conduit à une augmentation de l'expression des éléments MERVL et de transcrits chimériques, démontrant un rôle direct de G9A dans la répression de ces RE (Maksakova et al. 2013). En 2020, Jiang *et al.* montrent que G9A réprime la transcription des variants d'épissages dérivés de RE dans les cellules ES murines (Q. Jiang et al. 2020).

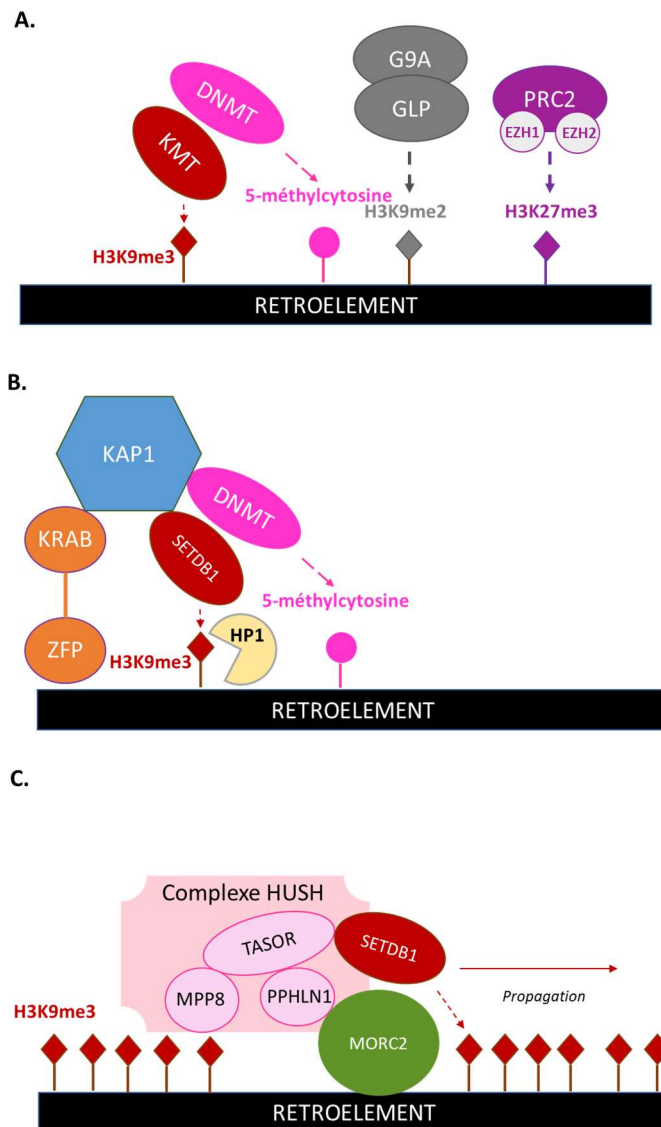


Figure 19. Les différents mécanismes de répression des RE.

A. Les différentes marques épigénétiques répressives aux RE : Les marques H3K9me3, H3K9me2, H3K27me3 et la méthylation de l'ADN sont impliqués dans la répression des RE ; **B. Le complexe KAP1-KRAB-ZFP :** Le complexe KAP1-KRAB-ZFP permet de recruter des KMT et DNMT pour déposer la marque H3K9me3 et la méthylation de l'ADN aux RE, respectivement ; **C. Le complexe HUSH :** Le complexe HUSH est composé de TASOR, MPP8 et PPHLN1. Il se lie à H3K9me3 grâce à MPP8 et interagit avec SETDB1 et MORC2 permettant la propagation de H3K9me3.

En récréant un environnement hypométylant par l'ajout de la vitamine C et de deux inhibiteurs de kinase dans le milieu de culture des cellules ES, Walter *et al.* mettent en évidence qu'à la suite d'une perte de méthylation de l'ADN, plusieurs familles de RE sont réprimées à nouveau (M. Walter et al. 2016) ; alors que dans ces conditions déméthylantes la marque H3K9me3 reste stable, la marque H3K9me2 disparaît globalement et la marque H3K27me3 s'accumule au niveau des éléments L1 et des ERV (M. Walter et al. 2016). Généralement H3K9me3 et H3K27me3 ne se retrouvent pas simultanément dans les mêmes territoires (M. Walter et al. 2016). Néanmoins dans ce contexte particulier, ces deux marques répressives se trouvent sur les mêmes RE, les éléments L1 et les jeunes ERV, mais elles ne se chevauchent pas spatialement. En effet, H3K9me3 a tendance à occuper la région 5' et H3K27me3 la région 3' de ces RE (M. Walter et al. 2016) [Figure 20]. Nous verrons ultérieurement que dans un contexte oncogénique ce mécanisme de compensation de la perte de méthylation de l'ADN par des marques épigénétiques implique aussi les marques H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3 (Ohtani et al. 2018).

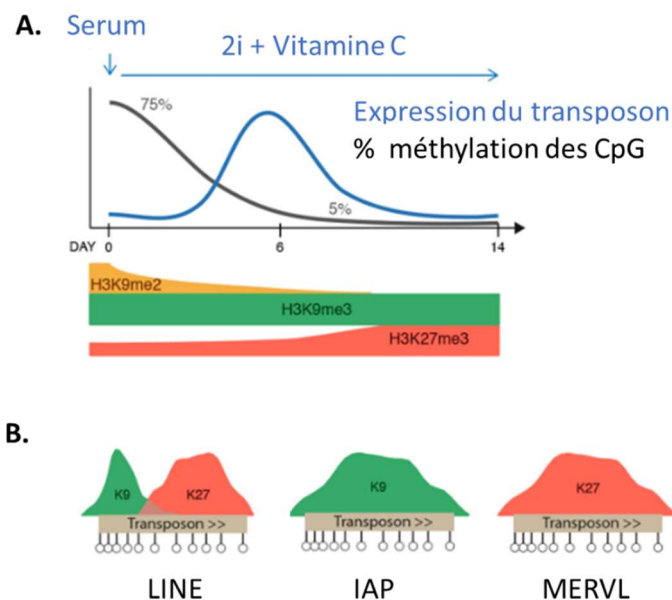


Figure 20. Modèle d'acquisition de la marque H3K27me3 sur les éléments

transposables suite à une déméthylation.

(Adapté de Walter et al. 2016)

A. Représentation schématique des changements chromatinien et transcriptionnels suite à un environnement hypométhylant (deux inhibiteurs de kinase + vitamine C) : H3K9me2 est rapidement effacée, H3K9me3 reste stable et H3K27me3 augmente. L'expression du transposon apparaît au jour 6 puis elle est retrouvée réprimée au jour 4 ; **B. Trois grands types d'organisation chromatinienne répressive lors de la perte de la méthylation de l'ADN après 14 jours :** Les LINE sont marqués par H3K9me3 sur leur extrémité 5' et par H3K27me3 sur leur région 3'. Les éléments IAP sont entièrement couverts par H3K9me3 et ne gagnent pas H3K37me3. Les éléments MERVL perdent H3K9me2 et H3K9me3 et acquièrent H3K27me3 sur toute leur longueur.

c. L'interférence par ARN

L'ARNi est un mécanisme de protection qui lutte contre les parasites génomiques. Différentes voies de l'ARNi (siARN, miARN, piARN, rasiARN, endo-siARN) existent pour réprimer les RE suggérant une « adaptation opportuniste » par l'organisme hôte en réponse à l'activité des RE (Mita et Boeke 2016). Il a également été proposé que les miARN ont évolué à partir de RE (Roberts 2014). Le complexe DGCR8 et Drosha, impliqué dans la biogenèse des miARN, est capable de reconnaître et de se lier sur des ARN dérivant des éléments L1, Alu et SVA (Heras et al. 2013).

Dicer et Argonaute (Ago) sont deux composants centraux de la machinerie de l'ARNi (Svoboda 2020). Dicer clive l'ARN double brin (ARN-db) en petits ARN interférents. Puis généralement, un de ses brins d'ARNi est intégré dans le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) qui contient les protéines Agos. En fonction du type de protéines Ago et de la complémentarité de séquence de l'ARNi, la répression aura lieu soit par clivage ou blocage de la traduction du transcrite cible (Valencia-Sanchez et al. 2006). Des mutations dans les gènes codants les protéines de la famille Dicer et argonaute conduit à une réactivation des RE dans de nombreux espèces eucaryotes (Slotkin et Martienssen 2007).

Les rasiARN (*repeat associated short interfering RNA*) peuvent être produits à partir de la région 5'UTR des éléments L1 et être utilisé par le complexe RISC pour la dégradation des transcrits L1 (Ciaudo et al. 2013).

Les piARN (*piwi-interacting RNA*) et les endo-siARN (*small interfering RNA*) sont transcrits à partir de clusters de RE puis exportés dans le cytoplasme où ils sont utilisés comme guides pour la dégradation des transcrits de RE (Brennecke et al. 2007; Aravin et al. 2008; Muñoz-Lopez et al. 2016; Hirakata et Siomi 2016). En 2014, Pezic *et al.*

mettent en évidence qu'en plus de la méthylation de l'ADN, la voie des piARN est requise pour maintenir un haut niveau H3K9me3 sur les LINE dans les cellules germinales de la souris (Pezic et al. 2014). La répression des RE par les piARN peut affecter aussi l'expression des gènes adjacents chez *D. melanogaster* (Lee 2015). Dans les cellules souches germinales de *D. melanogaster*, la transcription des piARN requière l'activité de SETDB1, démontrant l'étroite relation entre l'expression des RE et la régulation de la chromatine par la cellule hôte (Rangan et al. 2011).

d. La méthylation de l'adénine en N6 des ARN

En 2021, Xiong *et al.* rapportent que dans les cellules humaines de nombreux ARN issus des RE, en particulier des éléments L1 introniques sont fortement enrichis en m6A. La modification m6A au niveau de l'ARN régule positivement l'expression des éléments L1 et favorise ainsi leur rétro-transposition (Xiong et al. 2021). La particularité de ces éléments L1 est qu'ils sont apparus récemment dans l'évolution et sont orientés en sens des gènes des hôtes. De plus, ils résident préférentiellement dans les longs gènes ayant des rôles dans la réparation des dommages à l'ADN, mettant en évidence une nouvelle stratégie des éléments L1 pour affaiblir l'hôte (Xiong et al. 2021). La marque m6A sur l'ARN peut également déstabiliser les ARN de certains RE par exemple les transcrits IAP (Chelmicki et al. 2020).

Les RE sont donc régulés par différents mécanismes épigénétiques à tous les niveaux : ADN, ARN et protéines (histones).

5. Les rétro-éléments avec l'âge

L'activation des RE est observée dans différents types cellulaires avec l'âge et dans différentes espèces telles que la drosophile (W. Li et al. 2013; H. Chen et al. 2016; Wood et al. 2016), la souris (De Cecco, Criscione, Peterson, et al. 2013; Van Meter et al. 2014), l'Homme (De Cecco, Criscione, Peckham, et al. 2013). En 1992, Driver et McKechnie proposent une théorie selon laquelle l'augmentation de RE dans les tissus somatiques au cours du vieillissement entraîne un raccourcissement de l'espérance de vie (Driver et McKechnie 1992) Des études montrent une expression accrue des éléments Alu dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien de sujet âgés, ce qui peut contribuer à la dégénérescence maculaire associée à l'âge (Kaneko et al. 2011; Tarallo et al. 2012). L'équipe a récemment mis en évidence que l'irradiation des CSH murines qui induit

leur vieillissement prématuré augmente l'expression des RE (des éléments L1, SINE et des ERVs). Ces RE provoquent la persistance des dommages à l'ADN et la perte de fonction des CSH (Barbieri et al. 2018)

La dérégulation des RE est une conséquence de la perte progressive de l'hétérochromatine avec l'âge (Driver et McKechnie 1992; Wood et Helfand 2013; Andrenacci, Cavaliere, et Lattanzi 2020). La chromatine des éléments L1, Alu, SVA devient plus permissive dans les cellules sénescentes induisant une augmentation de leur transcription (De Cecco, Criscione, Peckham, et al. 2013). La perte de SUV39H1 dans les CSH âgées murines est corrélée à une augmentation de l'expression des éléments L1 (Djeghloul et al. 2016). Chez l'Homme, comme chez la souris la diminution globale de la marque H3K9me3 des CSH avec l'âge est associée à une expression accrue de nombreux RE (Djeghloul et al. 2016; Barbieri et al. 2018). Ces résultats suggèrent qu'une dérégulation des mécanismes contrôlant l'expression des RE dans les CSH pourrait participer à leur changement fonctionnel.

En 2013, Li *et al.* montrent que chez la drosophile, des mutations dans le gène Argonaute 2 (*Ago2*), conduit à une expression élevée des RE dans le cerveau, amenant progressivement à des troubles de la mémoire et une réduction de la durée de la vie. Ces observations démontrent l'importance du contrôle des RE par l'hétérochromatine dans la fonction neuronale (W. Li et al. 2013)

Les régions de l'hétérochromatine ont des points d'ancrages dans la lamina nucléaire qui est un maillage fibrillaire bordant l'enveloppe nucléaire (Stancheva et Schirmer 2014). La lamina nucléaire comprend deux types de composants : les protéines associées aux lamines et les lamines. Le corps gras ('fat body') de la drosophile est un organe de l'immunité humorale dont l'équivalent chez les mammifères est le foie et le tissu adipeux. Avec l'âge les cellules du corps gras de la drosophile ont une réduction de la lamine B contribuant à la perte de l'hétérochromatine et à la dérégulation de gènes impliqués dans l'immunité (H. Chen, Zheng, et Zheng 2014). Les corps gras venant de drosophiles âgées ont une augmentation de nombreux RE par rapport à ceux des jeunes drosophiles (H. Chen et al. 2016). Cette dérégulation des RE dans les corps gras de drosophiles âgées est corrélée à une hausse des dommages à l'ADN (H. Chen et al. 2016). La déplétion de la lamine B dans les jeunes cellules de corps gras conduit à une augmentation des RE similaire aux cellules âgées de corps gras (H. Chen et al. 2016). De plus, la perte de la lamine B dans ces cellules est associée à une hausse et une baisse de H3K4me3, H3K9me3 respectivement aux RE. Ces résultats suggèrent que la perte de la lamine B avec l'âge contribue à l'augmentation des RE due en partie à la réduction de l'hétérochromatine (H. Chen et al. 2016).

La réduction de la lamine B1 liée à l'âge est aussi observée chez l'Homme dans les kératinocytes de l'épiderme, dans les cellules épithéliales du thymus et dans les fibroblastes sénescents (Dreesen et al. 2013; Shah et al. 2013; Yue 2017).

Le syndrome de vieillissement prématuré est une rare forme de laminopathie qui est due à une mutation silencieuse G608G dans le gène LMNA, qui code pour la lamine A, causant une perte du site de clivage protéolytique de la protéine (Eriksson et al. 2003). Des anomalies de la lamina nucléaire et des altérations de l'architecture de la chromatine sont observées dans cette pathologie. De nombreuses études soutiennent l'hypothèse selon laquelle la Progeria et d'autres laminopathies progéroïdes pourraient récapituler les aspects accélérés du vieillissement (Aliper et al. 2015; Cenni et al. 2018; Gargiuli et al. 2018). Aucune étude sur le comportement des RE et leur régulation dans les cellules de Progeria à ce jour a été réalisée bien qu'elle pourrait permettre d'apporter de nouvelles connaissances sur le rôle des RE dans le vieillissement (Andrenacci, Cavaliere, et Lattanzi 2020).

L'inflammation est un facteur qui contribue à de nombreuses maladies liées à l'âge et peut être déclenchée par l'expression anormale de RE (López-Otín et al. 2013; Franceschi et Campisi 2014; Simon et al. 2019). Des copies d'ADNc des éléments L1 cytoplasmique sont retrouvées dans des cellules sénescents et âgées (De Cecco et al. 2019; Simon et al. 2019). Cette accumulation de RE cytoplasmique induit une réponse immune et de l'inflammation. Le traitement des souris âgées avec un inhibiteur de la transcriptase inverse réduit l'activation du système immunitaire et de l'inflammation dans plusieurs tissus (Simon et al. 2019). Des résultats similaires sont obtenus avec des souris *Sirt6*^{-/-} qui sont déplétées de l'enzyme SIRT6 responsable de la répression des éléments L1 par la mono-ADP ribosylation de KAP1 (Van Meter et al. 2014). Ces souris *Sirt6*^{-/-} présentant un vieillissement prématuré ont une dérégulation des éléments L1 (Van Meter et al. 2014). L'inhibition de la réplication des éléments L1 améliore la santé et la durée de vie des souris *Sirt6*^{-/-} (Simon et al. 2019).

La diète restrictive est connue pour augmenter la longévité des espèces. En 2016, Wood *et al.* observent que les drosophiles avec un régime hypocalorique ont une atténuation de l'augmentation des RE et de leur rétro-transposition liée à l'âge (Wood et al. 2016). De plus, ils testent si l'augmentation génétiquement de deux systèmes importants dans la maintenance et la structure de l'hétérochromatine (les modifications post-traductionnelles des histones et la voie de l'ARNi) permet de réverter le phénotype lié à l'âge. Ils utilisent des transgènes pour augmenter l'expression de *Sir2* (une enzyme de la famille des sirtuines ayant une activité HDAC), *Dicer-2* (la voie de siARN), *Su(var)3-9* (une H3K9 KMT) ou bien le gène *Adar* rendu hypomorphe (un régulateur négatif de

la voie de siARN). Les interventions génétiques atténuent la hausse de l'expression des RE liée à l'âge et permettent d'allonger la durée de vie des drosophiles (Wood et al. 2016). L'ensemble de ces résultats suggèrent que le maintien de l'hétérochromatine et la préservation de la répression des RE sont des clés pour augmenter l'espérance de vie dans cet organisme modèle.

6. Les rétro-éléments dans l'oncogenèse

Des niveaux élevés de transcrits de RE sont trouvés dans plusieurs cancers et d'autres maladies (Kassiotis 2014; Rodić et al. 2014). En 2011, Ting *et al.* montrent une hausse élevée des transcrits de séquences satellites dans les cancers épithéliaux de souris et de l'Homme (Ting et al. 2011). L'activation de l'expression et de la rétro-transposition des éléments L1 sont décrites dans diverses tumeurs humaines telles que les tumeurs colorectales, mammaires, prostatiques, ovariennes, pulmonaires et hépatiques (Sunami et al. 2011; van Hoesel 2012; Rodić et al. 2014).

Par la mutagenèse et la perte des mécanismes de régulation des RE, le génome hôte peut domestiquer les RE comme des régulateurs de l'organisation génomique et de la transcription (Ishak, Classon, et De Carvalho 2018). Ce processus dans le contexte des cancers est connu sous le nom de « onco-exaptation » où les cellules cancéreuses ayant une dérégulation des RE acquièrent un avantage compétitif sur les autres cellules en raison de l'expression d'oncogènes. Elles favorisent leur prolifération clonale et ainsi à la croissance tumorale (Babaian et al. 2016; H. S. Jang et al. 2019).

Les éléments L1 peuvent contribuer à la tumorigenèse par l'activité d'endonucléase qu'ils codent et/ou par leur insertion qui peut affecter l'expression des gènes. L1-ORF1p, une protéine codée par l'ORF1 des éléments L1 et qui est requise pour la transposition, est surexprimée dans divers types de cancers de haut grade, rarement détectée dans les stades précoces de tumorigenèse, et est absente des tissus somatiques normaux (Rodić et al. 2014). Elle est retrouvée par exemple dans 97% des cas de cancers du sein, 93.5% des cancers de l'ovaire, 89% des cancers pancréatiques, dans une étude où l'analyse immunohistochimique a été effectuée sur des « puces à tissus » (tissue microarray) (Rodić et al. 2014). L'inhibition de la transcriptase inverse codée par l'ORF2 des éléments L1 réduit la prolifération des cellules cancéreuses, favorise leur différenciation et empêche la progression tumorale dans des modèles animaux (Sciamanna, De Luca, et Spadafora 2016). Bien que de nombreux articles décrivent le rôle des éléments L1 dans la tumorigenèse, ils ne répondent pas à la

question de savoir si la surexpression et l'amplification des éléments L1 agissent comme des « *drivers* » ou des « *passengers* » (Rodić et Burns 2013).

En 2013, Shulla *et al.* élucident deux mécanismes activés par les éléments L1 impliqués dans la tumorigénèse (Shukla et al. 2013). Le premier mécanisme est un événement de rétro-transposition germinale dans le gène suppresseur de tumeurs *MCC*, causant une perte de son expression et favorisant ainsi la signalisation oncogène β -caténine/Wnt. Le second procédé est une insertion L1 spécifique dans le gène *ST18*, décrit comme un oncogène dans les cancers du foie, permettant de bloquer la répression de son enhancer et ainsi favoriser son expression (Shukla et al. 2013). En 2014, Lau *et al.* montrent que la formation d'un transcrite chimérique *Hbx-LINE1*, ayant une fonction de LncARN et activant la voie de signalisation β -caténine/Wnt, favorise le développement et la progression des tumeurs hépatiques (Lau et al. 2014). La même année, Sciamanna *et al.* proposent un modèle selon lequel la transcriptase inverse des éléments L1 peut moduler la biogenèse des miARN, en interceptant les ARNs pour les convertir en hybride ARN-ADN (Sciamanna et al. 2014). En 2015, Aschacher *et al.* montrent que les éléments L1 ont un rôle critique dans la maintenance des télomères pour les cellules tumorales positives à la télomérase (Aschacher et al. 2016).

Des insertions mutagènes des éléments Alu sont trouvées dans de nombreux cancers notamment dans le gène *CRB1* pour le rétinoblastome (den Hollander et al. 1999), le gène *BRCA2* (Machado et al. 2007) pour le cancer du sein. Les gènes ayant un nombre important d'éléments Alu dans leur séquence ont un fort risque de subir des réarrangements géniques impliquant la recombinaison homologue non allélique des éléments Alu, contribuant à l'oncogénèse. Ce mécanisme d'action est spécifique aux éléments Alu et est retrouvé dans le gène *MLH1* (van der Klift et al. 2005) et *MLH2* (Charbonnier et al. 2005) pour le syndrome de Lynch qui augmente le risque de développer un cancer, le gène *VHL* (Franke et al. 2009) pour la maladie de von Hippel-Lindau qui prédispose au développement de tumeurs, le gène *hCAD* (Hsieh et al. 2005) pour les tumeurs hépatiques, le gène *BRCA1* dans le cancer du sein (T. M. Smith et al. 1996). Tout comme les L1, les éléments Alu sont aussi impliqués dans l'altération de l'expression génique dans le cancer (Belancio et al. 2010).

Plus récemment, en 2020, dans le cadre du projet Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes (PCAWG), Rodriguez-Martin *et al.* ont analysé les schémas et les mécanismes de la rétrotransposition somatique des RE dans 2 954 génomes de cancers provenant de 38 sous-types de cancer histologique (Rodriguez-Martin et al. 2020). Ils ont ainsi identifié 19 166 événements de rétrotransposition somatique, qui ont été classés en 6 catégories : « solo-L1 », « L1-mediated transductions », « L1-mediated

rearrangements », « Alu », « SVA » et « pseudogenes ». 98% de ces événements sont dus aux intégrations des éléments L1 alors que les éléments Alu, SVA et pseudogènes représentent une catégorie mineure. Les éléments L1 sont apparus comme le premier type de variation structurale somatique le plus fréquent dans le cas de l'adénocarcinome œsophagien, et le deuxième plus fréquent dans les cancers de la tête et du cou et les cancers colorectaux. Les intégrations aberrantes des éléments L1 peuvent initier des cycles de « cassure, fusion et pont », entraînant une amplification des oncogènes. Ils peuvent également être responsables de la suppression d'une région chromosomique (à l'échelle d'une mégabase) pouvant conduire à l'élimination de gènes suppresseurs de tumeur, et être impliquées dans l'induction de translocations et de duplications (Rodriguez-Martin et al. 2020). Les insertions somatiques des éléments L1 tendent à avoir lieu dans des gènes couramment mutés dans les cancers, altérant l'expression des gènes cibles. Elles sont orientées vers des régions déméthylées de l'ADN spécifiques du cancer (E. Lee et al. 2012). Ces données mettent en évidence le rôle majeur des éléments L1 dans le remodelage du génome et soulignent leurs impacts potentiels dans la tumorigenèse (E. Lee et al. 2012; Rodriguez-Martin et al. 2020).

Les modifications de la méthylation de l'ADN dans les cancers humains sont caractérisées par une hyperméthylation locale des îlots CpG et une hypométhylation génomique globale (Herman et Baylin 2003; Feinberg et Tycko 2004). Plusieurs études suggèrent que la dérégulation des RE dans les tumeurs humaines est une conséquence de l'altération de la méthylation de l'ADN (Bestor 1998; Iskow et al. 2010) [Figure 21]. C. Iskow *et al.* mettent en évidence que la dérégulation du méthylome dans le génome humain de cellules cancéreuses du poumon est responsable de la mobilisation des L1 (Iskow et al. 2010). Cho *et al.* montrent que l'hypométhylation des éléments L1 et Alu contribue à la progression des cancers de la prostate (Cho et al. 2007). Les éléments régulateurs cryptiques au sein des RE peuvent être réactivés épigénétiquement dans le cancer pour permettre l'expression d'oncogènes. Jang *et al.* identifient 129 événements d'activation de promoteurs cryptiques des RE impliquant 106 oncogènes dans 3 864 tumeurs (Jang et al. 2019). Le transcrit chimérique AluJb-LIN28B, issu de la fusion de l'oncogène LIN28B avec le RE AluJb est surexprimé dans plusieurs lignées cellulaires, H1299, RERF-LC-OK et H838. Jang *et al.* montrent que dans des lignées cellulaires la délétion génétique de AluJb empêche l'expression de LIN28B. De plus, la méthylation du AluJb suffit à réduire l'expression de l'oncogène tandis que la déméthylation du RE permet la production de la protéine de fusion AluJb-LIN28B. Ces observations soulignent la nécessité et la suffisance d'un RE pour l'activation d'un oncogène (Jang et al. 2019).

L1-MET est un des transcrits chimériques le mieux étudié dans le cancer (Cervantes-Ayalc, Ruiz Esparza-Garrido, et Velázquez-Flores 2020). *MET* est un proto-oncogène codant pour un récepteur à tyrosine kinase dont l'activation favorise la prolifération, la survie, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire (Comoglio, Trusolino, et Boccaccio 2018). Dans des conditions non pathologiques, la transcription de *MET* est contrôlé par son promoteur ; néanmoins, dans certains types de cancer, le promoteur antisens de l'élément L1 contrôle la transcription de *MET*, générant un transcrit chimérique *L1-MET* et une nouvelle protéine à la fonction altérée (Hur et al. 2014; Zhu et al. 2014; Miglio et al. 2018). L'hypométhylation spécifique du promoteur de l'élément L1 induit l'expression du transcrit *L1-MET* dans les tumeurs de vessies et dans les métastases du cancer colorectal (Wolff et al. 2010; Hur et al. 2014).

Les cellules de lymphomes de Hodgkin dérivées de cellules B sont dépendant du récepteur CSF1R (un proto-oncogène ayant un rôle dans le lignage myéloïde) pour leur croissance et leur survie. Dans ces cellules, la transcription du gène CSF1R s'initie au niveau d'une séquence LTR endogène de l'élément THE1B activée de manière aberrante. La dérégulation de cette séquence du RE est associée à une altération de la régulation épigénétique causée par la perte de l'expression du corépresseur CBFA2T3 (Lamprecht et al. 2010).

La dérégulation des RE dans les cancers peut être ainsi le reflet des altérations globales de l'hétérochromatine et pourrait être utile comme biomarqueur pour la détection du cancer (Ting et al. 2011). En 2019, Edginton-White *et al.* démontrent que l'activation des LTR fournit une couche supplémentaire de dérégulation des gènes en agissant comme enhancers dans le lymphome de Hodgkin. L'activation globale des LTR est induite par de forts stimuli inflammatoires, suggérant l'implication potentielle des LTR dans d'autres maladies inflammatoires (Edginton-White et al. 2019). Une année plus tard, Deniz et al. mettent en évidence que les ERV sont une source d'enhancers pour de potentiels oncogènes dans la LAM (Deniz et al. 2020). L'ensemble de ces résultats illustre l'importance d'étendre la recherche sur les mécanismes favorisant l'expression d'oncogènes aux régions répétées du génome, ce qui permettrait d'ouvrir la voie au développement de nouvelles approches pronostiques et thérapeutiques (Deniz et al. 2020).

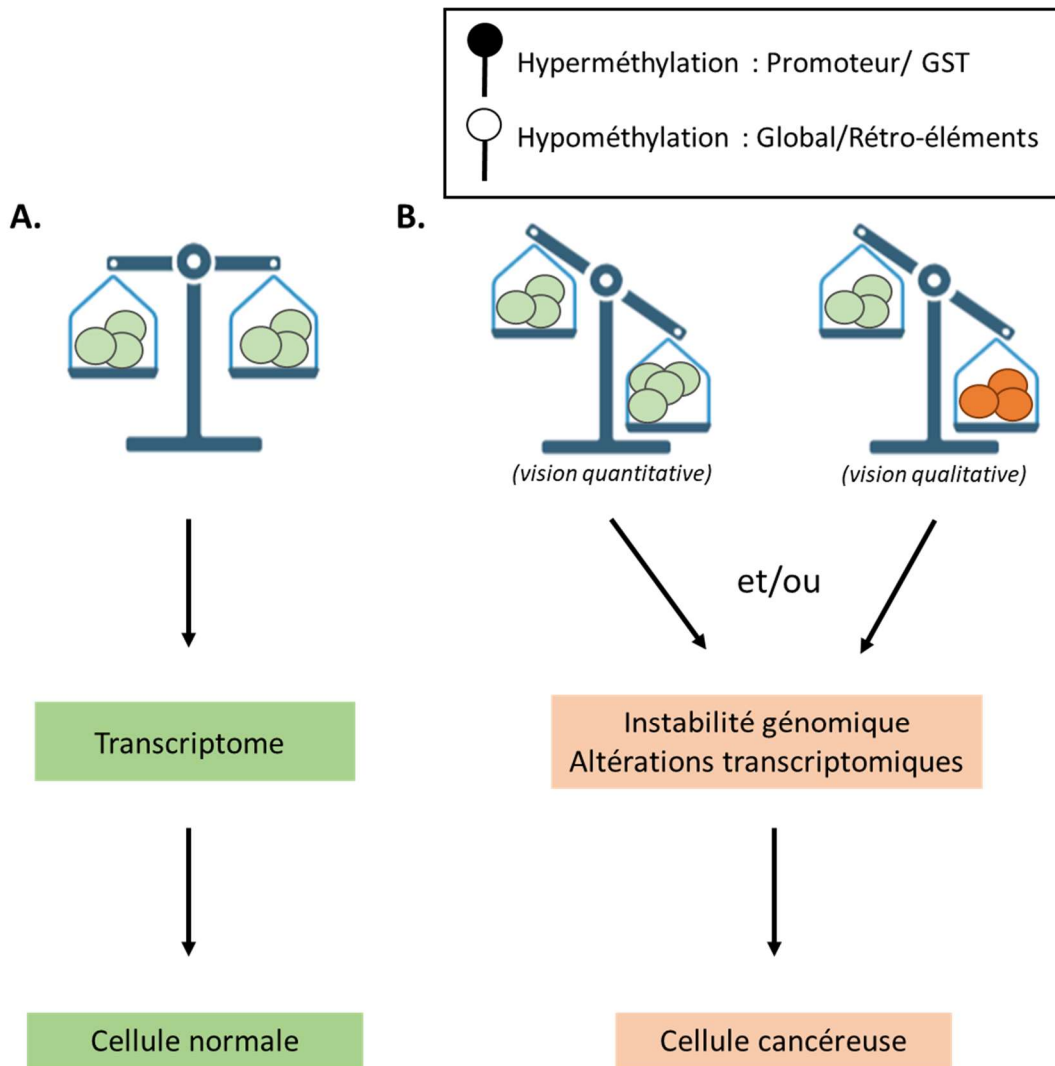


Figure 21. Rôle physiopathologique des rétro-éléments.
A. Les RE peuvent avoir un rôle fonctionnel, physiologique dans les cellules normales ; **B.** Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une hyperméthylation locale des promoteurs, des gènes suppresseurs de tumeurs (GST) et une hypométhylation globale comprenant les RE. L'augmentation importante de RE (*vision quantitative*) et/ou de certains RE oncogènes (*vision qualitative*) peuvent induire une instabilité génomique et des altérations transcriptomiques et amener à l'oncogénèse.

7. Les rétro-éléments dans l'induction de la réponse immunitaire

a. Généralités sur le système de signalisation interféron

Le système de signalisation interféron (IFN), faisant partie du système immunitaire inné, qui comme le nom le suggère, interfère avec la propagation du virus chez l'hôte

(Vilcek 2006). Ces molécules antivirales sont classées en trois types : I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , et IFN- ω), II (IFN- γ) et III (IFN- λ). Les IFN permettent une induction de l'expression de centaines de gènes (ISG, *interferon stimulated genes*) dans les cellules infectées et les cellules avoisinantes, générant un état antiviral (Schneider, Chevillotte, et Rice 2014). Les IFN de type II et III sont exprimés par les cellules immunitaires (monocytes/macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T) et les cellules épithéliales respectivement (M. R. Walter 2020). Lors d'une infection virale, les IFN de type I (IFN-I), qui sont produits par toutes les cellules infectées sont les IFN majoritairement produits. Les IFN- α et IFN- β sont les mieux caractérisés, codés respectivement par 13 gènes et 1 gène chez l'Homme, tandis que les autres sous-types IFN-I (IFN- ϵ , IFN- κ , et IFN- ω) restent peu décrites en raison de leur expression tissulaire limitée, des fonctions communes avec IFN- α et IFN- β et des différences entre les espèces (Pestka, Krause, et Walter 2004; Hardy et al. 2004; Capobianchi et al. 2015). La réponse IFN de type I est initiée par la reconnaissance d'acides nucléiques (ADN-sb, ADN-db ou ARN-db dans le cytosol) provenant de différentes sources (virale, mitochondriale etc...) par des récepteurs regroupés sous le nom *PRR* (*pattern-recognition receptors*), incluant les RLR (*retinoic acid-inducible gene-like receptors*), les TLR (*toll-like receptors*), les différents récepteurs à l'ADN cytosoliques (IFI16, etc.).

La présence d'ARN-db dans le cytoplasme est détectée par les RLR qui sont composés de trois protéines ayant une activité hélicase : RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) et LGP2 (*probable ATP-dependent RNA helicase*). RIG-1 lie les petits ARN-db (<300bp) avec une extrémité 5' di- ou triphosphate tandis que MDA5 se fixe sur des fragments plus longs d'ARN-db (>1 Kbp) (Kato et al. 2008; Myong et al. 2009; Goubau et al. 2014). Les protéines RIG-1 et MDA5 interagissent avec une protéine située sur la membrane externe de la mitochondrie : MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*). Ne pouvant pas se lier à MAVS, LGP2 régule l'activité de RIG-1 et MDA5 (Sato et al. 2010). En activant les protéines kinases IKK (*IkappaB kinase*), MAVS est capable de moduler l'activité du facteur de transcription NF- κ b. De plus, MAVS interagit avec les protéines TRAF (*TNF receptor associated factors*) pour permettre le recrutement de TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) et IKK et ainsi favoriser la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (Seth et al. 2005; R. Fang et al. 2017; Dalskov et al. 2020). Les facteurs de transcriptions NF- κ b, IRF3 et IRF7 transloquent dans le noyau pour déclencher l'expression des gènes codant pour les IFN-I et les cytokines pro-inflammatoires (Kawai et al. 2005) [Figure 22]. D'autres voies importantes pour la défense antivirale sont activées par la présence d'ARN-db dans le cytoplasme (Gazquez-Gutierrez et al. 2021). DHX33 (*DEAH-Box Helicase 33*), une protéine ayant une activité hélicase est

capable de reconnaître de l'ARN-db. La détection d'acides nucléique anormaux conduit DHX33 à interagir avec NLRP3 (*NOD-like receptor family*) pour former un complexe appelé l'inflammasome. Ce complexe induit la transformation de la pro-IL-1 et la pro-IL-18 en cytokines pro-inflammatoires (Mitoma et al. 2013). La kinase PKR (*protein kinase R, un ISG*) se lie à l'ARN-db et arrête la synthèse des protéines en phosphorylant le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (Levin et London 1978). Les protéines OAS (*2'-5'-oligoadenylate synthetase*) reconnaissent également de l'ARN-db et activent l'endoribonucléase L (RNase L) pour dégrader ces ARN anormaux (Silverman 2007) [Figure 22].

La voie majoritaire de surveillance d'ADN cytoplasmique est initiée par cGAS, la synthase de GMP-AMP cyclique (L. Sun et al. 2013). Elle provoque la formation de GMP-AMP cyclique, un messenger cellulaire qui interagit avec STING, une protéine adaptatrice. De façon analogue aux RLR, la voie cGAS/STING conduit à la translocation nucléaire des facteurs NF- κ B et IRF3 pour aboutir *in fine* à la production d'IFN-I et de cytokines pro-inflammatoires (J. Wu et al. 2013) [Figure 22]

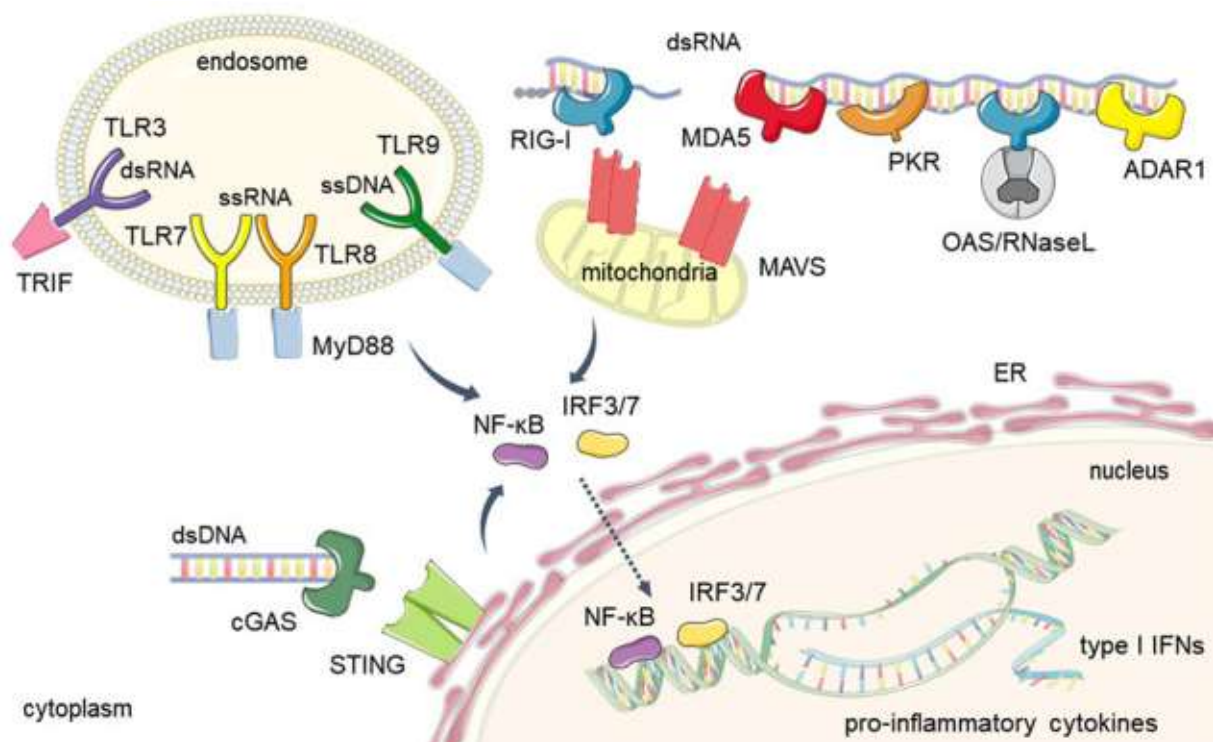


Figure 22. Mécanismes d'actions des différents senseurs d'acide nucléiques.

(Tiré de Gazquez-Gutierrez et al. 2021)

Les senseurs sont catégorisés selon le type d'acide nucléique qu'ils reconnaissent (ADN, ARN) et leur localisation subcellulaire. Situé généralement au niveau de la membrane cellulaire ou de l'endosome, les TLR détectent plusieurs types d'acides nucléiques ; par exemple TLR3 se lie à l'ADN-db, TLR7 et TLR8 interagissent avec de l'ARN et TLR9 reconnaît de l'ADN et aussi des hybrides ARN/ADN. Les récepteurs de la famille des RLR à l'état inactif

résident dans le cytoplasme. L'activation des RLR (MDA5 et RIG-I) par des ARN-db conduit leur agrégation sur les membranes intracellulaires des mitochondries (Onomoto, Onoguchi, et Yoneyama 2021). cGAS est trouvé dans le noyau et peut être exporté dans le cytoplasme en réponse à la présence d'ADN cytosolique (H. Sun et al. 2021). Une fois les acides nucléiques reconnus, ces récepteurs activent une cascade de signalisation qui provoque la translocation nucléaire des facteurs de transcriptions IRF3, IRF7 et de NF-Kb. Ces facteurs conduisent à l'expression d'IFN-I et de cytokines pro-inflammatoires. D'autres protéines cytoplasmiques détectent les ARN-db dérivés de virus, tels que ADAR1 conduisant à la désamination de l'ARN-db, le système OAS/RNase L induisant une dégradation généralisée de l'ARN cytoplasmique, et PKR permettant l'arrêt de la traduction.

Que ce soit pour la signalisation induite par l'ARN-db ou bien l'ADN-sb/db cytoplasmique, les IFN-I produits et sécrétés peuvent agir de façon autocrine ou paracrine en se fixant sur le récepteur hétérodimérique IFNAR (IFNAR1 et IFNAR2) causant l'activation de la voie signalisation JAK/STAT. Cette signalisation génère la synthèse de centaines de protéines codées par les ISG qui permettent d'amplifier la production d'IFN [Figure 23].

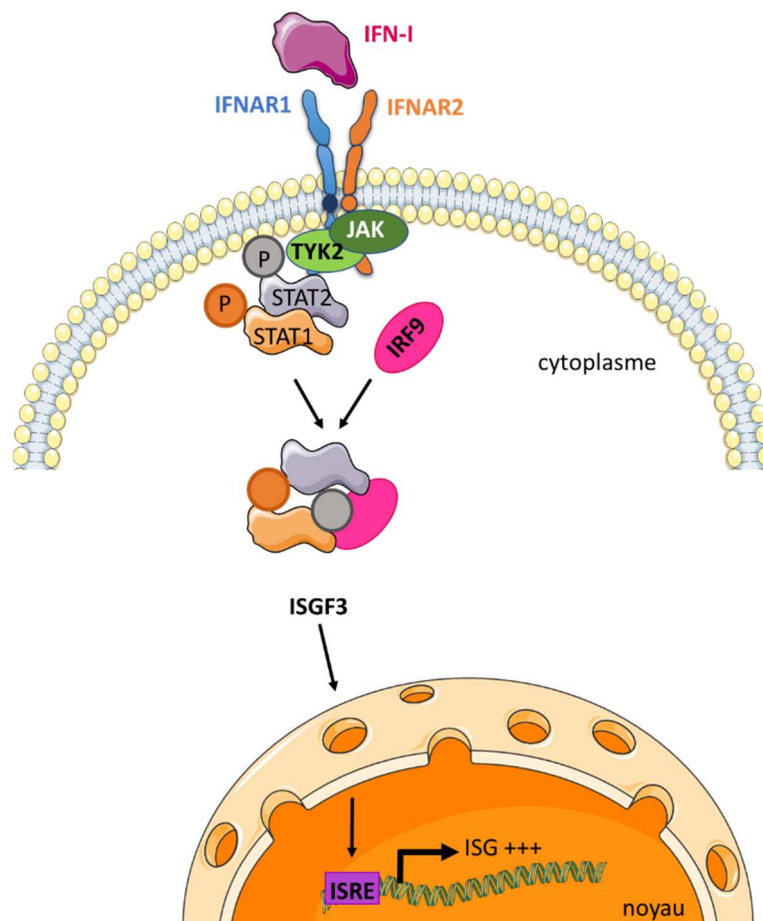


Figure 23. La voie de la signalisation JAK/STAT canonique induite par les IFN-I. Cette voie est activée dans tous les types cellulaires. Les IFN-I sont reconnus par les récepteurs IFNAR déclenchant l'activation de JAK1 et de TYK2, Ces kinases phosphorylent

les récepteurs IFNAR créant des sites d'ancrages pour les facteurs de transcriptions STAT (*signal transducers and activators of transcription*, STAT1 et STAT2). Ces STAT sont également phosphorylés et hétérodimérisent pour former avec IRF9, le complexe ISGF3 (*interferon stimulated gene factor 3*). ISGF3 transloque dans le noyau et se lie à des séquences spécifiques ISRE (*IFN-stimulated regulatory element*) induisant la transcription des ISG.

Ainsi en cas d'infection virale, la cellule est capable de réagir en produisant de très grandes quantité d'IFN. Néanmoins la production est transitoire, expliquée par la courte durée de vie des acteurs de la réponse IFN tels que IRF7, IRF3 et les boucles de rétrocontrôles négatifs (Prakash et Levy 2006; Cao et al. 2009; Wang et al. 2015). Par exemple, TRIM26 régule négativement la production d'IFN- β et la réponse antivirale à travers la poly-ubiquitination et la dégradation d'IRF3 (Wang et al. 2015).

b. Les RE et le système interféron, deux forces motrices de l'évolution qui s'opposent

Le système de signalisation IFN est un moyen de défense permettant de garder l'hôte en bonne santé (Walter 2020). Néanmoins, certains individus peuvent développer des maladies déclenchées par une suractivation du système de signalisation IFN sans la détection de virus ou d'autres pathogènes (M. K. Crow, Olferiev, et Kirou 2019). Le développement de ces maladies auto-immunes suggère l'existence d'éléments endogènes capables d'activer ce système. Outre les autoantigènes, des études mettent en évidence l'implication des RE dans la stimulation du système IFN (Volkman et Stetson 2014; M. K. Crow, Olferiev, et Kirou 2019). Les similarités de structures entre les acides nucléiques viraux et ceux dérivés de RE endogènes peuvent amener les cellules à identifier à tort les RE comme des virus envahissants et ainsi induire la réponse IFN (Gazquez-Gutierrez et al. 2021). Le syndrome d'Aicardi-Goutières est une maladie auto-immune, caractérisée en 1984, par une encéphalopathie néonatale, avec une atrophie cérébrale, des calcifications cérébrales et leucodystrophie (Aicardi et Goutières 1984). Les patients atteints de ce syndrome ont une surexpression d'IFN- α dans le liquide cérébro-spinal et le sang (Lebon et al. 1988). La présence de mutations perte de fonction de l'exonucléase TREX1 est identifiée chez ces patients (Crow et al. 2006). Le travail de Stetson *et al.* sur les souris *Trex1*^{-/-} a permis de présenter un nouveau mécanisme qui évite une induction délétère de l'IFN. Ils mettent en évidence que TREX1 empêche l'accumulation d'ADN issus de la rétro-transcription de RE endogènes (les éléments L1 et IAP) qui, s'ils ne sont pas contrôlés, conduit à une production importante d'IFN-I déclenchant une réponse auto-immune (Stetson et al. 2008). En plus

de générer de l'ADNc, les RE peuvent également être une source d'ARN-db, étant donné que les transcrits de RE peuvent s'hybrider en intramoléculaire compte tenu de la répétition de leurs séquences. La formation d'ADNc cytoplasmique (lors de la reverse transcription des L1 par exemple) ou d'ARN-db issus de l'expression de REs mime une infection virale et conduit à l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B, IRF3 et des voies immunes antivirales (Volkman et Stetson 2014; Sadeq et al. 2021). En 2015, Yu *et al.* montrent que la rétro-transposition d'éléments L1 induit l'expression du gène codant pour IFN- β et des ISG, qui en retour bloque la propagation du L1 (Yu et al. 2015). En 2018, Barbieri *et al.*, mettent en évidence que le système de signalisation IFN-I activé par la TPO limite l'expression de RE induite par l'irradiation (Barbieri et al. 2018).

Les RE ont exploité le système immunitaire de l'hôte pour promouvoir leur propre transcription. En 2016, Chuong *et al.* mettent en évidence l'existence d'enhancers issus des RE, inductibles par l'IFN (Chuong, Elde, et Feschotte 2016). Ils observent que la délétion par CRISPR-Cas9 de RE dans le génome humain altère l'expression des gènes adjacents induit par l'IFN. Ils montrent que l'ERV *MER41B*, situé près de gènes de l'immunité, contient un site de fixation au facteur de transcription STAT1, un acteur majeur de la signalisation IFN. Ainsi l'évolution peut sélectionner des éléments génétiques « égoïstes », les RE, pour générer de nouveaux réseaux de gènes Certains RE qui résident dans les régions 3' non traduites (3'UTR) des ISG peuvent être directement activés en réponse à la signalisation IFN (Cañadas et al. 2018; Jones et al. 2019). Ces séquences rétrovirales endogènes sont orientées en sens inverse dans les 3'UTR des ISG entraînant la formation d'ARN-db par la transcription bidirectionnelle suite à l'exposition à l'IFN. Ces ARN-db peuvent ensuite être détectés par les PRR, conduisant à une boucle de rétroaction positive et ainsi amplifiant la signalisation IFN (Cañadas et al. 2018; Jones et al. 2019). Dans la première partie de mon projet de thèse qui sera décrit à la page 100, nous avons mis en évidence un mécanisme moléculaire impliqué dans la dérégulation des sous-familles des éléments L1 de la souris lors d'un stress dans les CSH qui renforcent les relations causales entre les RE et les gènes immunitaires, ainsi que leur coévolution.

c. Les RE et la réponse IFN dans les cancers

Bien que la capacité des RE à altérer la stabilité génomique et le transcriptome soit une force pour les cellules cancéreuses, elle reste une arme à double tranchant. En effet, une induction importante de RE dans les cellules tumorales peut conduire à leur perte

[Figure 24]. Certaines thérapies anti-cancéreuses telles que la chimiothérapie, la radiothérapie, l'immunothérapie s'appuient sur cette faiblesse pour tuer les cellules cancéreuses.

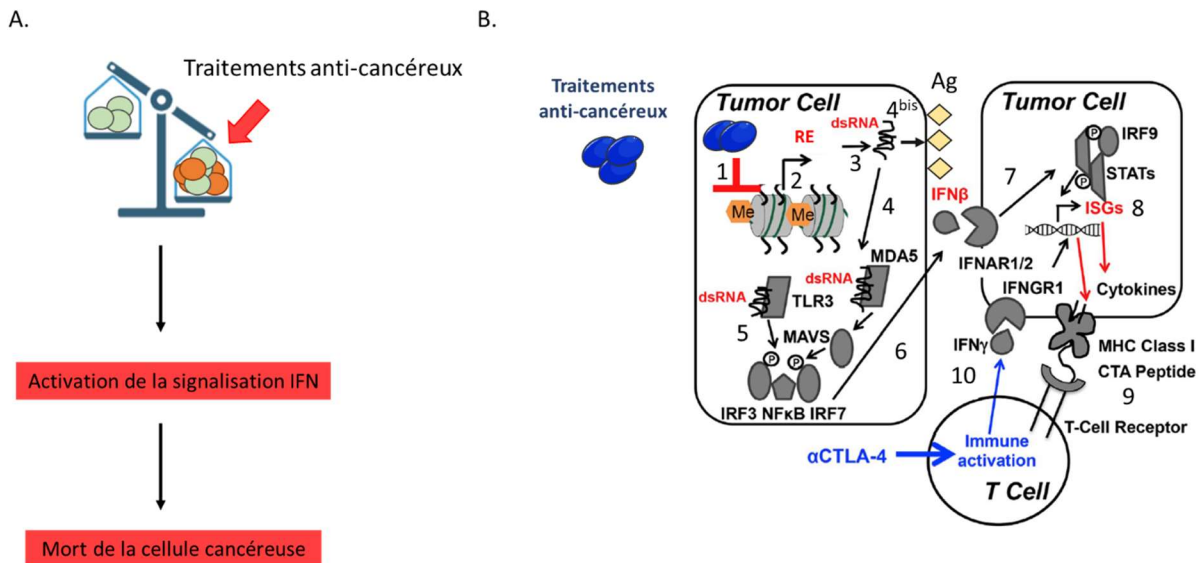


Figure 24. Les rétro-éléments, le talon d'Achille des cellules cancéreuses.

A. Les RE, une arme à double tranchant pour les cellules cancéreuses. Un fort niveau de RE dans les cellules tumorales, par exemple par des traitements anti-cancéreux peut induire une activation de la signalisation IFN et entraîner la mort cellulaire directement de façon autocrine et également indirectement en activant les lymphocytes T.

B. Mécanisme d'action des traitements anticancéreux dans l'induction d'un état mimant une infection virale et dans la réponse immunitaire (*adapté de Chiappellini et al., 2015*). Etape 1 à 3 : L'expression massive des RE par des traitements anti-cancéreux induit la production d'ARN-db, causée par l'hybridation en intramoléculaire des transcrits de RE. Etape 4 à 6 : La présence d'ARN-db dans le cytoplasme des cellules cancéreuses est détectée par les PRR tel que MDA5, RIG1, causant une agrégation de MAVS et l'activation d'IRF7 par TBK1. Puis IRF7 transloque dans le noyau pour induire la transcription des gènes de l'IFN, entraînant ainsi la production, le transport et la sécrétion d'IFN dans le micro-environnement tumoral. Etape 7 à 8 : La cellule cancéreuse a également un récepteur de l'IFN. La liaison de l'IFN aux récepteurs (IFNAR pour l'IFN de type I, IFNLR1-IL10R2 pour l'IFN de type III) entraîne l'activation de voie de la signalisation JAK/STAT qui induit la transcription des ISG. Etape 9 à 10 : L'expression des ISG et l'augmentation de la machinerie de présentation des antigènes (CMH-I, complexe majeur d'histocompatibilité) augmentent la visibilité de la cellule cancéreuse par les lymphocytes T CD8⁺ qui les éliminent.

Etape 4 bis : Les ARN-db peuvent également en parallèle générer des néo-antigènes qui sont présentés à la surface de la cellule tumorale et reconnus par les cellules T.

Note : Le TCR (T-cell receptor) présent à la surface des cellules T reconnaît les molécules de CMH présentant des peptides à la surface de la cellule cancéreuse permettant d'initier le processus d'activation des lymphocytes T.

Plus de la moitié des patients atteints de cancers sont traités par la radiothérapie (Barton et al. 2014). La production de cassure double brin par les radiations a toujours été considérée comme le processus par lequel la radiothérapie élimine les cellules tumorales (Vignard, Mirey, et Salles 2013). Des études mettent en évidence que la réponse immunitaire de l'hôte est aussi un élément important dans la réponse globale de la tumeur à la radiothérapie (Demaria et al. 2005; Burnette et al. 2011). En effet, les radiations conduisent à la génération d'ADN-db cytosoliques issus des dommages à l'ADN qui induisent l'activation de la voie cGAS-STING et entraîne le déclenchement de la signalisation IFN (T. Li et Chen 2018). La production d'IFN-I par les cellules tumorales irradiées active les cellules T qui permettent la réduction de la croissance tumorale. Récemment, Lee *et al.* rapportent que dans des lignées de cancers solides les radiations induisent la transcription d'ARN-db associés aux ERV et l'activation d'une réponse antivirale innée MDA5/MAVS/TBK1, aboutissant à la transcription des ISG (A. K. Lee et al. 2020). De plus, ils montrent que la perte de KAP1 améliore cette réponse antitumorale induite par les radiations dans deux modèles de souris, ayant reçu une injection de cellules de mélanome ou de cancer du sein (A. K. Lee et al. 2020). Ces données mettent en lumière que la manipulation de l'épigénétique, contrôlant l'expression des RE, et la voie de l'immunité innée, détectant les RE, pourraient être des stratégies prometteuses pour améliorer l'efficacité de la radiothérapie et de l'immunothérapie des cancers.

La chimiothérapie détruit les cellules cancéreuses en s'attaquant au matériel génétique des cellules qui prolifèrent très rapidement, ce qui empêche la croissance de la tumeur. Face à la réduction des cellules hématopoïétiques causée par la chimiothérapie, les CSH sont poussées à entrer en cycle cellulaire et à différencier afin de reconstituer le système hématopoïétique. En 2021, Clapes *et al.* mettent en évidence que le traitement par des agents chimiothérapeutiques tels que le 5-FU modifie l'accessibilité de la chromatine et favorise la transcription de RE (principalement des ERV et des LINE) dans les CSH murines (Clapes et al. 2021). En outre, ils montrent que les transcrits de ces RE induits par la chimiothérapie agissent comme des ligands de MDA5 et déclenchent une réponse inflammatoire en activant des cytokines pro-inflammatoires et des IFN-I, ce qui entraîne la sortie de quiescence des CSH et la régénération myéloïde (Clapes et al. 2021).

La grande force des thérapies épigénétiques repose sur le fait qu'à la différence des mutations génétiques, les modifications épigénétiques sont potentiellement réversibles. Brocks *et al.* rapportent que dans des lignées de cancers solides, la combinaison d'agents hypométhylants de l'ADN (HMA) et des inhibiteurs des HDAC

(HDACi) induisent la transcription *de novo* de RE à LTR, résultant des transcrits qui sont épissés à ceux issus de gènes codant pour des protéines et générant *in fine* de nombreux néo-transcrits et de néo-protéines, qui pourraient être ciblées par l'immunothérapie (Brocks et al. 2017). Les RE peuvent aussi être eux-mêmes une source directe de néo-antigènes [Figure 24]. En 2022, Bonaventura *et al.* développent une approche bioinformatique pour identifier les peptides issus des ERV et reconnus par les lymphocytes T CD8⁺. Ils mettent en évidence le caractère immunogène des peptides sélectionnés et également la cytotoxicité des clones de cellules T ciblant ces peptides (Bonaventura et al. 2022). La même année, Alcazer *et al.* révèlent l'existence de lymphocytes T CD8⁺ dirigés contre des néo-antigènes issus des ERV spécifiques de la LAM dans la moelle osseuse de patients au diagnostic (Alcazer et al. 2022). Ainsi les RE, constituant un réservoir d'épitopes, pourraient être exploités pour le développement de nouvelles immunothérapies. L'impact des traitements épigénétiques dans l'induction d'un état mimant une infection virale sera détaillé ultérieurement (à la page 130) car cet aspect constitue la seconde partie de mon projet de thèse.

Le système immunitaire contribue au succès des traitements déclenchant un état mimant une infection virale. Les cellules tumorales peuvent échapper aux lymphocytes T en détournant les points de contrôles immunitaires à leur avantage. Ces points de contrôles sont des récepteurs impliqués dans la modulation de l'activation des cellules de l'immunité. Ils ont pour rôle de stopper le système immunitaire une fois l'élimination de l'élément étranger afin d'empêcher que le système ne s'emballe. Ils sont également nécessaires pour éviter que le système immunitaire ne s'attaque à des cellules normales. Les cellules cancéreuses peuvent surexprimer à leur surface des ligands des récepteurs inhibiteurs afin d'éviter d'être éliminées par les lymphocytes T [Figure 25]. L'expression de ces ligands par les cellules tumorales peut être due à ses mutations ou bien par la production de cytokines inflammatoires par les cellules immunes (IFN- γ) (Pardoll 2012). Le blocage des points de contrôles immunitaires fait partie des lignes thérapeutiques pour lutter contre les cancers.

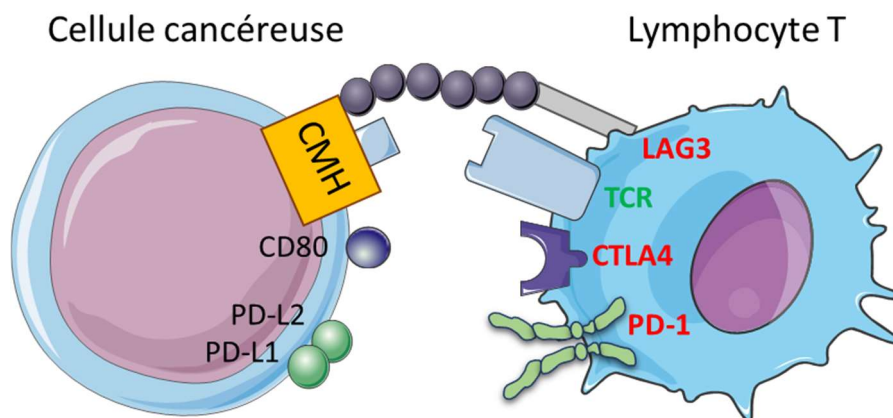


Figure 25. Principaux checkpoints immunitaires.

LAG-3 est un co-récepteur situées sur les cellules T et qui se lie aux molécules de CMH. Il régule négativement les signaux de transduction induit par le TCR. D'autres molécules empêchent également l'activation des lymphocytes T et qui sont présents sur les cellules cancéreuses tel que CD80 (*cluster of differentiation 80*) et PD-L1/PD-L2 (*programmed death-ligand 1 and 2*) qui interagissent respectivement avec le récepteur CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4 protein*) et PD-1 (*programmed cell death 1*) situées sur les lymphocytes.

L'ensemble de ces études met en évidence le rôle des RE dans la physiologie, l'oncogenèse et l'immunité. En particulier, elles mettent en lumière l'importance des mécanismes épigénétiques qui contrôlent l'expression des RE et comment elles peuvent être exploiter dans un contexte thérapeutique.

Introduction

Partie III. La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une maladie clonale de la CSH touchant le sujet âgé. Cette maladie du vieillissement dont l'âge moyen au diagnostic est de 72 ans touche deux fois plus les hommes que les femmes (Patnaik et Tefferi 2020). La LMMC est le plus fréquent des syndromes myélodysplasiques et des néoplasies myéloprolifératives (SMD/NMP). L'incidence exacte de la LMMC reste inconnue, mais il est estimé à 4 cas sur 100 000 personnes par an (Patnaik et Tefferi 2020).

1. Les critères de diagnostics de la LMMC

a. Les critères selon le groupe Franco-Américain-Britannique

Dans les années 80, le groupe Franco-Américain-Britannique (FAB) définit la LMMC par une monocytose sanguine supérieure à $1 \times 10^9/L$, un pourcentage de blastes sanguins inférieur à 5% et de blastes médullaires inférieur à 20%, l'absence de Corps d'Auer (bâtonnets azurophiles) dans les cellules très immatures et une dysplasie d'une ou plusieurs lignées hématopoïétiques. Longtemps classé dans les SMD, ce n'est qu'en 1994 que le groupe FAB distingue deux types de LMMC : les LMMC de type « dysplasique » (leucocytose inférieure à $13 \times 10^9/L$) et les LMMC de type « proliférative » (leucocytose supérieure ou égale à $13 \times 10^9/L$).

b. Les critères selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé

Les critères de diagnostic de la LMMC selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2016 sont décrits dans le tableau 4. Le premier critère de diagnostic de cette pathologie est la persistance d'une monocytose supérieure ou égale à $1 \times 10^9/L$ pendant plus de 3 mois avec des monocytes constituant plus de 10% de la numération leucocytaire. Dans la nouvelle version de la classification de l'OMS de 2022, le taux de monocytes est révisé à 0,5 G/L pour prendre en compte les LMMC dites « oligomonocytaires » (Calvo et al. 2020; Khoury et al. 2022). Ce seul critère ne suffit pas à diagnostiquer les patients atteints de LMMC puisque la monocytose peut être attribuée à un certain nombre de causes telles que des étiologies infectieuses (ex. la tuberculose), des maladies du tissu conjonctif, la régénération de la moelle osseuse après la chimiothérapie... (Patnaik et al. 2014). Il faut en plus réaliser des analyses

moléculaires des clones hématopoïétiques. Les patients atteints de LMMC ne doivent pas avoir de chromosome de Philadelphie, ni de fusion BCR-ABL1 pour les distinguer de la leucémie myéloïde chronique (LMC) (Ohtake 2002; Patnaik et Tefferi 2020). Des patients présentant un phénotype clinique LMMC associée à une hyperéosinophilie, sont exclus s'ils ont des réarrangements des gènes PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 ou une fusion PCM1-JAK2 et sont classés dans les néoplasmes myéloïdes ou lymphoïdes (Baer et al. 2018). Le pourcentage de blastes dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse doit être inférieure à 20% pour exclure les LAM. Enfin, la présence d'une dysplasie dans au moins une des lignées hématopoïétiques doit être établie. Les patients ne présentant pas ou faiblement une myélodysplasie, peuvent être diagnostiqués LMMC s'ils possèdent des anomalies moléculaires cytogénétiques ou génétiques clonales acquises (TET2, ASXL1, SRSF2 et SETBP1) dans les cellules hématopoïétiques (Patnaik et Tefferi 2020). Les mutations dans les gènes JAK2, MPL ou CALR permettent d'exclure les patients présentant une monocytose avec un NMP tel que la polyglobulie de Vasquez, la thrombopénie essentielle et la myélofibrose primaire (Arber et al. 2016).

1	Persistance d'une monocytose $\geq 1 \times 10^9/L$ dans le sang périphérique (> 3 mois), avec des monocytes constituant $\geq 10\%$ de la numération leucocytaire
2	Absence de chromosome de Philadelphie, de réarrangement BCR-ABL
3	Aucune preuve de réarrangements PDGFRA ou PDGFRB, et l'absence de réarrangements FGFR1 ou de fusion PCM1-JAK2 si concomitant à un contexte éosinophilie
4	<20% blastes dans la moelle osseuse et le sang périphérique
5	Dysplasie d'une ou plusieurs types cellulaires de la lignée myéloïde. Si la myélodysplasie est absente ou minimale, le diagnostic de la LMMC peut être fait si le critère 6 est présent.
6	Présence d'une anomalie moléculaire cytogénétique ou génétique clonale acquise (TET2, ASXL1, SRSF2 et SETBP1) dans les cellules hématopoïétiques

Tableau 4. Critères de diagnostic pour la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2016

En 2016, l'OMS identifie aussi des trois sous-types de LMMC, LMMC-0, LMMC-1, LMMC-2, fondée selon leur pourcentage de blastes dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse, qui impacte le pronostic (Loghavi et Khoury 2018) :

- LMMC-0 : blastes périphériques <2% et blastes médullaires <5% (médiane de survie : 35 mois)
- LMMC-1 : blastes périphériques entre 2-4% et blastes médullaires entre 5-9% (médiane de survie : 28 mois)
- LMMC-2 : blastes périphériques > 5% et blastes médullaires entre 10-19% (médiane de survie : 19 mois)

Dans la nouvelle version de la classification OMS de 2022 des hémopathies, le sous-type LMMC-0, n'apportant pas d'information supplémentaire, disparaît et fusionne avec le sous-type LMMC-1 (Khoury et al. 2022).

c. La répartition des sous-types de monocytes, un autre critère

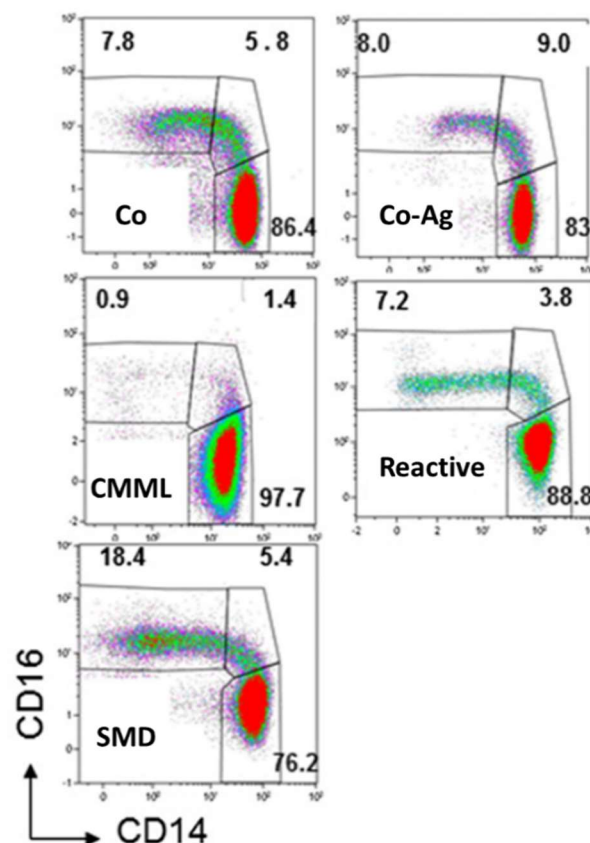


Figure 26. La répartition anormale des sous-populations monocytaires dans la LMMC.
(Tiré de Selimoglu-Buet et al. 2015)

La répartition des sous-populations de monocytes obtenues par cytométrie de flux avec les marqueurs CD14 et CD16 sont représentées dans les contrôles jeunes (Co), les contrôles âgés (Co-Ag), les patients atteints de LMMC, de monocytose réactionnelle et de SMD.

La répartition des sous-types de monocytes est aussi un critère de diagnostic de la LMMC (Selimoglu-Buet et al. 2015). Il existe trois sous-populations monocytaires du sang périphérique : les monocytes classiques MO1 (CD14⁺ CD16⁻), les monocytes intermédiaires MO2 (CD14⁺ CD16⁺) et les monocytes non classiques (CD14^{faible} CD16^{élevé}). Ils ont des rôles distincts : les MO1 dans l'inflammation et la phagocytose, les MO2 dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T, et les MO3 dans la surveillance des parois vasculaires (Grage-Griebenow et al. 2001; Zawada et al. 2011; Ziegler-Heitbrock et Hofer 2013; G. Thomas et al. 2015). Les patients LMMC ont une augmentation de la sous-population de monocytes classiques qui représentent plus 94% des monocytes contre 85 % chez des individus de même âge en bonne santé (Selimoglu-Buet et al. 2015) [Figure 26]. Cette technique présente l'avantage de distinguer efficacement les monocytozes associées à la LMMC et les monocytozes des patients avec un SMP, et d'identifier les patients SMD qui ont un taux de monocytes inférieure à $1 \times 10^9/L$ et qui peuvent développer la LMMC (Patnaik et al. 2017; Talati et al. 2017). Des faux négatifs avec cette technique peuvent être rencontrés chez les patients LMMC ayant une maladie auto-immune ou inflammatoire où la fraction des monocytes intermédiaires augmente, ce qui diminue faussement les monocytes classiques, ou dans d'autres maladies myéloïdes tel que la LMC (Talati et al. 2017; Pophali et al. 2019). Dans le cas d'une ambiguïté dans la répartition des sous-types monocytaires, l'identification d'une LMMC nécessite une diminution de la fraction de monocytes non classiques exprimant le marqueur SLAN qui doit être inférieure à 1.7% (Solary, Wagner-Ballon, et Selimoglu-Buet 2020). L'utilisation de marqueurs additionnels tel que CCR2, CD36... et le développement de la cytométrie de masse (CyTOF) sont des solutions prometteuses pour améliorer la sensibilité et la spécificité de cette méthodologie (G. D. Thomas et al. 2017; Solary, Wagner-Ballon, et Selimoglu-Buet 2020; Patnaik et Tefferi 2020).

2. Les anomalies moléculaires dans la LMMC

a. Les anomalies cytogénétiques (chromosomiques)

Dans la majorité cas (70-80%), le caryotype des cellules médullaires et sanguines des patients LMMC est normal. Chez les 20-30% de patients LMMC, les altérations

cytogénétiques clonales les plus fréquentes sont des anomalies du chromosome 7 (délétion 7q ou monosomie), la trisomie 8, la trisomie 21, la délétion du bras long du chromosome 20, la perte du chromosome Y, et un caryotype complexe (>3 anomalies) (Patnaik et Tefferi 2020). Le système de stratification des risques cytogénétiques des patients proposé par l'équipe espagnole Such *et al.*, en 2011, distingue trois groupes : fort risque (trisomie 8, anomalies du chromosome ou caryotypes complexes), risque intermédiaire (toutes les anomalies chromosomiques excepté ceux des groupes avec un fort ou faible risque), faible risque (caryotype normal ou perte de l'Y) (Such et al. 2011). En 2014, dans une étude franco-américaine (Mayo-French), 409 patients atteints de LMMC sont analysés pour des anomalies cytogénétiques et génétiques (Wassie et al. 2014). Cette étude présente aussi une stratification en trois groupes de risques présentant des similitudes à celle de Such.

b. Les anomalies génétiques (mutations)

Contrairement à d'autres tumeurs malignes solides, les cancers hématologiques dont la LMMC sont caractérisés par un nombre relativement faible de mutations. En effet, les patients atteints de la LMMC présentent en moyenne 10 à 15 mutations par kilobase de régions d'ADN codant (Merlevede et al. 2016). Ces anomalies génétiques affectent des gènes ayant rôle dans (1) l'épigénétique (*ASXL1*, *TET2*, *EZH2*, *UTX*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*), (2) l'épissage (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *PRPF8*), (3) signalisation cellulaire (*JAK2*, *KRAS*, *NRAS*, *CBL*, *PTN11* et *FLT3*), (4) les facteurs de transcription et l'assemblage des nucléosome (*SETBP1*, *RUNX1*) et (5) la réponse aux dommages à l'ADN (*TP53*, *PHF6*) qui sont moins fréquentes (Patnaik et Tefferi 2020). Parmi ces mutations, les plus courantes affectent les gènes *TET2* (60%), *SRSF2* (50%), *ASXL1* (40%) et les gènes de la signalisation *RAS* (25%). La fréquence des mutations somatiques dans les patients LMMC est montrée dans le tableau 5 (Patnaik et Tefferi 2020). Les mutations du gène *TP53* sont rares dans cette maladie.

Classe majeure des mutations	Gènes	Fréquence de la mutation
<i>Epigénétique</i>		
<i>Modifications d'histone</i>	<i>ASXL1</i>	40%
	<i>EZH2</i>	5%
<i>Méthylation de l'ADN</i>	<i>TET2</i>	60%
	<i>DNMT3A</i>	5%

	IDH1	1%
	IDH2	5-10%
<i>Signalisation cellulaire</i>	JAK2V617F	5-10%
	CBL	15%
	NRAS	15%
	KRAS	10%
	PTPN11	5%
	FLT3	<5%
<i>Epissage</i>	SRSF2	50%
	SF3B1	5-10%
	U2AF1	5-10%
	ZRSR2	5%
<i>Transcription et assemblage du nucléosome</i>	RUNX1	15%
	SETBP1	15%
<i>Dommmage à l'ADN</i>	TP53	1%
	PHF6	5%

Tableau 5. Fréquences relatives des mutations somatiques chez les patients atteint de LMMC. (Tiré de Patnaik et Tefferi 2020)

Ces anomalies génétiques ne sont pas spécifiques de la LMMC et sont aussi retrouvées dans d'autres hémopathies myéloïdes (Vainchenker et al. 2011; Bejar et al. 2011; Jaiswal et al. 2017; Deininger, Tyner, et Solary 2017). Certaines de ces mutations peuvent influencer le phénotype tel que des mutations *RAS* pour les formes prolifératives, *RUNX1* pour la thrombopénie, *KIT* pour la mastocytose mais elles ne peuvent pas à elles seules refléter l'hétérogénéité clinique de la maladie (Ball, List, et Padron 2016).

c. L'architecture du clone leucémique

Tout au long de la vie, les cellules somatiques acquièrent des mutations. Le séquençage complet du génome (*Whole Genome Sequencing, WGS*) des monocytes CD14⁺ de patients LMMC a permis de montrer que les mutations somatiques de la LMMC proviennent d'un processus mutationnel lié à l'âge (Alexandrov et al. 2015; Merlevede et al. 2016). En effet, deux signatures mutationnelles (1A/B et 5) qui sont communément associées au vieillissement sont détectés chez les patients LMMC (Merlevede et al. 2016). Dans la LMMC, la majorité des cellules CD34⁺CD38⁻ (75%) ont des mutations géniques témoignant de la dominance du clone leucémique sur les

cellules normales dès le compartiment des CSH. Dans ce compartiment, les analyses à l'échelle unicellulaire ont révélé la présence de sous-clones issus de l'accumulation progressive de mutations (Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013). Bien que l'ordre d'apparition des mutations soit stochastique, la première mutation a lieu le plus souvent dans un gène codant pour un régulateur épigénétique (*TET2* ou *ASXL1*, les plus fréquents) et la seconde mutation dans un gène codant pour des facteurs d'épissage (*SRSF2*) ou des régulateurs de signalisation. De plus, les mutations *TET2*, *IDH1* et *IDH2* semblent mutuellement exclusives tandis que certaines combinaisons de mutations sont fréquentes telles que *TET2* et *SRSF2* (Itzykson, Kosmider, Renneville, Gelsi-Boyer, et al. 2013). L'hypothèse d'une relation d'épistasie est proposée pour expliquer l'association fréquente entre des mutations *TET2* et *SRSF2* (Itzykson et Solary 2013). Dans les cellules hématopoïétiques normales, les mutations dans des gènes de l'épissage entraînent un défaut de prolifération *in vivo* (Yoshida et al. 2011). Les mutations *SRSF2* conféreraient un désavantage compétitif aux CSH mais elle présenterait un avantage dans un contexte *TET2* muté, ce qui pourrait expliquer l'ordre d'apparition de ces mutations (Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013). Récemment, Xu *et al.* dévoilent que la mutation *Srsf2*^{P95H/+} coopère avec la perte de *Tet2* afin d'initier le développement de la LMMC dans les modèles murins (J. J. Xu et al. 2022).

Des travaux sur des modèles murins et l'analyse *in vitro* de cellules primaires de patients ont permis de proposer un modèle de dominance clonale précoce pour expliquer le biais de différenciation vers la lignée granulo-monocytaire. Dans ce modèle, une expansion clonale précoce des clones muté *TET2* dans les progéniteurs immatures multipotents peut conduire à la fois à orienter la différenciation vers la lignée granulo-monocytaire et à une érythropoïèse inefficace (Itzykson, Kosmider, Renneville, Morabito, et al. 2013). Ce phénotype évoque celui des LMMC de type « dysplasique ». Des mutations additionnelles sont impliquées dans la progression de la maladie vers une forme plus sévère, chronique ou aiguë.

Un autre modèle peut expliquer le biais de différenciation vers la lignée granulo-monocytaire dans cette pathologie. Des expériences de clonogénicité et de cytométrie en flux montrent que les progéniteurs myéloïdes de la LMMC présentent une hypersensibilité au GM-CSF avec une augmentation de l'activité phospho-STAT5, amenant à une surproduction de cellules granulo-monocytaires (Birrer et al. 2008; Kotecha et al. 2008). Néanmoins, des études récentes soulignent que ce mécanisme n'est pas universel mais limité aux 35 à 50% des cas de LMMC ayant une forme

proliférative et présentant des mutations dans des voies de signalisation tel que *RAS* (Padron et al. 2013; Geissler et al. 2016; Itzykson et al. 2017)

Ces deux modèles moléculaire et fonctionnel co-existent probablement (Itzykson et al. 2017) [Figure 27].

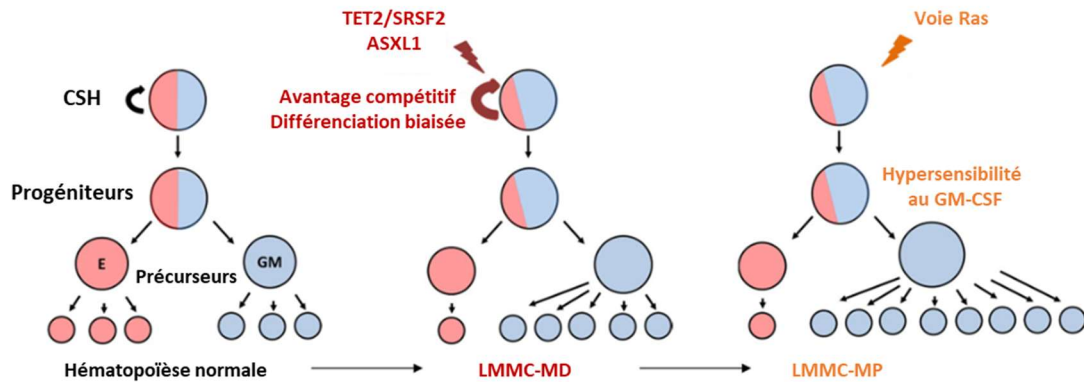


Figure 27. Modèles de pathogenèse de la LMMC. (Tiré de Itzykson et al. 2017)

LMMC-MD: LMMC de type « myélodysplasique », LMMC-MP : LMMC de type « myéloproliférative »

3. La modélisation de la LMMC

L'étude *in vitro* de la LMMC est limitée à l'utilisation de cellules primaires puisqu'il n'existe pas à ce jour de lignées cellulaires mimant la pathologie.

a. Des modèles murins transgéniques

De nombreux modèles murins récapitulant plus ou moins les caractéristiques des SMD/NMP ont pu être développés grâce à l'identification de mutations somatiques récurrentes dans ces pathologies et aux avancées dans les techniques de mutagenèse ciblée.

Bien que les mutations perte de fonction de *TET2* soient retrouvées dans la plupart des hémopathies myéloïdes, les souris *Tet2*^{-/-} développent principalement mais pas exclusivement, une pathologie myéloïde ayant des caractéristiques similaires à une LMMC de type « proliférative ». En effet, le plus souvent ces souris ont une hyperleucocytose, une thrombopénie, une anémie, une monocytose dans le sang périphérique et une splénomégalie. Cette perte de fonction de *TET2* permet de développer ce phénotype dès les premiers mois mais environ un tiers des souris

Tet2^{-/-} meurent au cours de la première année de leur vie (Moran-Crusio et al. 2011; Quivoron et al. 2011; Zhe Li et al. 2011a). La période de latence avant le développement de la maladie de type LMMC diffère selon les stratégies. Les modèles murins ciblant la région codant pour le domaine catalytique de la protéine (Quivoron et al. 2011; Moran-Crusio et al. 2011) semble avoir un temps de latence plus long (5-6 mois) que ceux visant le premier exon (2-4 mois) (Zhe Li et al. 2011a). Il est décrit également qu'au-delà des altérations des lignages érythroïde et myéloïde, des anomalies de la différenciation des cellules lymphoïdes T et B sont observés dans certaines souris *Tet2*^{-/-} (Quivoron et al. 2011).

Les souris mutées dans la voie RAS tel que *KRas*, *NRas*, *HRas* (Parikh, Subrahmanyam, et Ren 2007; Caraffini et al. 2020), *Flt3* (B. H. Lee et al. 2007), *Shp2* (Goodwin et al. 2014), *Cbl* (Lv et al. 2017) et *Nf1* (P. Zhang et al. 2018) développent des pathologies similaires aux LMMC de type prolifératif avec une hyperprolifération de la lignée myélomonocytaire, une hypersensibilité au GM-CSF et une splénomégalie.

Les souris *Asxl1*^{-/-} ont un phénotype plus proche des SMD incluant une dysplasie des neutrophiles et une cytopénie de multiples lignées (Abdel-Wahab et al. 2013).

Les souris *Srsf2*^{P95H/+} ne développent pas un SMD mais la transplantation de leurs CSH dans une souris létalement irradiée contribue au phénotype SMD incluant une anémie, une leucopénie et une dysplasie érythroïde (Kon et al. 2018). Ce résultat met en évidence la nécessité d'un stress additionnel à la mutation pour favoriser l'expression du phénotype.

Etonnamment, certains modèles murins ayant des mutations non identifiées dans la pathologie telles que *Arid4a*, *Arid4b* (M.-Y. Wu, Eldin, et Beaudet 2008), *Bid* (Zinkel et al. 2003), *Crebbp* (Zimmer et al. 2012), *Dido* (Fütterer et al. 2005), *Notch* (Klinakis et al. 2011), et *Xist* (Yildirim et al. 2013), développent un phénotype se rapprochant de la LMMC comprenant un versant dysplasique et un versant prolifératif.

Néanmoins ces modèles murins monogéniques ne permettent pas de récapituler toutes les caractéristiques génétiques et cliniques de la pathologie.

b. Des modèles de xénogreffes

Des modèles de xénogreffes de cellules de patients sur des souris immunodéficientes donnent le moyen d'analyser l'ensemble des mutations et des altérations épigénétiques dans les patients et de récapituler, au moins partiellement,

l'hétérogénéité clonale (Y. Zhang et al. 2017). Ces modèles ont permis la découverte des cellules souches cancéreuses et notamment les cellules souches leucémiques (CSL). A la fin des années 90, la greffe de cellules de patients LAM dans des souris immunodéficientes (NOD-SCID) a permis d'identifier une population cellulaire immatures (CD34⁺CD38⁻) capable d'induire une LAM dans ces souris (Lapidot, Fajerman, et Kollet 1997). Ces CSL ont des caractéristiques de CSH c'est-à-dire un potentiel d'auto-renouvellement et un ralentissement du cycle cellulaire, et sont aussi résistantes aux chimiothérapies (Rongvaux et al. 2014). En 2017, Yohsima *et al.*, et Zhang *et al.*, réalisent des greffes de cellules CD34⁺ de patients LMMC dans des souris NOD/SCID-Il2rgcnull exprimant des cytokines humaines GM-CSF, IL3 et SCF (NSG-SGM3, NSGS) avec un taux de reconstitution élevé pouvant atteindre jusqu'à plus de 80% de cellules humaines dans la moelle osseuse ou le foie (Yoshimi et al. 2017; Y. Zhang et al. 2017). Les cellules greffées sont capables de reproduire l'ensemble des caractéristiques génétiques, immunophénotypiques et morphologiques observées chez les patients dont elles sont issues. Ces modèles permettent également de récapituler l'hétérogénéité clonale et sous-clonale identifiée chez les patients. Bien que les transplantations primaires soient très efficaces, les greffes secondaires ont pu être possible pour un nombre limité de cas. Cette faible efficacité des transplantations secondaires est probablement la conséquence d'une expansion des progéniteurs hyper-sensibles au GM-CSF, amenant à l'épuisement des cellules souches. De plus, les souris expriment une forte concentration de GM-CSF humain non physiologique, pouvant créer un environnement inflammatoire et ainsi compromettre la régénération des cellules souches humaines (Nicolini et al. 2004; Anzai et al. 2017; Y. Zhang et al. 2017). Une autre limite de la surexpression de cytokines est qu'elle peut masquer l'efficacité de certains traitements tel que les traitements ciblant la voie GM-CSF/STAT5 ou même modifier de façon extrême l'hétérogénéité clonale.

Rongvaux *et al.* créent des souris MI(S)TRG exprimant des cytokines humaines à des taux plus physiologiques mais l'inconvénient de ce modèle est que les souris développent une anémie quelques semaines après la greffe (Rongvaux et al. 2014). De plus, elles ne sont plus commercialisées. Beke *et al.* génèrent un modèle *in vitro* de la LMMC via l'utilisation de la technologie des cellules souches pluripotentes induites ou iPSC (*induced pluripotent stem cells*) à partir des CD34⁺ (CSPH) de patients, qui a permis de récapituler une partie de l'hétérogénéité moléculaire et phénotypique de la pathologie (Beke et al. 2020). Il est possible de créer des modèles murins de la LMMC via la formation de tératomes en injectant des CSPHs de LMMC produites *in vivo* à partir d'iPSCs (Taoka et al. 2018). Ces modèles permettent d'identifier des molécules d'intérêt tel que des inhibiteurs de RAS, des inhibiteurs de MEK pour traiter la LMMC.

Néanmoins il est très difficile de reprogrammer des cellules progénitrices tumorales (Kotini et al. 2015; Kotini et al. 2017).

4. Les approches thérapeutiques

Le médecin face au diagnostic de la LMMC met en place bien souvent une surveillance vigilante sans traitement spécifique pour les patients asymptomatiques sans cytopénie majeure pour enrayer toute maladie intercurrente. Des soins de supports sont effectués pour contrôler les symptômes. Les patients thrombopéniques reçoivent des transfusions de plaquettes. Il est proposé aux patients anémiques des transfusions répétées avec chélation du fer ou bien des injections d'érythropoïétine. Des agents médicamenteux cytotoxiques tel que l'hydroxyurée, la cytarabine sont donnés aux patients ayant une forme proliférative (hyperleucocytose, splénomégalies).

Les patients à haut risque (forte prolifération ou dysplasie sévère) reçoivent des HMAs tel que l'AZA (Europe), la DAC (USA). L'entrée de ces deux médicaments dans la cellule se fait grâce à quatre transporteurs : hENT/SLC29A, hCNT/SLC28A SLC15/SL22 et ABC family. L'activation de ces molécules se fait par une série de phosphorylations pour donner le 5-AZA-dCTP, qui peut être incorporé dans l'ADN durant la phase répllicative (S) du cycle cellulaire. Cette étape de phosphorylation est limitante et effectuée par l'uridine-cytidine kinase (UCK) pour l'AZA et la deoxycytidine kinase (DCK) pour la DAC. A la différence du DAC qui donne 100% de forme 5-AZA-dCTP, l'AZA a deux formes actives, la forme majoritaire (80%) 5-AZA-CTP qui est incorporée dans l'ARN et la forme minoritaire (20%) 5-AZA-dCTP qui est produite à partir de la 5-AZA-CTP grâce à des ribonucléotides réductases avant son incorporation dans l'ADN (Stresemann et Lyko 2008). L'efficacité de ces agents épigénétiques est de 40% chez les patients mais elle est transitoire (Merlevede et al. 2016). Les effets biologiques de ces traitements chez les patients répondeurs sont une restauration de la balance hématopoïétique et aussi une correction de l'augmentation de la sous-population MO1 (Selimoglu-Buet et al. 2015; Merlevede et al. 2016). Bien que ces traitements ont un effet cytotoxique, ils ont principalement des effets épigénétiques (Braun et al. 2011; Tsai et al. 2012). En effet, ces traitements sont associés à des changements de la méthylation de l'ADN et de l'expression génique. Au sein des patients répondeurs, les HMAs ne réduisent pas la fréquence allélique du clone leucémique et n'empêchent pas l'apparition de nouvelles mutations. Le clone muté n'est pas éradiqué (Merlevede et al. 2016).

La LMMC provoque le décès dans un délai moyen de 31 mois du fait d'une transformation en LAM, des cytopénies, ou de comorbidités évolutives. Il existe un besoin non satisfait d'options thérapeutiques qui modifient l'évolution de la LMMC.

Un petite cohorte patients atteints de LMMC ont pu être traités avec de l'IFN- α 2b, qui réduit la monocytose sans empêcher les cytopénies (Catalano et al. 1989) ou bien de l'acide tout trans-rétinoïque, qui corrigent les cytopénies sans réduire la prolifération (Cambier et al. 1996).

Les aberrations moléculaires détectées dans la LMMC convergent vers la voie de signalisation GM-CSF (Padron et al. 2013). De plus, l'hypersensibilité au GM-CSF des progéniteurs de la LMMC est corrélée aux mutations de la voie de signalisation RAS. Des thérapies ciblées peuvent être envisagées pour contrôler la prolifération cellulaire tel que le lenzilumab qui neutralise la liaison du GM-CSF avec son récepteur (Mrinal M. Patnaik et al. 2020), le ruxolitinib qui inhibe les kinases JAK (Padron et al. 2017), le trametinib qui cible la kinase MEK (Borthakur et al. 2016), le lonafarnib et le tipifarnib qui inhibent la farnesyltransférase (Feldman et al. 2008; Asati, Mahapatra, et Bharti 2017).

La forte expression du récepteur de l'interleukine 3 (CD123) dans les cellules leucémiques mériterait d'être ciblé par exemple avec le SL-401 (Frolova et al. 2014; Patnaik et al. 2021).

A l'heure actuelle, la transplantation de CSH allogénique reste l'unique approche curative pour les patients atteints de LMMC (Patnaik et Tefferi 2022). Elle est réalisée uniquement chez des personnes âgées de moins de 65 ans avec un fort risque de LMMC sévère. Les rechutes après une greffe restent élevées entre 30-60% et le taux de survie à long-terme (5-10 ans) est de seulement 20-40% (Eissa et al. 2011; Park et al. 2013; Symeonidis et al. 2015; H. D. Liu et al. 2017; Gagelmann et al. 2021).

La découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc une nécessité.

Projets de thèse

Contexte scientifique

L'organisation des Nations Unies estime que d'ici 2050 le nombre d'individus âgés (65 ans et plus) doublera dans le monde, passant de 700 millions en 2020 à 1.5 milliards. Dans les années à venir les personnes âgées seront plus nombreuses que les adolescents et les jeunes adultes (15 à 24 ans). Cette hausse de l'espérance de vie n'est pas forcément synonyme d'une meilleure qualité de vie.

Le vieillissement altère notamment le fonctionnement du système hématopoïétique, entraînant des changements significatifs dans la composition et les fonctions des cellules du sang périphérique. Il diminue la réponse immune adaptative et accroît la production de cellules myéloïdes et la senescence des cellules stromales induisant une inflammation des tissus. Au niveau des CSH, le vieillissement provoque l'accumulation de dommages à l'ADN, réduit la capacité de repeuplement à long-terme et induit un biais de différenciation vers la lignée myéloïde. Les CSH transmettent les mutations acquises à leur descendance, qui sont dans la majorité des cas sans conséquences phénotypiques, générant une hématopoïèse clonale. La présence de mutations somatiques dans des gènes associés à des maladies hématologiques est fréquente chez les individus âgés et « sains ». Les scientifiques ne savent pas encore si l'hématopoïèse clonale est un accompagnement du vieillissement normal ou une maladie (Groarke et Young 2019). Elle est défini pour la plupart comme un état pré-leucémique ou un état qui favorise l'émergence d'autres maladies comme l'athérosclérose. Le vieillissement du tissu hématopoïétique et de son environnement favorise l'émergence d'hémopathies myéloïdes. La prévention de ces maladies nécessite l'identification des facteurs qui contribuent au vieillissement du tissu hématopoïétique et de stratégies susceptibles de contrer cet effet.

L'hétérochromatine est un état condensé de l'ADN caractérisé par les marques épigénétiques suivantes : la méthylation de l'ADN, les marques d'histones H3K9me3, H3K9me2 et H3K27me3. La réorganisation de l'hétérochromatine est un changement fréquemment signalé dans le vieillissement. Notamment, dans les CSH la perte du potentiel de différenciation des lymphocytes B avec l'âge est associée à une diminution globale de H3K9me3 (Djeghloul et al. 2016). En plus de son rôle dans la régulation de l'expression génique, l'hétérochromatine est impliquée dans la répression des RE. Représentant 40 à 50% du génome humain, les RE génèrent depuis peu un attrait grandissant pour leur importante contribution dans la régulation du transcriptome et

leur implication dans l'évolution de la régulation de la réponse immunitaire. Néanmoins, très peu d'articles évoquent leur expression et leur impact sur le transcriptome et la fonction des CSH. L'équipe a récemment montré que les CSH de souris expriment des niveaux élevés de RE (L1 et ERV) qui peuvent se mobiliser et altérer leur fonction de reconstitution dans le cadre d'un vieillissement prématuré induit par l'irradiation (Barbieri et al. 2018). Chez l'Homme, comme chez la souris la diminution globale de la marque H3K9me3 des CSH avec l'âge est associée à une expression accrue de nombreux RE (Djeghloul et al. 2016). **Ces résultats suggèrent qu'une dérégulation des mécanismes contrôlant l'expression des RE dans les CSH pourrait participer à leur changement fonctionnel.**

Dans la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), malgré l'identification d'une quarantaine de gènes mutés de façon récurrente, aucun n'est spécifique de cette maladie. Certaines mutations participent au phénotype hématologique de la LMMC. Par exemple la présence de mutations dans le gène *RUNX1* est souvent associée à un caractère thrombopénique de la maladie. Les mutations dans le gène *NRAS* confèrent un fort risque aux patients de transformer en LAM (M. W. N. Deininger, Tyner, et Solary 2017). Néanmoins le génotype des patients ne peut à lui-seul rendre compte de l'hétérogénéité clinique de la maladie, influencé par d'autres paramètres. Des altérations épigénétiques pourraient expliquer la variabilité phénotypique et fonctionnelle de cette pathologie. Bien que la LMMC soit une maladie du vieillissement, il n'existe pas d'études de l'hétérochromatine dans cette pathologie

Même si les RE jouent un rôle dans le développement des tumeurs en induisant une instabilité génomique et des altérations du transcriptome, ils sont également leur talon d'Achille. En effet, la réactivation massive des RE (par exemple induite par les HMA), conduit à la production d'IFN-I et une réponse immune anti-tumorale (Roulois et al. 2015; Chiappinelli et al. 2015). Le gain de marques d'hétérochromatine au niveau des RE peut bloquer cette action (M. Liu et al. 2018).

Bien que les HMA soient efficaces chez 40% des patients, on ne connaît pas les mécanismes moléculaires déclenchés par ces traitements dans la LMMC. Même si certaines caractéristiques génétiques sont corrélées à la réponse (*TET2* muté, *ASXL1* sauvage) ou à l'échec des HMA (*ASXL1* muté), elles ne suffisent pas à prédire la réponse à ces traitements chez tous les patients (Guerra et al. 2020). Par ailleurs, bien que ces molécules restaurent une hématopoïèse équilibrée chez certains patients grâce à leur effet épigénétique, elles ne parviennent pas à réduire la charge allélique des mutations, à empêcher l'évolution génétique du clone et la transformation en LAM (Merlevede

et al. 2016). Le clone muté est toujours présent. **Ces résultats mettent évidence l'importance des altérations épigénétiques dans l'expression clinico-biologique de la maladie et la nécessité d'identifier d'autres stratégies thérapeutiques pour éliminer le clone muté.**

Lorsque j'ai débuté ce travail, une étude suggérait le rôle de l'immunité dans la réponse aux HMA. Cependant cette étude avait été réalisée sur une petite cohorte non homogène de patients atteints de SMD et de LMMC (Unnikrishnan et al. 2017). Il n'existait pas d'étude sur le rôle potentiel des RE dans la réponse thérapeutique aux HMA dans une cohorte homogène de patients LMMC au diagnostic.

Au cours de ma thèse j'ai :

- Participé à une étude analysant les mécanismes moléculaires impliqués dans la dérégulation des sous-familles des éléments L1 de la souris lors d'un stress dû à l'irradiation (mimant un vieillissement prématuré) dans les CSH et leur effet de leur dérégulation sur le transcriptome et la fonction des CSH (publiée en seconde auteure : Pelinski et al. 2022)
- Étudié l'état de l'hétérochromatine dans les CSH de patients LMMC et les effets d'une combinaison d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et des histones sur la réponse immunitaire et l'éradication du clone leucémique (article en préparation).

Partie 1 : Article publié

The NF- κ B pathway regulates heterochromatin at intronic young LINE-1 elements and hematopoietic stem cell gene expression during irradiation stress

Yanis Pelinski¹, Donia Hidaoui¹, Anne Stolz¹, François Hermetet¹, Rabie Chelbi¹, M'boyba Khadija Diop², Amir M. Chioukh¹, and Françoise Porteu¹ and Emilie Elvira-Matelot¹

(1) INSERM U1287, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France

(2) Bioinformatics Platform UMS AMMICA INSERM US23/CNRS 3655, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France

Résumé de l'article

La radiothérapie utilisée dans un contexte médical permet de détruire des cellules cancéreuses par des rayonnements en les empêchant de se diviser. Un des problèmes majeurs de ce type de thérapie est qu'elle ne cible pas uniquement les cellules cancéreuses mais aussi les cellules environnantes. Le système hématopoïétique est extrêmement sensible au stress dû à l'irradiation. Un des exemples le prouvant est celui des bombes atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki. 50 ans après l'exposition à l'irradiation, les survivants de ces bombes présentent encore des altérations hématopoïétiques. Cette observation sous-entend que les CSH sont les principales cibles de l'irradiation. La capacité des CSH à garder en mémoire l'effet de l'irradiation sur le long terme suggère la contribution de l'épigénétique dans ce phénomène.

En 2018, l'équipe a rapporté que l'irradiation induit une augmentation de l'expression des jeunes éléments LINE-1 (Barbieri et al. 2018). Néanmoins les mécanismes moléculaires responsables de la dérégulation de ces éléments L1 induite par l'irradiation et leur impact sur le transcriptome restent à étudier. Dans cet article auquel j'ai participé et sur lequel je suis seconde auteure, nous révélons pour la première fois que l'irradiation altère directement l'épigénétique des CSH, en causant une diminution importante à l'échelle génomique d'une marque répressive de l'hétérochromatine H3K9me3, révélant ainsi pourquoi les effets des radiations sur l'hématopoïèse sont

observés de nombreuses années après l'irradiation. Nous mettons également en évidence qu'une partie des altérations transcriptomiques observées dans les CSH lors de l'irradiation, notamment la perte de la signature CSH, n'est étonnamment pas due à des changements de H3K9me3 au niveau des promoteurs de gènes, mais est plutôt associée à la dérégulation d'un ensemble particulier de RE LINE-1 récents introniques abritant des sites de liaison NF- κ B. Le traitement par le TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire, restaure la fonction des CSH après l'irradiation en évitant la perte de l'expression du répresseur NFKB1 (P50/P50) et ainsi la dérégulation spécifique des éléments L1 abritant des sites de liaisons NF- κ B dans les introns des gènes de CSH. Notre étude suggère une nouvelle voie TNF- α /NF- κ B/LINE-1 impliquée dans le contrôle des gènes des CSH en cas de stress dû à l'irradiation. Ils corroborent les liens causaux entre les RE et les gènes immunitaires, ainsi que leur coévolution.

Au final, nos données apportent de nouvelles informations essentielles sur les réponses au stress des CSH. L'exploration des mécanismes contrôlant les réseaux de régulation des RE et comment les signaux inflammatoires les influencent peut également avoir des implications cliniques.

ARTICLE

NF- κ B signaling controls H3K9me3 levels at intronic LINE-1 and hematopoietic stem cell genes in cis

Yanis Pelinski^{1,2}, Donia Hidaoui^{1,2*}, Anne Stolz^{1,2*}, François Hermetet^{1,2}, Rabie Chelbi^{1,2}, M'boyba Khadija Diop^{2,3}, Amir M. Chioukh^{1,2}, Françoise Porteu^{1,2**}, and Emilie Elvira-Matelot^{1,2**}

Ionizing radiations (IR) alter hematopoietic stem cell (HSC) function on the long term, but the mechanisms underlying these effects are still poorly understood. We recently showed that IR induces the derepression of LIMd, the mouse young subfamilies of LINE-1/L1 retroelements. L1 contributes to gene regulatory networks. However, how LIMd are derepressed and impact HSC gene expression are not known. Here, we show that IR triggers genome-wide H3K9me3 decrease that occurs mainly at LIMd. Loss of H3K9me3 at intronic LIMd harboring NF- κ B binding sites motifs but not at promoters is associated with the repression of HSC-specific genes. This is correlated with reduced NFKB1 repressor expression. TNF- α treatment rescued all these effects and prevented IR-induced HSC loss of function in vivo. This TNF- α /NF- κ B/H3K9me3/LIMd axis might be important to maintain HSCs while allowing expression of immune genes during myeloid regeneration or damage-induced bone marrow ablation.

Introduction

Exposure to ionizing radiations (IR), in the context of medical use such as radiotherapies, is an independent risk factor for many disorders characteristic of an accelerated aging. The hematopoietic tissue is particularly sensitive to IR. We and others have shown that total body irradiation (TBI) in mice leads to long-term defects in hematopoiesis due to loss of hematopoietic stem cell (HSC) reserves and functions (Fleenor et al., 2015; de Laval et al., 2013; Mohrin et al., 2010). In HSCs, IR induces DNA damage accumulation, loss of self-renewal, and a biased differentiation toward the myeloid lineage leading to increased myeloid cell counts and decline of the adaptive immune response. These changes are likely contributing to many IR-induced premature aging disorders and to the high risk of developing myeloid leukemia. Understanding the molecular mechanisms leading to HSC loss of function upon IR is necessary to modulate its adverse effects. It may also help identifying the first events leading to hematologic malignancies.

IR induces DNA double strand breaks (DSBs). DNA damage is thought to be one of the main driving forces of aging. However, delaying the effects of age in mice by decreasing the levels of DNA damage has never been achieved, and a direct link between DSB formation and physiological aging is still lacking (White and Vijn, 2016). Although IR has been shown to induce chromosomal abnormalities in progenitors (de Laval et al., 2013; de Laval et al.,

2014; Mohrin et al., 2010), in fact HSCs are quite resilient toward accumulating DNA mutations in response to DNA damage (Moehrl et al., 2015).

In addition to DSBs, IR has been shown to induce changes in chromatin state, mainly at the level of DNA methylation, in different tissues and cell lines (Miousse et al., 2017b). Epigenetic alterations have been observed in aged HSCs in the absence of mutations in epigenetic factors (Djegloul et al., 2016; Sun et al., 2014). Reorganization of heterochromatin is among the most commonly reported changes in aging and senescence, supporting its essential role in maintaining proper cellular function (Tsurumi and Li, 2012). Maintenance of HSC identity is dependent on the heterochromatin mark H3K9me3 (Koide et al., 2016). Decreased H3K9me3 in HSCs due to loss of *Suv39h2* and/or *Suv39h1* methyltransferases occurs with age and is associated with the loss of B cell differentiation (Djegloul et al., 2016) and hematopoietic changes archetypal of aging (Keenan et al., 2020). However, whether the long-term effects of IR on HSCs are linked to IR-induced changes in heterochromatin remains to be addressed.

Heterochromatin plays also a major role in the maintenance of the genome stability by repressing transposable elements (TEs), including DNA transposons and retro-TEs (RTEs), further

¹INSERM UMR1287, Gustave Roussy, Villejuif, France; ²Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France; ³Bioinformatics Platform UMS AMMICA INSERM US23/CNRS 3655, Gustave Roussy, Villejuif, France.

*D. Hidaoui and A. Stolz contributed equally as second author; **F. Porteu and E. Elvira-Matelot contributed equally as last author and are co-corresponding authors. Correspondence to Emilie Elvira-Matelot: emilie.elvira-matelot@inserm.fr; Françoise Porteu: francoise.porteu@gustaveroussy.fr.

© 2022 Pelinski et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

classified as LTR sequences that characterize endogenous retroviruses (ERVs), and non-LTR elements such as long or short interspersed elements (LINE-1/L1; SINE). Propagation of RTEs in the genome has been recognized as a great source of genomic instability. Even without propagating, RTEs have also been recently recognized as major contributors of gene regulatory networks (Chuong et al., 2017). Indeed, they qualitatively and quantitatively control gene expression, providing alternative enhancers, promoters, splicing, or polyadenylation signals, and also serving as cis-regulatory elements in a cell-specific fashion. Basal L1 expression in early mouse embryo is necessary for its proper development (Jachowicz et al., 2017). RTEs are involved in T cell differentiation by regulating genes involved in immune processes (Adoue et al., 2019). Abnormal RTE expression has been observed in cancers, including acute myeloid leukemia (AML), and may be involved in the pathogenesis through the alteration of host gene expression (Chuong et al., 2017) and the expression of oncogenes (Deniz et al., 2020; Jang et al., 2019).

We recently showed that evolutionary recent mouse L1s (L1Md) are highly expressed in HSCs and that their expression is further increased and maintained at high levels up to 1 mo after TBI (Barbieri et al., 2018). TE expression is also increased in HSCs after chemotherapies (Clapes et al., 2021) and the decreased H3K9me3 in aged HSCs is associated with increased L1Md expression (Djeghloul et al., 2016). However, the impact of L1Md derepression on the HSC transcriptome remains to be addressed. In addition, the mechanisms and signaling pathways by which IR specifically triggers L1Md expression in HSCs are currently unknown. We and others previously showed that the NF- κ B signaling pathway is required to prevent IR-induced HSC injury (Hu et al., 2021; de Laval et al., 2014). In addition, TNF- α -induced NF- κ B supports HSC survival during inflammation and chemotherapeutic stress induced by 5-fluorouracil (Yamashita and Passegué, 2019). On the other hand, basal activation of NF- κ B is required for HSC homeostasis and self-renewal potential and the expression of key HSC maintenance genes are severely impaired in mice deficient for NF- κ B pathway factors (Fang et al., 2018; Hu et al., 2021; Stein and Baldwin, 2013). We show here that IR induces a major loss of H3K9me3 in HSCs, which mainly affects L1Md subfamilies, and more specifically intronic L1Md displaying NF- κ B binding sites. By controlling the levels of H3K9me3 at selected intronic L1Md located in genes belonging to the HSC signature, this pathway plays a crucial role to preserve HSC-specific gene expression and HSC function during IR stress.

Results

H3K9me3 is mainly enriched at recent L1Md subfamilies in HSCs

To assess the effect of IR on H3K9me3 in HSCs and more particularly at TE sequences, we performed H3K9me3 chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) experiments in HSCs (Lin⁻Sca⁺-Kit⁺-CD34⁻Flk2⁻) sorted from mice 1 mo after TBI (2 Gy) or not, as previously described (Barbieri et al., 2018;

Fig. 1, A and B). Deep characterization of H3K9me3 enrichment in HSCs, notably at TE sequences, has never been performed. We thus first characterized H3K9me3 genomic coverage in HSCs at steady state.

Analysis of genomic repeats is still a bioinformatics challenge. The assignment of reads complementary to sequences that are repeated in the genome and that present low sequence variation is largely compromised. These multiple mapping reads are often discarded in ChIP-seq studies. However, when using only unique mapping reads, one can induce a bias of representation of the TE subfamilies toward the oldest ones as the youngest subfamilies, such as L1Md, present a very low mappability due to quasi-identical copies (Teissandier et al., 2019). Therefore, while young families of TEs are the most epigenetically regulated in the genome (Barau et al., 2016; Pezic et al., 2014), they are severely underestimated in unique read analysis.

To maximize the output information on these sequences, we considered all reads that mapped to the genome without mismatches and randomly assigned them at one of their best possible positions in the genome (Fig. 1 A). We combined both unique and multiple mapping reads analyses (U-MRA and M-MRA, respectively) to finally get a compromise between precise assignment of the unique reads and global information at youngest TE subfamily level.

Quality control of the resulting reads indicated high genomic coverage in both U- and M-MRA and in non-irradiated (NIR) and IR conditions (Table S1). Peak calling followed by reproducibility measurement between replicates (irreproducible discovery rate [IDR]) identified 456 peaks on average in the NIR conditions in the U-MRA. As expected, with 7,769 peaks, M-MRA gave a substantial increased number of peaks (Fig. 1 C and Table S1). Our peak calling retrieved the SUV39h-1- and -2-dependent H3K9me3 peaks that were previously described at young TEs such as intracisternal A particle (IAP) ERVs (Fig. S1 A) using this strategy in mouse embryonic stem cells (mESCs; Bulut-Karslioglu et al., 2014). Of note, these elements were not covered by U-MRA.

After annotation of the peaks using annotateR, both U-MRA and M-MRA showed that the majority of the H3K9me3-enriched peaks occur at TEs (41.9 and 52%, respectively; Fig. 1 D). Interestingly, M-MRA shows a gain in LINE representation, with 32.7% of the total H3K9me3 enriched peaks vs. 16.5% in U-MRA. By contrast, M-MRA shows reduced SINE and DNA representation while LTR representation was not affected. This suggests that H3K9me3 enrichment occurs mainly at LINES in HSCs. Heatmap representation of the average concentration (i.e., H3K9me3 enrichment normalized to input) of H3K9me3 at peaks retrieved from M-MRA, followed by RTE genomic coverage, further confirmed that peaks enriched in H3K9me3 at basal are mostly covering LINES compared to LTR, SINEs, or DNA, and more especially the young subfamilies of LINES (L1Md) compared to older ones (Lx5; Fig. 1 E).

Altogether, these data demonstrate that H3K9me3 is mainly enriched at repetitive sequences, and more particularly at young L1Md elements in HSCs.

Pelinski et al.

Cis-regulation of HSC genes by intronic LINE-1

Journal of Experimental Medicine
<https://doi.org/10.1084/jem.20211356>

2 of 22

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/219/8/e20211356/1435569/jem_20211356.pdf by INSEERM user on 30 August 2022

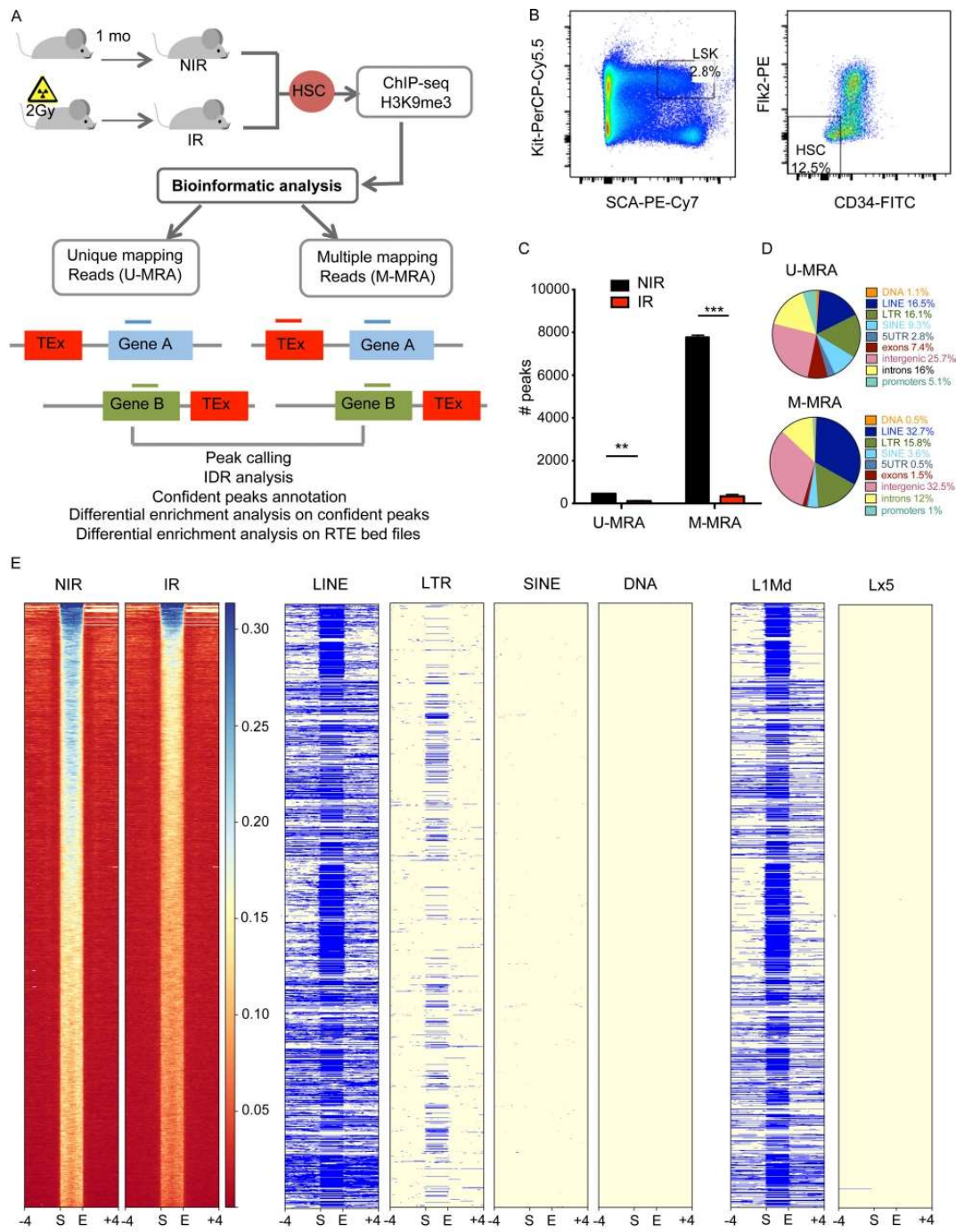


Figure 1. **H3K9me3 is mainly enriched at recent L1Md subfamilies in HSCs.** (A) Experimental and bioinformatic analysis design for H3K9me3 ChIP-seq. Mice were subjected to 2 Gy total body irradiation (IR) or left untreated (NIR). Analysis was done on both U- and M-MRA. (B) Gating strategy for HSCs (LSK CD34⁺Flk2⁻) sorting. (C) Number of peaks with IDR score <0.05 in U- and M-MRA and in NIR and IR conditions. ***, P < 0.001; **, P < 0.01, t test. (D) Repartition of confident peak annotations in each genomic feature using annotateR in NIR conditions for U- and M-MRA. (E) Left columns: Heatmap of

H3K9me3 enrichment at M-MRA confident peaks in NIR and IR conditions. Each row represents one-scaled H3K9me3 peak with ± 4 kb flanking regions. The color scale represents H3K9me3 enrichment over the input (H3K9me3 concentration) with the red corresponding to lower enrichment, and the blue to stronger enrichment. Center and right columns: Genomic coverage of the H3K9me3 peaks showed in the heatmap at different TE families and subfamilies (LINE, LTR, SINE, DNA, L1Md, Lx5) are also represented. Blue, TE is present; yellow, TE is absent in the peak (row).

Irradiation induces a loss of H3K9me3 that mainly affects the recent L1Md subfamilies

We next investigated changes in H3K9me3 that occur upon IR. We first compared the number of H3K9me3 peaks identified in IR vs. NIR conditions. Only 115 peaks in average were found in IR in the U-MRA, compared to 456 peaks in NIR condition, and 283 compared to 7,769 in the M-MRA (Fig. 1 C). Heatmap representation further showed a loss of H3K9me3 enrichment at peaks retrieved from M-MRA upon IR (Fig. 1 E).

Differential H3K9me3 enrichment analysis performed at H3K9me3 peaks identified in both IR and NIR conditions further revealed a strong decrease in H3K9me3 enrichment in IR (Fig. 2 A). We found 13 and 253 peaks showing significant ($P < 0.05$) differential H3K9me3 enrichment upon IR in U- and M-MRA, respectively. All of them in U-MRA and 252/253 peaks in M-MRA showed decreased H3K9me3 upon IR (Fig. 2 A). These data reveal a major loss of H3K9me3 genomic coverage upon IR, regarding both the number of peaks and the concentration of H3K9me3 at conserved peaks.

We performed the same analysis at TE genomic loci instead of peaks and found 2,559 loci with significant H3K9me3 differential enrichment, 1,667 and 892 loci showing decreased or increased H3K9me3, respectively, upon IR (Fig. 2 B). Annotation of these loci showed that they are enriched in LINEs (66.7%) and LTR (29.23%) compared to the distribution of these TEs in the mouse genome (24.71 and 22.07%, respectively; Fig. 2 C). The distribution of the H3K9me3 concentration showed a significant ($P < 0.0001$) decreased in H3K9me3 at both LINEs and LTR upon IR (Fig. 2 D). Comparing the distribution of the \log_2 fold change between IR and NIR conditions in H3K9me3 concentration showed that this decrease is significantly ($P < 0.0001$) more pronounced at LINEs than at LTRs (Fig. 2 E).

Since young TE subfamilies, notably L1Md, were previously reported to be the most epigenetically regulated in the genome compared to old LINEs in ESCs and testis (Barau et al., 2016; Pezic et al., 2014), we further dissected H3K9me3 enrichment at TEs depending on their age, as calculated in Sookdeo et al. (2013). We observed a significant negative correlation between the age of the LINE and H3K9me3 enrichment, with the youngest, typically L1Md_A and L1Md_Tf, showing the highest enrichment (Fig. 2 F), as previously observed for DNA methylation (Miousse et al., 2017a). IR induced a significantly ($P < 0.0001$) more pronounced loss of H3K9me3 at young L1Md compared to other LINEs (Fig. 2 G).

Altogether these data reveal that 1 mo after IR, HSCs display a major loss of H3K9me3, which mainly occurs at L1Md, the subfamilies of TEs the most enriched in H3K9me3 at steady state. This prompted us to further focus our analysis on L1Md.

Plot profile of H3K9me3 enrichment along L1Md sequences showed asymmetric distribution of H3K9me3 along the L1 body, with the highest enrichment and the highest loss upon IR at the

5' end of these elements (Fig. 2 H and Fig. S1 B). Finally, we confirmed the global decrease of H3K9me3 at L1Md, and more particularly at L1Md_A, using ChIP-quantitative PCR (qPCR) experiments with primers recognizing either all L1Md or specifically L1Md_A promoter (Fig. 2 I), as described previously (Barbieri et al., 2018).

Irradiation induces a strong deregulation of the HSC transcriptome

In order to unravel the consequences of IR-induced H3K9me3 loss on the HSC transcriptome, we performed RNA-seq of HSCs 1 mo after TBI. Comparison of IR vs. NIR revealed 1,067 differentially expressed genes (DEGs; $P < 0.05$), with 602 (56.4%) genes downregulated and 465 (43.6%) genes upregulated upon IR (Fig. 3, A and B; and Table S2). Differences in gene expression are very strong, as almost 80% of the DEGs between IR and NIR present a fold change above 10 and more than 50% present a fold change above 50 (Fig. 3 B). Gene set enrichment analysis (GSEA) on Hallmark gene sets indicated significant enrichments in DNA repair, G2/M checkpoint, and oxidative phosphorylation pathways, as expected upon IR (Fig. 3 C), whereas the main pathways lost in IR are related to cell signaling (Fig. 3 D). Among these, the most significant decrease concerns genes regulated by NF- κ B in response to TNF- α (Fig. 3, D and E). A recent report showed that TNF- α induces a specific prosurvival gene signature in HSCs (Yamashita and Passequé, 2019). Interrogating this gene signature, composed of 62 genes representing both core regulators of the NF- κ B pathway and TNF- α -induced HSC-specific survival genes, we observed its significant loss upon IR (Fig. 3 F). IR also induced the loss of the different HSC TNF- α signatures taken individually: the two in vitro signatures obtained 3 and 12 h after TNF- α treatment and the in vivo signature obtained 3 h after TNF- α treatment in mice (Fig. S2 A). By contrast, IR had no effect on the granulocyte/monocyte progenitor (GMP) TNF- α gene signature (Fig. 3 G; Yamashita and Passequé, 2019).

Given the importance of the NF- κ B pathway at maintaining HSC survival and self-renewal or during chemotherapeutic and IR stress (Hu et al., 2021; de Laval et al., 2014; Yamashita and Passequé, 2019), we next interrogated different published HSC signatures that are enriched in low-output/self-renewing and functional long-term regeneration HSCs compared to differentiating HSCs, or in dormant vs. activated HSCs (Cabezas-Wallscheid et al., 2017; Chambers et al., 2007; Pietras et al., 2015; Rodriguez-Fraticelli et al., 2020). We found a significant loss of all these signatures upon IR (Fig. 3 H and Fig. S2 B). Likewise, the megakaryocyte (MK)-biased output HSC signature (Rodriguez-Fraticelli et al., 2020), representing platelet-primed HSCs that were also previously described to be at the apex of the HSC hierarchy (Sanjuan-Pla et al., 2013), was also enriched in NIR vs. IR HSCs (Fig. S2 B). Conversely, the high-output and multilineage signatures (Rodriguez-Fraticelli et al., 2020),

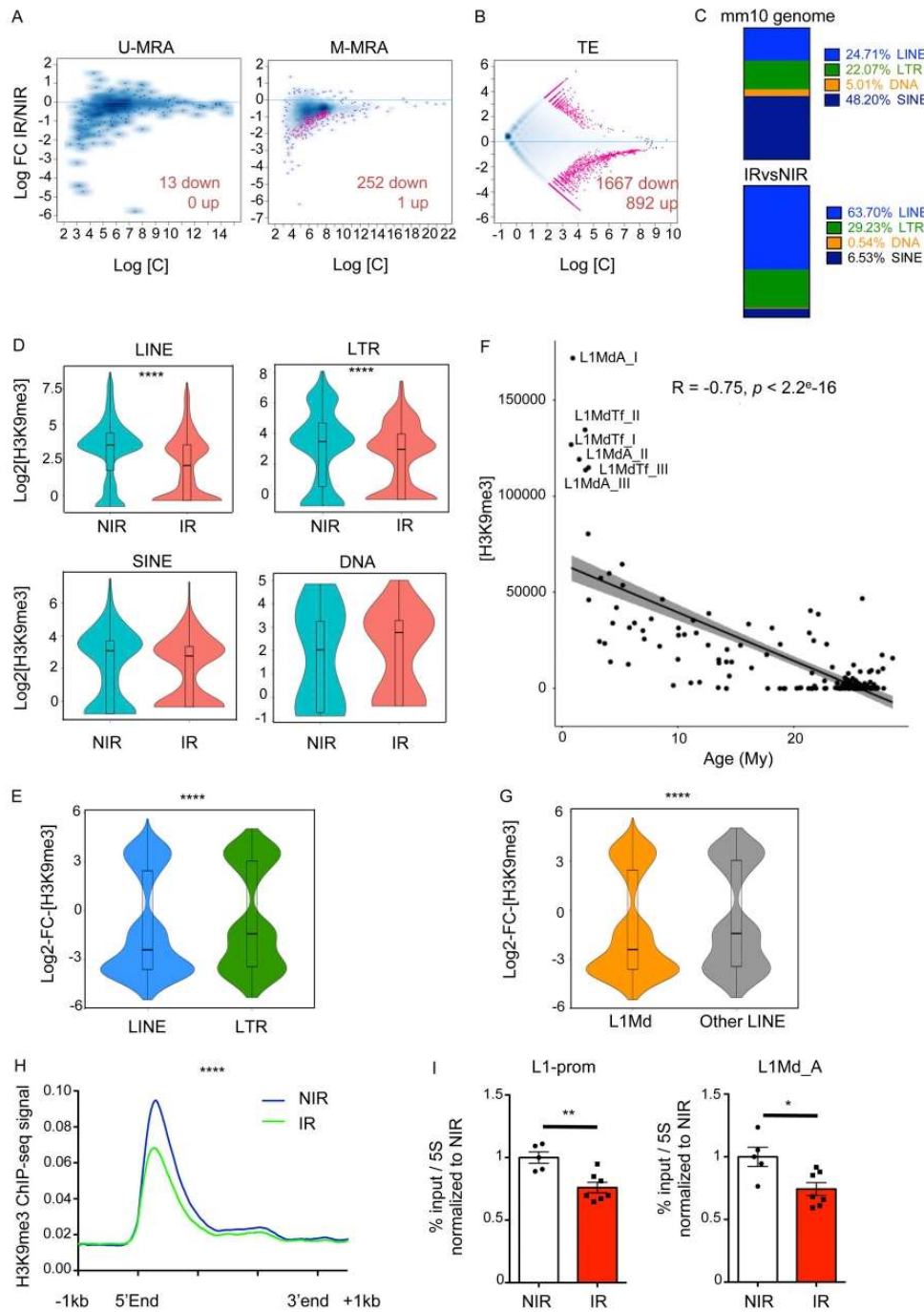


Figure 2. **Irradiation induces a loss of H3K9me3 that mainly affects the recent L1Md subfamilies. (A and B)** MA-plots showing nonsignificant (blue dots) and significant ($P < 0.05$, pink dots) differential H3K9me3 enrichment at confident peaks between NIR and IR conditions analyzed both in U and M-MRA (A) and TE loci (B). The number of peaks showing a significant decreased (down) or increased (up) in H3K9me3 enrichment upon IR is indicated in the plot. **(C)** Distribution of the percent of each family of TE among the total TE loci in the mouse mm10 genome (up) and among the significantly differentially enriched TE (bottom) retrieved in B. **(D)** Violin plot representing the distribution of H3K9me3 concentration at each locus retrieved in B for LINE, LTR, SINE, and DNA families of TEs in NIR and IR conditions. **(E)** Violin plot representing the distribution of the log₂ fold change (FC) in H3K9me3 concentration at each locus

retrieved in B for LINE and LTR. **(F)** Correlation plot representing H3K9me3 concentration quantified at all LINE elements in M-MRA vs. their age in million years (My). R, Pearson correlation coefficient. **(G)** Violin plot representing the distribution of the log₂ fold change in H3K9me3 concentration at each locus retrieved in B for L1Md or other LINE. **(H)** Plot profile of H3K9me3 enrichment along the L1Md sequences (>5 kb) ± 1 kb flanking regions in IR (green) vs. NIR (blue) conditions. Wilcoxon test. **(I)** H3K9me3 enrichment at L1Md promoters analyzed by ChIP-qPCR normalized to H3K9me3 enrichment at repetitive 5S rRNA. n = 3 independent experiments. Each dot represents pools of three (NIR) or four (IR) mice. Results are expressed as fold change from the mean value of the NIR condition and represented as means ± SEM. t test. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.0001.

which mark differentiating HSCs, showed a significant enrichment upon IR (Fig. S2 C). Altogether, these data show that IR induces a loss of transcriptional signatures involved in HSC quiescence, long-term potency, and self-renewal capacity, and a gain in gene signatures involved in HSC differentiation, thus recapitulating the HSC loss of self-renewal previously reported upon IR (de Laval et al., 2013).

IR-induced downregulation of gene expression is associated with the presence of L1Md in their introns

In order to check if gene deregulation upon IR might be associated with H3K9me3 enrichment changes at gene promoters, we quantified H3K9me3 enrichment over promoter regions (−2 kb; +1 kb around transcription start site [TSS]; U-MRA). We found 239 promoter sequences showing a significant (P < 0.05) H3K9me3 differential enrichment upon IR, 211 and 28 showing decreased and increased H3K9me3, respectively (Fig. S2 D). However, these variations are not correlated with gene upregulation, and only very poorly correlated with gene downregulation (Fig. 4 A and Fig. S2 E).

Since the loss of H3K9me3 upon IR mainly occurs at L1Md, we sought to determine if L1Md derepression might be involved in the gene deregulation observed after IR. Most of the information concerning H3K9me3 enrichment at young RTE such as L1Md is obtained through M-MRA. However, reads from the M-MRA are arbitrary assigned and cannot be precisely localized. Thus, it is impossible to determine if L1Md derepression is associated with gene deregulation by crossing our ChIP-seq and RNA-seq data. To overcome this issue, we crossed the list of the 1,067 DEGs (P < 0.05) in IR vs. NIR from our RNA-seq data with the list of genes hosting one or several L1Md (reconstructed repeatMasker database; Fig. 4 B and Table S3). The vast majority of these L1Md are located in introns (99%; Fig. S2 F). We found that 377 DEGs in IR host one or several L1Md, in majority located in introns. This is significantly (P < 0.0001) more than one would expect by chance, as revealed by a permutation test using 10,000 lists of 1,067 genes randomly extracted from the refseq database (Fig. 4, B and C). These results reveal a strong and significant association between gene deregulation upon IR and the presence of an intronic L1Md in these genes. This is specific for L1Md as no significant association was observed between DEGs and the presence of Lx5, an older LINE subfamily (Fig. 4 D). Surprisingly, this association is specific for genes that are downregulated upon IR (Fig. 4 E) and was not found for upregulated genes (Fig. 4 F and Table S3).

Interestingly, 50% of the genes from long-term (LT)-HSC signatures (Chambers et al., 2007; Pietras et al., 2015) whose expression is significantly decreased upon IR (Fig. 4, G and H) contain one or several L1Md in their introns. Similarly, we found

that 31 and 41% of the genes from the low-output and MK-biased signatures (Rodriguez-Fraticelli et al., 2020) host one or several L1Md (Fig. S2, G and H). Altogether, these data highlight a significant association between genes whose expression is repressed upon IR, notably those belonging to the HSC signature, and the presence of intronic L1Md.

Gene repression upon IR is associated with loss of H3K9me3 at selected intronic L1Md loci harboring NF-κB binding sites

We next investigated if the loss of H3K9me3 induced by IR at intronic L1Md in a given gene could be associated with its decreased expression in cis. For this purpose, we chose six candidate genes whose expression is significantly reduced by IR in our RNA-seq data: *Mecom*, *Pkia*, *Ttc8*, *Rbms3*, *Rmdn2*, and *Akt3* (Table S2), five of them (*Mecom*, *Pkia*, *Ttc8*, *Rbms3*, *Rmdn2*) being part of the different HSC signatures, as well as four negative controls, also harboring at least one intronic L1Md but whose expression remains unchanged upon IR (0.7 < fold change < 1.3, P > 0.05): *Snx27*, *Mapre2*, *Celf2*, and *Pdcdllg2*. 1 mo after TBI, a significant downregulation of *Mecom*, *Pkia*, and *Rmdn2*, but not of *Snx27*, *Mapre2*, *Celf2*, was observed (Fig. 5, A and C). To assess H3K9me3 enrichment specifically at intronic L1Md of these genes, we performed H3K9me3 ChIP-qPCR experiments using primer pairs located both in the intron and in the 5' end of the L1Md, thus allowing unique and specific amplicon production (Fig. 5, A and B). Apart for *Rmdn2*, we chose the longest L1Md (>5 kb), displaying higher enrichment at the 5' end (Fig. 2 H), to detect significant basal H3K9me3. We first confirmed that H3K9me3 is indeed present at intronic L1Md, as compared to *Spil* and 5S negative controls (Fig. S3, A and B). Of note, H3K9me3 levels at tested L1Md are similar to those found globally at L1Md_A promoters (Fig. S3 B). IR induced a significant decrease in H3K9me3 specifically at all the chosen candidate intronic L1Md of genes downregulated upon IR (Fig. 5 D and Fig. S3 C). Of note, we randomly chose four negative candidates that fit our criteria, and for the four candidates selected, no loss of H3K9me3 was detected. This indicates that IR-induced H3K9me3 loss at intronic L1Md is not a general event but rather that it seems to occur only in specific genes whose expression is reduced upon IR. This suggests that the presence of the H3K9me3 mark at this location may play a role in the regulation of gene expression in cis upon IR.

In order to test this hypothesis, we chose to delete specifically the intronic L1Md of *Mecom* through CRISPR/Cas9 and guide RNAs targeting each side of the L1Md (5'gRNA and 3'gRNA; Fig. 5 E) and tested *Mecom* expression upon IR. We electroporated LSK cells with the Cas9/guide RNA (gRNA) ribonucleoprotein particles (RNP) complex (Gundry et al., 2016) together with a siglo green electroporation indicator and we sorted

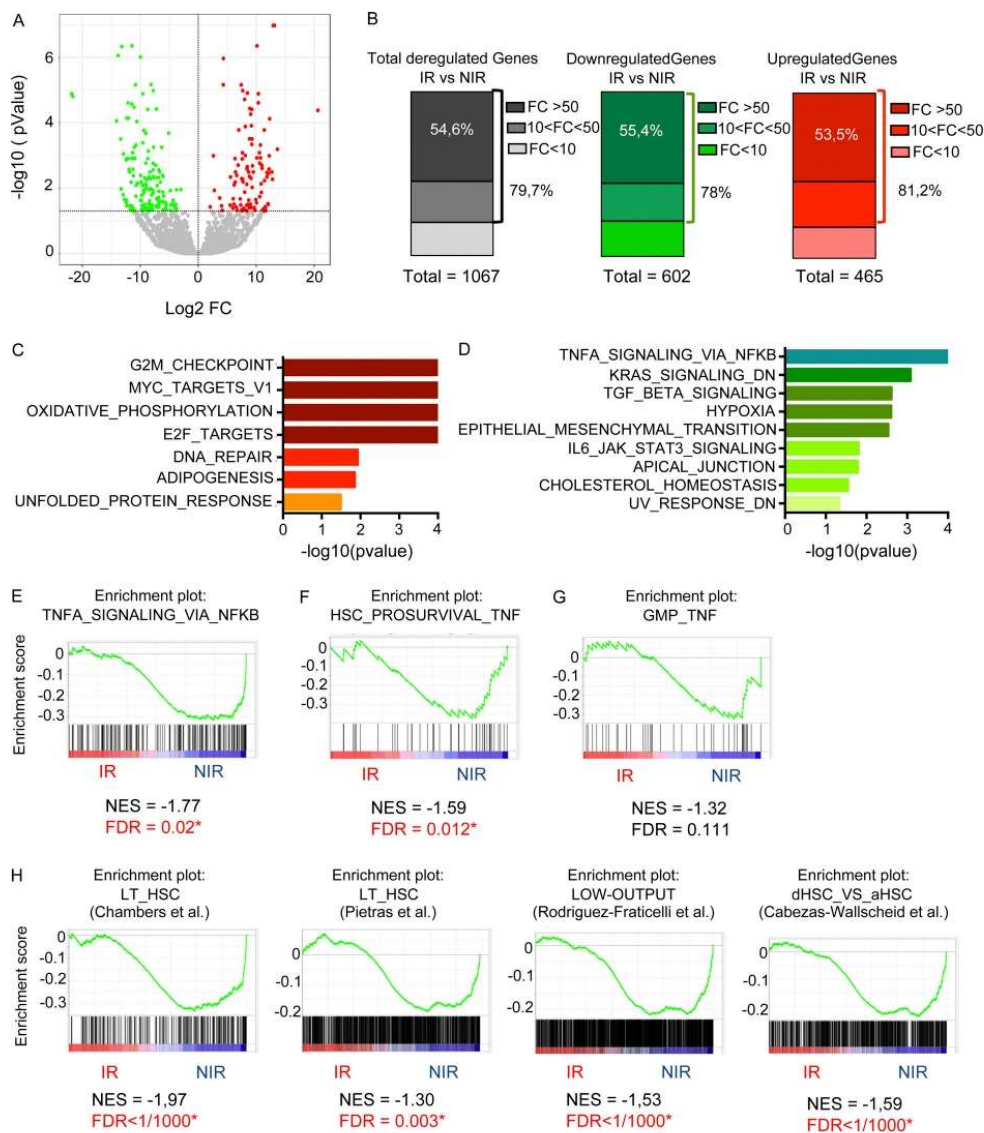


Figure 3. Irradiation induces a strong deregulation of the HSC transcriptome. (A) Volcano plot of the DEGs between IR and NIR conditions. The horizontal axis represents the \log_2 fold change (FC) and the vertical axis the $-\log_{10}(P \text{ value})$. Significantly ($P < 0.05$) upregulated (red) and downregulated (green) genes are shown. **(B)** Repartition of total ($P < 0.05$) DEG (gray) and downregulated (green) or upregulated (red) genes in IR vs. NIR according to their fold change. **(C–H)** GSEA analysis using Hallmark gene sets. Significant ($P < 0.05$) gene sets gained (C) or lost (D) in the IR condition compared to NIR. $\log_{10}(P \text{ value})$ is set to 4 when $P < 0.001$. Enrichment plots for TNF- α signaling via NF- κ B hallmark (E), HSC prosurvival TNF- α (F), and GMP TNF- α (G) gene signatures. **(H)** Enrichment plots for LT-HSC; low-output and dormant vs. activated HSC signatures. FDR, false discover rate; NES, normalized enrichment score.

electroporated (FITC+) HSCs for analysis (Fig. 5 F and Fig. S3 D). We first tested different combinations of 5' and 3' gRNAs (Table S4). Only one of these combinations was efficient in deleting the LIMd (Fig. S3 E). Using this combination, we then validated that LIMd deletion occurred in *Mecom*, but not in *Pkia*, through qRT-PCR using the ChIP-qPCR primers (Fig. S3 F). We also validated

that in mock electroporated cells IR could induce the specific downregulation of *Mecom* and *Pkia* but not of *Snx27* expression in vitro, as observed in vivo (Fig. 5 G). Deletion of its intronic LIMd leads to a reduction in *Mecom* gene expression, without affecting *Pkia* or *Snx27* expression, suggesting that the presence of the LIMd is important for the proper regulation of *Mecom*

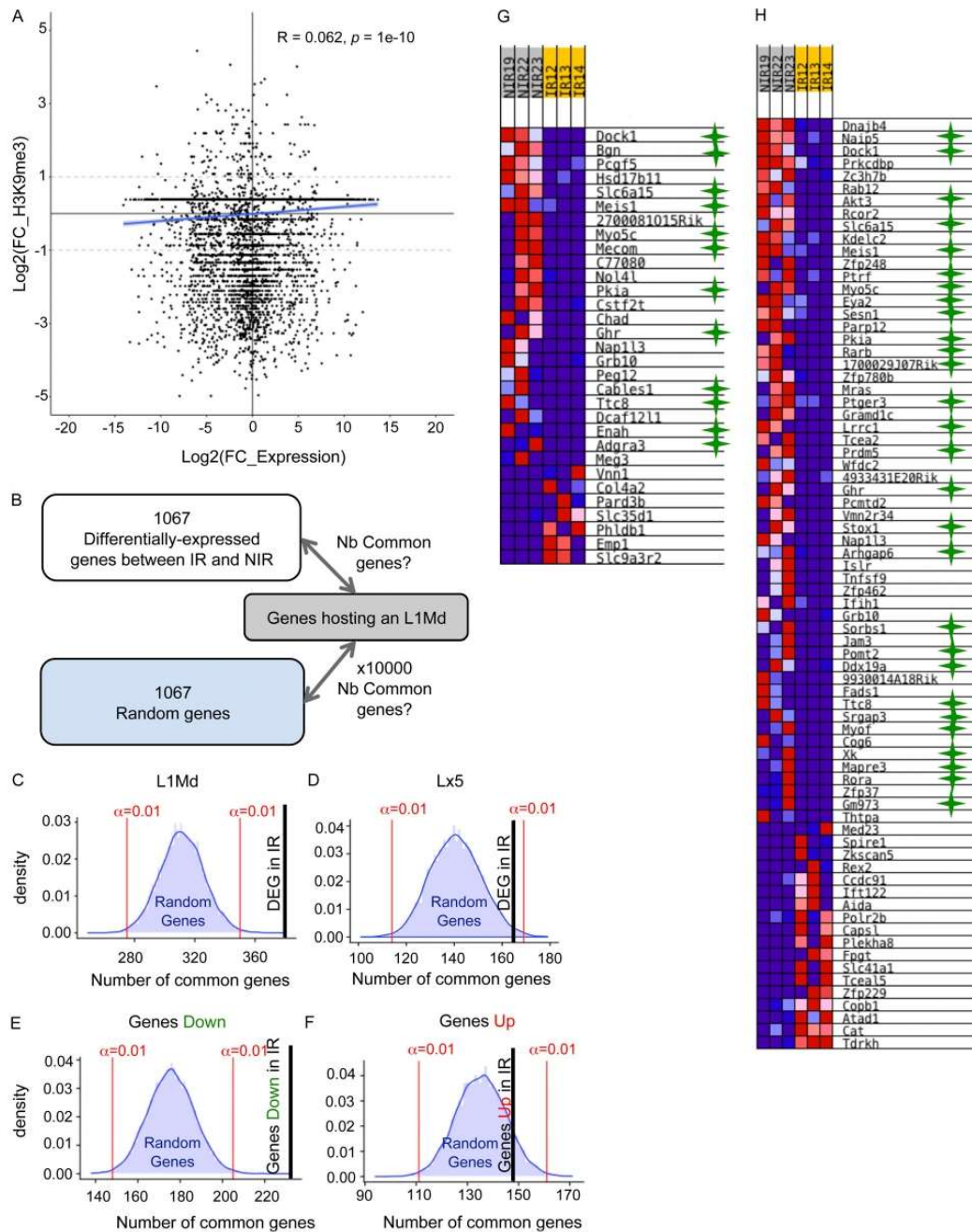


Figure 4. **Gene repression upon IR is associated with intronic L1Md.** (A) Correlation plot representing the \log_2 (fold change [FC]) in H3K9me3 concentration at gene promoters vs. \log_2 (fold change) in gene expression. (B–F) Permutation test comparing of the number of genes found in common between the list of DEGs or 10,000 lists of random genes and the list of genes hosting one or several L1Md. Blue curve: Distribution of the number of genes found in common between random genes and genes hosting an L1. Black vertical line: number of genes found in common between DEGs and genes hosting an L1Md (C) or an Lx5 (D); or between genes downregulated (E) or upregulated (F) upon IR and hosting an L1Md. Significance bars ($P < 0.01$) are shown in red. (G and H) Heatmaps of the expression of genes from two LT-HSC signatures that are significantly up- (red) or down- (blue) regulated in IR vs. NIR. Green stars indicate the presence of an intronic L1Md in the downregulated gene.

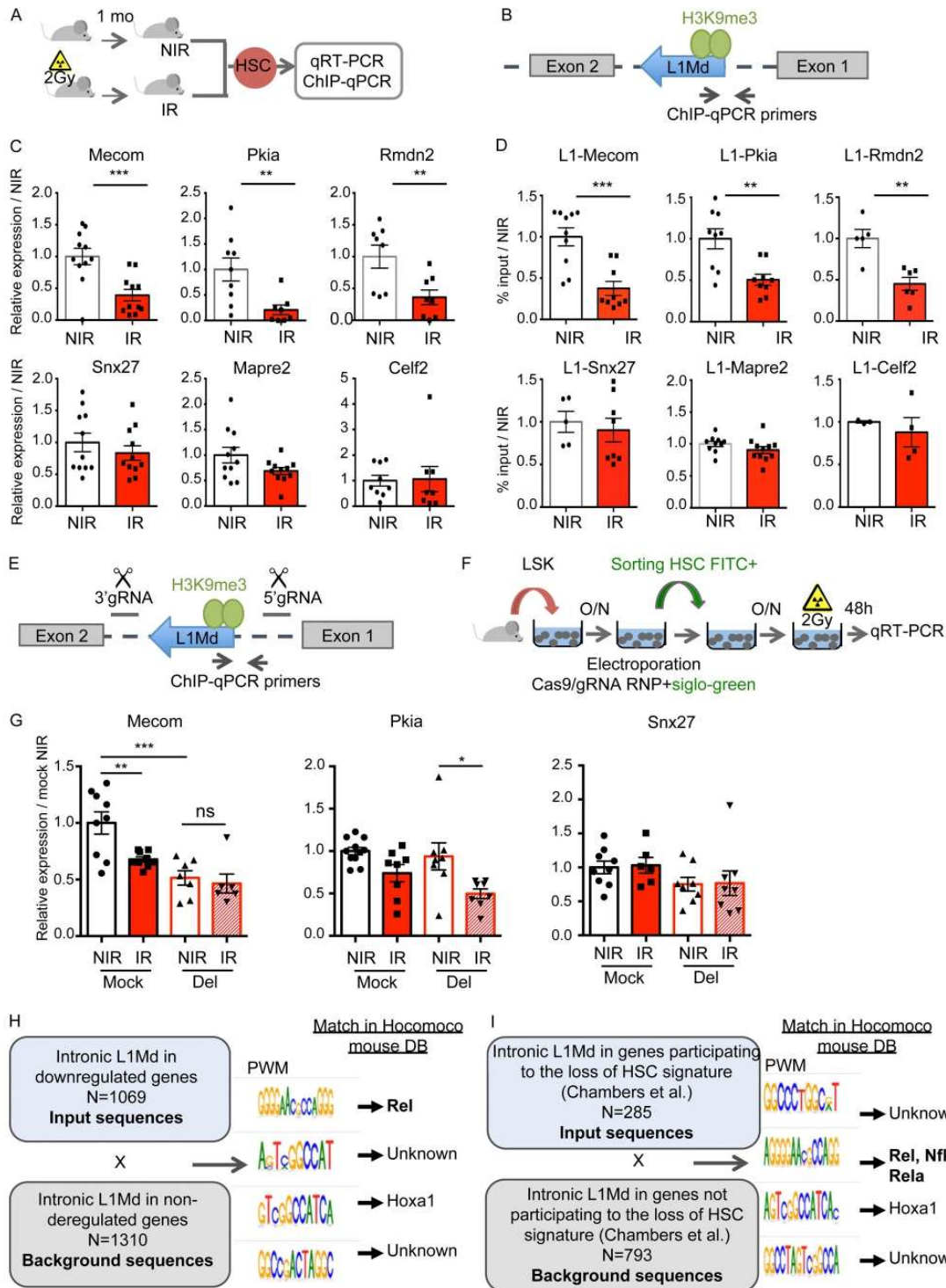


Figure 5. Gene repression upon IR is associated with the loss of H3K9me3 at intronic L1Md loci harboring NF-κB binding sites. (A and C) Experimental design and mRNA expression assessed by qRT-PCR in HSCs 1 mo after TBI. Ct values were normalized to RPL32 and HPRT. Results are expressed as fold change

from the mean value of the NIR condition. Each dot represents a pool of three (NIR) or four (IR) mice. Means \pm SEM from three to four independent experiments. **(B and D)** Experimental design and H3K9me3 ChIP-qPCR enrichment 1 mo after TBI. The primer positioning at the intronic LIMd allowing the amplification of a unique and specific product is shown (B). Each dot represents a pool of three (NIR) or four (IR) mice from two to four independent experiments. Results are means \pm SEM of the percentage of input normalized to the NIR condition. **(E-G)** CRISPR/Cas9-induced deletion intronic LIMd in *Mecom* gene. gRNA positioning around LIMd sequence (E), experimental design (F), and mRNA expression assessed by qRT-PCR in Cas9-gRNA RNP electroporated HSCs 48 h after irradiation in vitro (G). Ct values were normalized to Rpl32. mRNA expression was normalized to mock NIR values. Each dot represents a pool of electroporated HSCs from three to five independent experiments. One-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test. **(H and I)** De novo motif discovery analysis performed with the BAMMmotif tool on LIMd sequences located in introns of downregulated genes vs. nonregulated genes (H) or the genes participating vs. not participating to the loss of the LT-HSC signature (I). Enriched motifs were matched to known motifs using the Hocomoco mouse database. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

expression. While *Pkia* expression remained significantly reduced upon IR after *Mecom* intronic LIMd deletion, *Mecom* expression was not affected anymore. This suggests that *Mecom* intronic LIMd acts in cis, and is responsible for the specific gene downregulation upon IR (Fig. 5 G).

To unravel what makes the specificity of H3K9me3 loss at LIMd upon IR, we interrogated the potential enrichment for binding motifs for transcription factors in the LIMd located in genes downregulated in IR ($P < 0.05$, 1069 LIMd = input sequences) vs. nonregulated genes ($P > 0.05$, $0.7 < \text{fold change} < 1.3$, 1310 LIMd = background sequences) through de novo motif search using BAMMmotif (<https://bammotif.soedinglab.org/>; Kiesel et al., 2018). Of the four motifs found significantly enriched in LIMd located in downregulated genes, two were not retrieved in the mouse Hocomoco motif database, one motif corresponds to the binding site of Hoxa1, and one to the binding site of Rel, a member of the NF- κ B transcription factor family (Fig. 5 H). De novo motif search in the LIMd located in downregulated genes vs. upregulated genes also retrieved Rel motif (Fig. S3 G). Furthermore, de novo search for motifs specifically enriched in LIMd located in genes participating (284 LIMd) vs. genes not participating (793 LIMd) to the loss of the HSC signature (Fig. 3 H) also revealed significant enrichment for NF- κ B transcription factors Rel, RelA, and Nfkb1 (Fig. 5 I). Similar results were found for the low-output/self-renewing LT-HSC signatures (Fig. S3, H and I). Of note, this motif is present in the intronic LIMd of IR-regulated genes *Mecom*, *Pkia*, *Ttc8*, *Rbms3*, *Akt3*, and *Rmdn2* which lose H3K9me3 upon IR (Fig. 5 D, Fig. S2 C, and Table S3), supporting the possibility that it may regulate the presence of H3K9me3 at these loci.

Performing de novo search on promoter sequences of genes downregulated by IR ($P < 0.05$, 3,893 promoter sequences) vs. nonregulated genes ($0.7 < \text{fold change} < 1.3$, $P > 0.05$, 14,208 promoter sequences from which we randomly extracted 3,893 sequences) did not show specific enrichment in motifs for NF- κ B members. Instead, motifs for different transcription factors such as *Egr*, *Znf*, *Foxj*, and *Foxq* were found (Fig. S3 J).

Altogether, these data suggest that the NF- κ B pathway may control HSC gene expression by regulating the presence of H3K9me3 mark at LIMd located in introns, and not by affecting promoters.

TNF- α treatment prevents loss of H3H9me3 at intronic LIMd and HSC gene repression during IR stress

In mammals, the NF- κ B family is composed of five members: RELA (p65), RELB, c-REL, and the precursor proteins NFKB1

(p105) and NFKB2 (p100), which are processed into their active forms, p50 and p52, respectively, and are active as homo- or heterodimers (Cartwright et al., 2016). The canonical NF- κ B pathway involves p50, p65, and c-Rel. P50 lacks transactivation domain. Thus, while p50/p65 or c-Rel heterodimers act as transcriptional activators, p50/p50 (NFKB1) homodimers are generally described as transcriptional repressors. NFKB1 notably represses the expression of proinflammatory genes through the recruitment of chromatin modifiers and H3K9 methylation (Ea et al., 2012; Elsharkawy et al., 2010). In addition, p50 has been shown to shuttle between the nucleus and cytoplasm and to bind to a large number of genes in unstimulated cells (Schreiber et al., 2006). This makes of this factor a good candidate to regulate H3K9me3 levels at LIMd presenting NF- κ B sites and IR-induced HSC gene expression changes. Supporting this possibility, HSCs sorted from mice 1 mo after TBI showed a significant decrease in both NFKB1 mRNA, as well as protein expression tested with two different antibodies (Fig. 6, A-C; and Fig. S4 A). Processing of p105 to p50 is regulated both independently of the NF- κ B activation pathway and during activation of the canonical pathway induced by proinflammatory cytokines such as TNF- α (Cartwright et al., 2016). As shown above, IR induces a loss of the TNFA_signaling_Via_NFKB signature (Fig. 3, D and E). Thus, we asked whether TNF- α stimulation could prevent IR effects by rescuing the levels of p50 homodimers. NFKB1 protein expression decreased after 48 h of culture of purified HSCs that have been irradiated in vitro (Fig. 6, D and E; and Fig. S4 B). Addition of TNF- α to the cell medium prior to IR prevented this effect. As after TBI, the loss of NFKB1 induced by IR in vitro was associated with a specific decrease of *Mecom*, *Pkia*, and *Ttc8* but not of *Celf2*, *Snx27*, and *Mapre2* mRNAs (Fig. 6 F and Fig. S4 C). Importantly, H3K9me3 ChIP-qPCR at intronic LIMd of the selected genes correlated with gene expression with a significant and specific reduction at *Mecom* and *Pkia* intronic LIMd but not at *Snx27* and *Celf2* (Fig. 6 G). This shows that IR-induced H3K9me3 loss at intronic LIMd and gene expression changes in HSCs are direct and short-term and that TNF- α stimulation can rescue both effects. Supporting a role of NFKB1 in these effects, *Nfkb1*^{-/-} HSCs showed reduced expression of *Mecom* and *Pkia* but not of *Snx27* mRNA when compared to WT HSCs (Fig. 6 H). In addition, TNF- α was unable to rescue HSC gene expression or H3K9me3 levels at their intronic LIMd in *Nfkb1*^{-/-} HSCs (Fig. 6, I and J).

We then investigated if TNF- α stimulation could prevent IR effects in vivo. WT mice received two injections with 2 μ g TNF- α at 12-h intervals and were irradiated 1 h after the last injection. We then performed H3K9me3 CUT&Tag and RNA-seq in HSCs

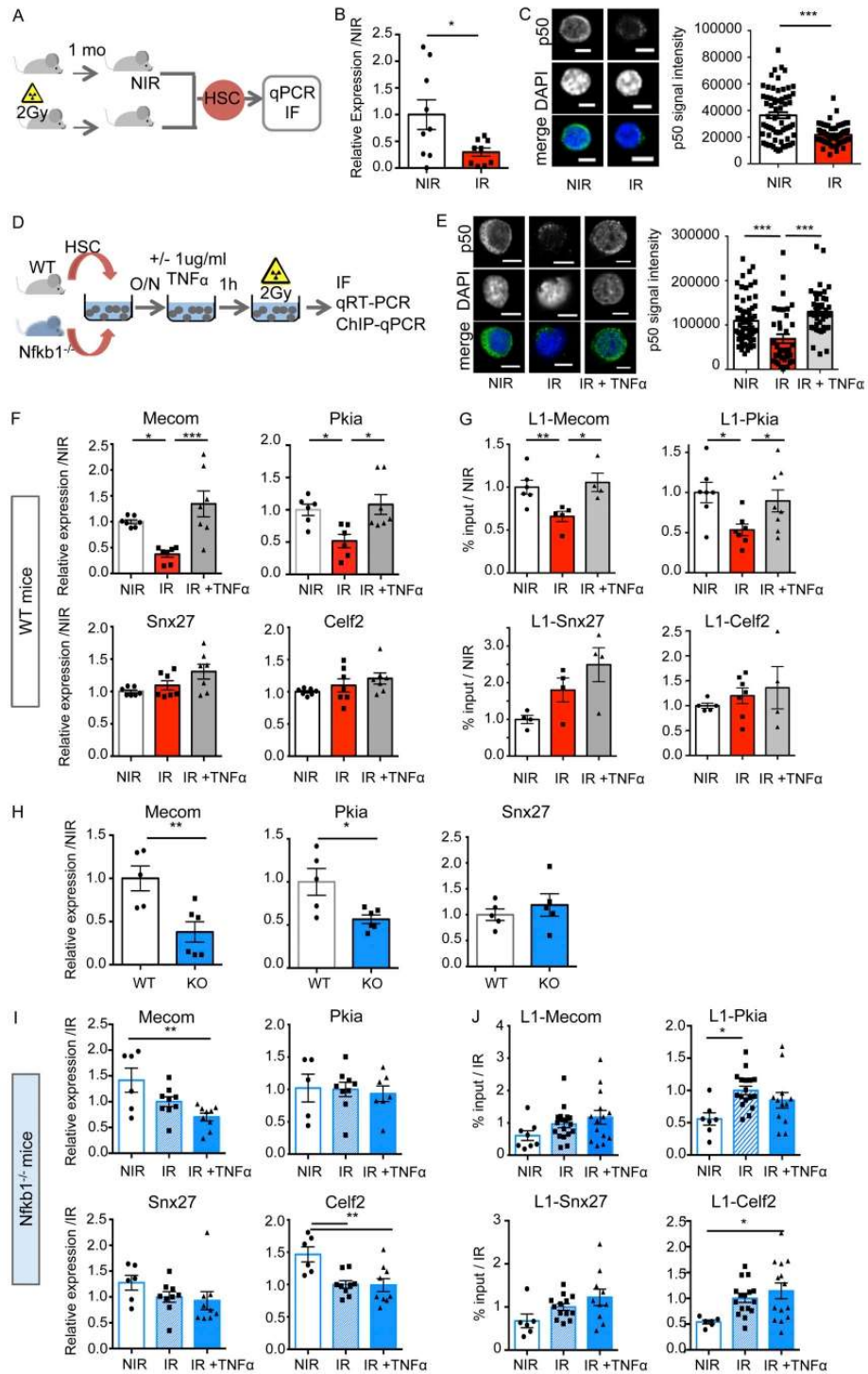


Figure 6. **TNF- α treatment prevents loss of H3H9me3 at intronic L1Md and HSC gene repression in vitro.** (A–C) NFKB1 expression in HSCs 1 mo after TBI. (B) mRNA expression measured by qRT-PCR. Ct values were normalized to mean of RPL32 and HPRT. Results are expressed as fold change from the mean

value of the NIR condition. Means \pm SEM. Each dot represents a pool of three (NIR) or four (IR) mice from three independent experiments. *t* test. **(C)** Representative images and quantification of NFKB1 protein mean immunofluorescence (IF) intensity. Bars, 5 μ M. Each dot represents a cell. Results are expressed as fold change from the mean value of the NIR condition from two independent experiments and represented as means \pm SEM. *t* test. **(D)** Experimental design analyzing the effects of IR and TNF- α in vitro in WT and *Nfkb1*^{-/-} mice. **(E)** Representative images and quantification of NFKB1 staining. Bars, 5 μ M. Each dot represents a cell. Results are represented as mean \pm SEM of NFKB1 IF intensity. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. **(F)** Gene expression evaluated by qRT-PCR in WT mice. Means \pm SEM from two independent experiments. One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. **(G)** H3K9me3 enrichment at intronic LIMd evaluated by ChIP-qPCR. Results are expressed as in legend to Fig. 5 D. Means \pm SEM from two to three independent experiments. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. **(H and I)** mRNA expression measured by qRT-PCR in HSCs sorted from *Nfkb1*^{-/-} mice (KO) vs. WT without IR (H) or after IR and with or without prior TNF- α treatment in vitro (I). Ct values were normalized to the mean of RPL32 and HPRT. **(J)** H3K9me3 enrichment at intronic LIMd evaluated by ChIP-qPCR. For each experiment (H–J), a pool of 14–16 mice was used and divided in two to four culture replicates. Each dot represents one replicate of two to five independent experiments. Means \pm SEM, *t* test (H); one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test (I and J). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001.

sorted 1 mo after IR (Fig. 7 A). CUT&Tag gave an efficient profiling of H3K9me3 with exceptionally low background as observed at the SUV39h-1- and -2-dependent H3K9me3 peaks (Bulut-Karslioglu et al., 2014; Fig. S5 A) and as previously described (Kaya-Okur et al., 2019). Plot profile of H3K9me3 enrichment along LIMd sequences confirmed the loss of H3K9me3 at LIMd upon IR and showed it could be prevented by TNF- α (Fig. 7 B). Notably, TNF- α also inhibited the specific loss of H3K9me3 enrichment at the intronic LIMd of *Mecom* and *Pkia* but not *Mapre2* (Fig. 7 C) and restored the corresponding gene expression (Fig. 7 D). RNA-seq analysis further showed that TNF- α injection in vivo prevented IR-induced loss of both TNF- α via NF- κ B (Fig. 7 E) and long-term HSC signatures (Fig. 7 F and Fig. S5 B).

TNF- α treatment prevents HSC loss of function during IR stress independently of their level of DNA damage

To confirm the importance of this pathway in HSC maintenance, we analyzed the effect of TNF- α treatment on HSC function upon IR. Total bone marrow (BM) cells isolated from mice treated with TNF- α before TBI or not were transplanted in competition with total BM cells from mice ubiquitously expressing GFP (ubi-GFP mice) into lethally irradiated ubi-GFP mice (Schaefer et al., 2001; Fig. 7 A). 7 wk and 3 mo after reconstitution, as expected, the percentage of GFP negative IR donor cells in the blood was greatly decreased. TNF- α treatment before TBI significantly prevented this effect (Fig. 8, A and B; and Fig. S5 C). It also significantly prevented IR-induced Lin-Sca+Kit+ (LSK) and LT-HSC loss (Fig. 8, C and D; and Fig. S5 D). Secondary transplants showed that the self-renewal function of HSCs after IR could be restored by TNF- α treatment (Fig. 8 E). TNF- α treatment could similarly rescue blood reconstitution and LT-HSCs in the BM when injected after TBI, either in one dose at 6 h or in two doses at 1 and 13 h (Fig. 8, F–J).

Contrary to what we previously observed with thrombopoietin (de Laval et al., 2013), TNF- α treatment was not able to prevent γ H2AX foci formation upon IR or to enhance the DSB repair as we observed no effect of TNF- α on the number of γ H2AX foci at short (30 min) or long (24 h) term after IR in vitro (Fig. 8 K). In addition, TNF- α treatment had no effect on the number of γ H2AX foci in HSCs 1 mo after IR (Fig. 8 L). Altogether, these data suggest that TNF- α treatment rescues HSC reconstitution ability upon IR independently of their level of DNA damage by preventing IR-induced decrease in NFKB1

repressor expression, specific derepression of LIMd harboring NF- κ B binding sites in the introns of HSC genes, and thereby their repression (Fig. 9).

Discussion

H3K9me3 alterations are a hallmark of aging and cellular senescence in model organisms (Criscione et al., 2016; Ocampo et al., 2016). Although H3K9me3 has been shown to be crucial for HSC identity (Koide et al., 2016), H3K9me3 changes in HSCs have, to our knowledge, never been studied in the context of stress such as IR. We show here that IR stress profoundly affects HSC heterochromatin by significantly reducing H3K9me3 enrichment, without affecting the expression of factors controlling H3K9 tri-methylation (SETDB1, KAP1, or MPP8 from the human silencing hub complex). This loss mainly occurs at evolutionary recent LIMd elements. This effect was observed both after short time in vitro and long time after TBI in vivo, suggesting that heterochromatin alterations may explain the long-term effect of IR on HSC function.

Heterochromatin alterations are associated with a strong deregulation of the HSC transcriptome. H3K9me3 enrichment at promoters has recently emerged as a key player in the repression of lineage-inappropriate genes (Koide et al., 2016). Surprisingly, we found here that gene deregulation is not associated with H3K9me3 changes at gene promoters, but is rather associated with the loss of H3K9me3 at intronic LIMd. H3K9me3 enriched at intronic LIMd was previously shown to be involved in the tight regulation of gene transcription in ESCs (Liu et al., 2018). Some ERVs also play the role of AML enhancers with a driving role in leukemia cell phenotype (Deniz et al., 2020). However, our study is the first showing the involvement of LIMd on the regulation of HSC gene expression.

With CRISPR/Cas9 targeted deletion, we show that the presence of intronic LIMd in *Mecom* is required for *Mecom* gene-specific downregulation upon IR and suggests that intronic LIMd can act in cis to regulate gene expression. Although surprising at first glance, repression of genes following derepression of intragenic L1 was previously reported in cancers (Aporntewan et al., 2011). This may be due to transcriptional interference (Han et al., 2004; Kaer et al., 2011; Ninova et al., 2020). We cannot test directly this hypothesis due to the repetitive nature of these sequences. However, we could observe downregulation of *Rmdn2* gene whereas the LIMd located in its

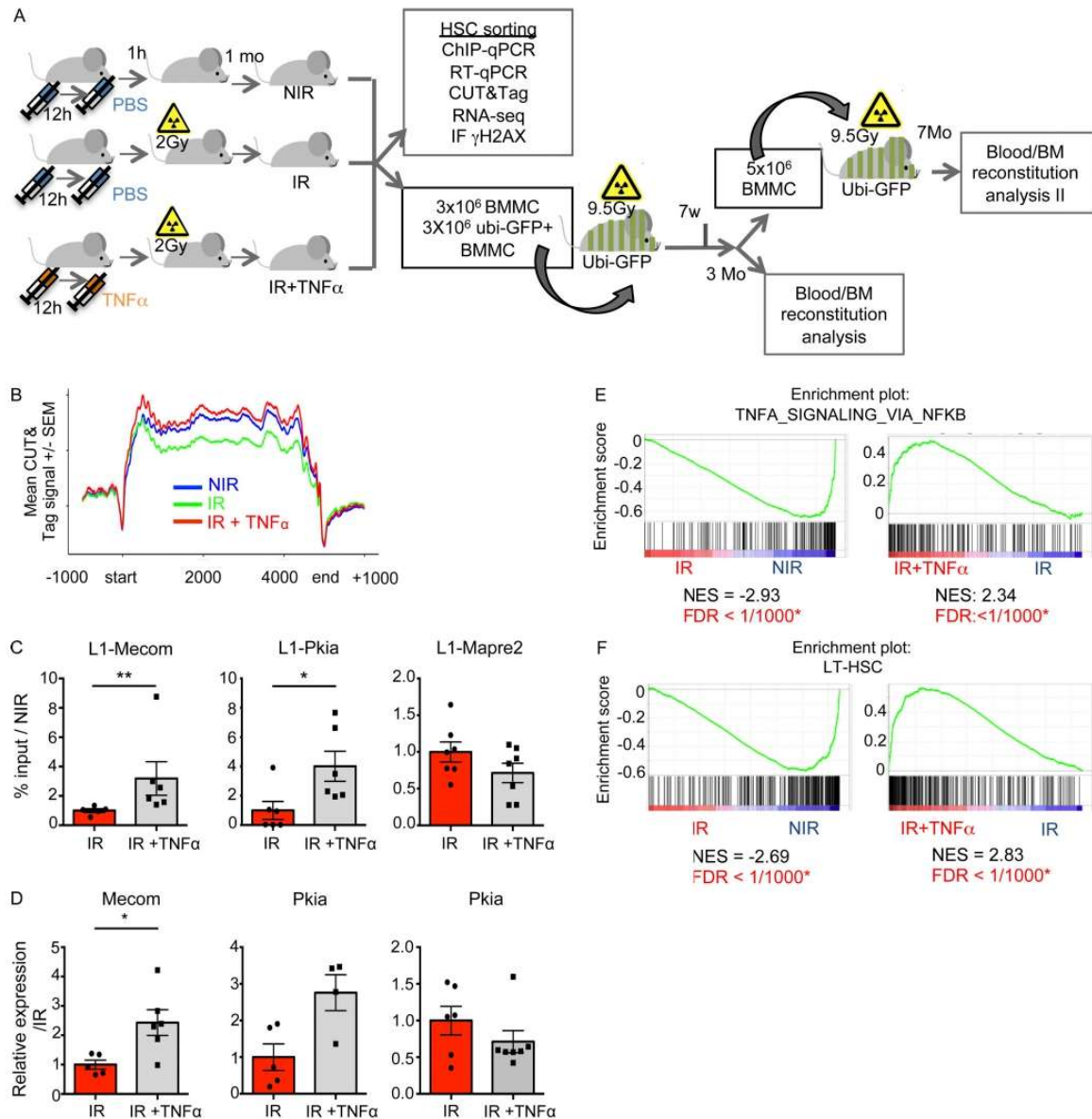


Figure 7. TNF- α treatment prevents loss of H3H9me3 at intronic LIMd and HSC gene repression. (A) Experimental design for TNF- α treatment in vivo, molecular analysis, and reconstitution experiments using HSCs sorted from mice 1 mo after TBI and previously treated with TNF- α (IR + TNF α) or not (IR), or left untreated (NIR); BMMC, bone marrow mononuclear cells. (B) Plot profile of H3K9me3 enrichment along the LIMd sequences \pm 1 kb flanking regions in NIR (blue), IR (green), and IR + TNF- α (red) conditions. Each line represents the merged CUT&Tag signal from two (NIR) to three (IR and IR + TNF- α) mice \pm SEM. (C) H3K9me3 enrichment at intronic LIMd evaluated by ChIP-qPCR. (D) mRNA expression measured by qRT-PCR. Ct values were normalized to RPL32 and HPRT. (C and D) Results are expressed as fold change from the mean value of the IR condition. Each dot represents a pool of four mice. Means \pm SEM from two independent experiments, *t* test. (E and F) GSEA analysis using gene sets. Enrichment plots for TNF- α signaling via NF- κ B hallmark (E) and LT-HSC signature (F). *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01.

intron lacks 5'UTR promoter sequences (Fig. 5 B), suggesting that gene repression may not be exclusively due to intronic LIMd transcription. Instead of blocking transcription, DNA methylation or H3K9me3 within gene bodies is a feature of transcribed gene (Jones, 2012; Ninova et al., 2020; Vakoc et al.,

2005). H3K9me3 loss in gene bodies was previously shown to be associated with gene repression (Ninova et al., 2020). The presence of H3K9me3 islands in the body of the genes has been proposed to slow-down RNA Polymerase II (RNAP II) elongation rate (Saint-André et al., 2011; Vakoc et al., 2005). This was

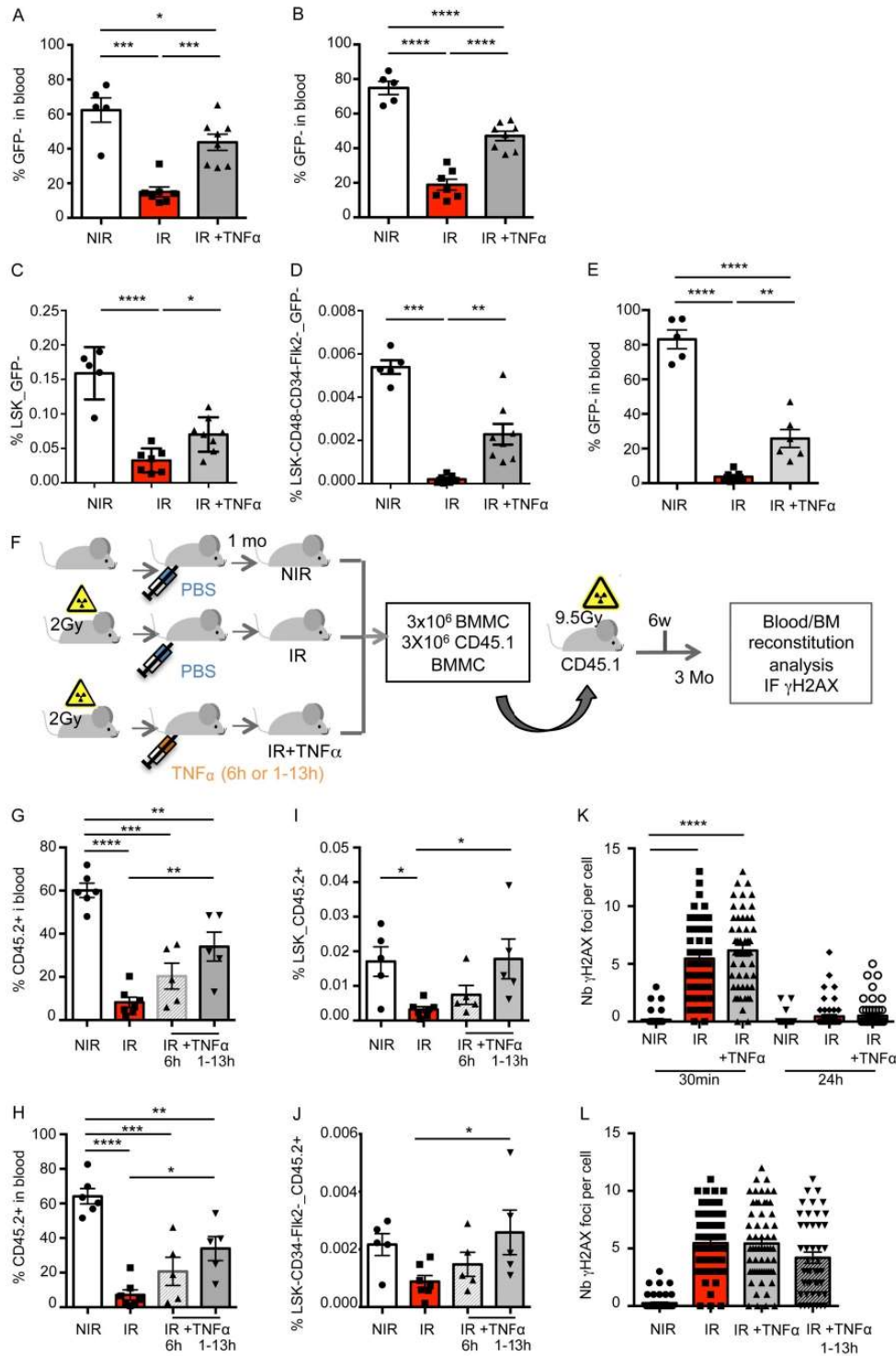


Figure 8. **TNF-α treatment prevents loss of H3H9me3 HSC function in vivo independently of their level of DNA damage.** (A and B) Percentage of GFP⁻ negative donor contribution in blood in mice transplanted with NIR, IR, or IR + TNF-α cells at 7 (A) and 14 wk (B) after reconstitution. (C and D) LSK GFP⁻ (C) or

LSK CD34-Flk2-CD48⁻ (D) GFP-negative donor HSC contribution in the BM 14 wk after reconstitution. One-way ANOVA Tukey's multiple comparison test. (E) Percentage of GFP-negative donor contribution in blood in mice secondary transplanted with pool of NIR, IR, or IR + TNF- α mice from the primary reconstitution. One-way ANOVA Tukey's multiple comparison test. (F) Experimental design for TNF- α treatment after IR in vivo and reconstitution experiments using HSCs sorted from mice 1 mo after TBI and treated with TNF- α 6 h after IR (IR + TNF α 6 h), treated with TNF 1 and 13 h after IR (IR + TNF α 1-13 h), irradiated but non-treated with TNF- α (IR), or non irradiated and non treated (NIR); BMMC, bone marrow mononuclear cells. (G and H) Percentage of CD45.2 donor contribution in blood in mice transplanted with NIR, IR, or IR + TNF- α cells at 6 (G) and 11 wk (H). (I and J) Percentage of LSK-CD45.2 (I) or LSK-CD34-Flk2-CD45.2* (J) donor HSC contribution in the BM 11 wk after reconstitution. One-way ANOVA Tukey's (I) or Dunnett's (J) multiple comparison test. (K and L) γ H2AX foci number 30 min and 24 h after IR in vitro with or without prior TNF- α treatment (K) or 1 mo after IR in vivo with or without TNF- α treatment before IR (IR + TNF- α) or after IR (IR + TNF- α 1-13 h; L). One-way ANOVA Tukey's multiple comparison test. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001.

shown to help the recognition of true vs. cryptic RNA processing sites, controlling alternative splicing (de la Mata et al., 2003), polyadenylation, and finally transcript stability. This is particularly relevant in the case of genes bearing long introns.

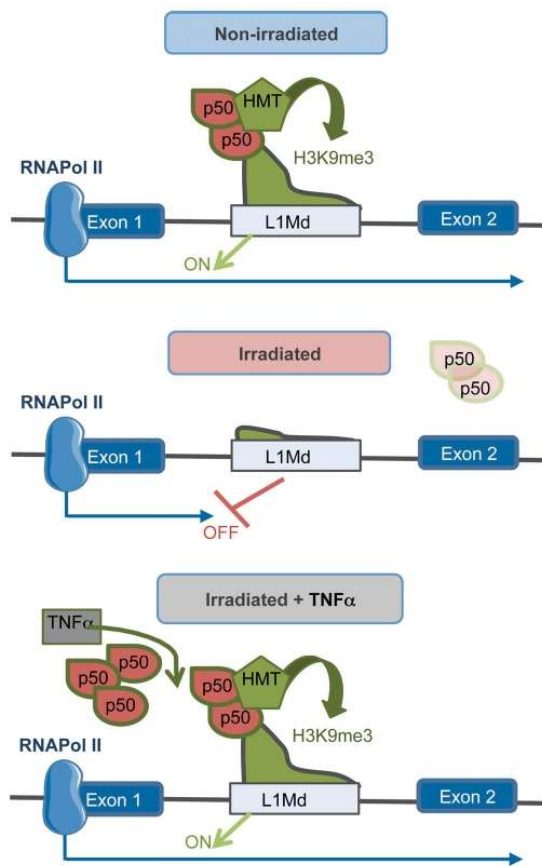


Figure 9. **Model.** At basal, the NF- κ B pathway, possibly through its repressor NFKB1 (p50/p50 homodimers), is involved in the recruitment of H3K9 methylases (HMT) at intronic L1Md enriched in NF- κ B binding sites motifs, and apposition of the repressive histone mark H3K9me3. H3K9me3 "islands" into the body of transcribed genes may help the processing of RNAP II (RNAPol II) and transcript stability. Upon irradiation, loss of the TNF- α -NF- κ B pathway leads to a loss of H3K9me3 at the intronic L1Md, gene repression, and transcript stability. This is prevented by prior TNF- α treatment.

Interestingly, the genes downregulated upon IR in HSCs are significantly longer than by chance (data not shown). Slowing down RNAP II elongation rate in these long intron genes might also prevent R-loop formation and genomic instability (Aguilera and Gaillard, 2014). Thus, even in the absence of intronic L1Md transcription, loss of H3K9me3 islands enriched at intronic L1Md in the body of the genes might lead to gene repression. In accordance with this hypothesis, we showed that deletion of the L1Md in the intron of *Mecom* resulted in decreased *Mecom* gene expression (Fig. 5 G). *Mecom* repression in this case may be due to the absence of H3K9me3 islands in its gene body, as observed upon IR-mediated loss of H3K9me3. However, the precise mechanisms involved in HSC gene regulation through their intronic L1Md will require further investigations.

Our RNA-seq analysis indicates a strong downregulation of the TNF- α -NF- κ B gene signature 1 mo after TBI. IR specifically reduced the recently described HSC-prosurvival TNF- α -NF- κ B signature required to maintain HSCs during inflammation or cytotoxic BM ablation (Yamashita and Passegué, 2019). This suggests that loss of long-term regenerating HSCs and TNF- α -NF- κ B gene expression upon IR may be linked. Supporting this possibility, treatment of HSCs with TNF- α before IR in vitro, or its injection to mice before or after TBI, restored HSC gene expression and their reconstitution ability. These results strongly support previous data showing that TNF- α -NF- κ B signaling is required to regulate HSC function under stress (Hu et al., 2021; de Laval et al., 2014; Yamashita and Passegué, 2019). TNF- α promotes HSC survival through p65/RelA NF- κ B subunit (Yamashita and Passegué, 2019). This factor has also been found to control the expression of genes involved in HSC maintenance (Stein and Baldwin, 2013). However, the promoters of HSC genes downregulated upon IR are not enriched in NF- κ B binding sites. We show that L1Md associated with gene repression upon IR are specifically and significantly enriched in NF- κ B binding sites, and that this pathway regulates gene expression by controlling the level of H3K9me3 at these sequences. Interestingly, H3K9me3 enriched genomic regions specific to human ESCs as compared to more differentiated cells are enriched in NF- κ B binding sites, suggesting their importance in establishing and maintaining the pluripotent state (Whitaker et al., 2015).

Whereas most of the NF- κ B members can form active transcription factors, NFKB1 p50 subunit lacks transactivation domain and p50:p50 homodimers have been shown to act as stimulus-specific repressors, notably during the resolution phase of inflammation, by recruiting H3K9 methyltransferases

and histone deacetylases at both NF- κ B and type-I IFN response genes (Cartwright et al., 2018; Ea et al., 2012; Elsharkawy et al., 2010). p50:p65 heterodimers are the most abundant form of NF- κ B generated upon inflammatory stimuli. By contrast, p50 homodimers predominate in unstimulated cells where they can be prebound to the chromatin (Cartwright et al., 2016; Schreiber et al., 2006), suggesting that this factor may also play a role under noninflammatory conditions. Indeed, we found that NFKB1 is present in both the cytoplasm and the nucleus of resting HSCs. Deletion of *Nfkb1*, or downregulation of p50/NFKB1 gene and protein as induced by IR, correlates with the decrease of both gene expression and H3K9me3 levels at their intronic LIMd harboring an NF- κ B binding sites. Conversely, increasing p50 production upon TNF- α stimulation rescued H3K9me3 levels at the specific intronic LIMd and gene expression in WT but not in *Nfkb1*^{-/-} HSCs. This strongly supports the possibility that p50:p50 homodimers are the active repressor promoting the enrichment of H3K9me3 at LIMd located in HSC genes and the cis regulation of the host gene.

A growing body of evidence indicates that TEs have been coopted for transcriptional regulation in different cell and tissue types (Chuong et al., 2017). TEs are reservoirs of functional transcription factor binding sites. Since these sequences are widespread in the genome, they are largely contributing to the innovation of regulatory networks in a tissue-specific fashion (Chuong et al., 2017; Hermant and Torres-Padilla, 2021; Sundaram and Wang, 2018). Although LTRs dominate this relationship, a search for binding motifs in young L1 in human and mouse has revealed the presence of various TF motifs, including CTCF, YY1, and MYC (Sun et al., 2018; Sundaram and Wang, 2018). Our results show that NF- κ B motifs are specifically enriched in most of the intronic LIMd sequences of genes downregulated during IR stress, and involve as much as 96% of these genes (Table S3). The presence of NF- κ B binding sites in TEs is reminiscent of a study reporting that, in the human genome, 11% of NF- κ B-binding sites reside in specific Alu SINEs, and that the vast majority of sites bound by NF- κ B do not correlate with changes in gene expression (Antonaki et al., 2011). Although it is not known how many of these NF- κ B motifs present in intronic LIMd have a functional role, the ability of TNF- α to restore both H3K9me3 levels at the LIMd and the expression specifically of genes including NF- κ B motif-enriched intronic LIMds strongly suggests that at least some of these NF- κ B-TE associations can influence gene expression.

TEs have rewired the antiviral gene regulatory network and they have been shown to play a key role in the regulatory evolution of immune response. Strong but opposing forces are driving the coevolution of TEs and antiviral defense (Chuong et al., 2016; Moelling and Broecker, 2019). Many IFN/NF- κ B-target genes are viral restriction factors and contribute to the immune control of both endogenous (i.e., TEs) and exogenous genomic parasites (Gázquez-Gutiérrez et al., 2021; Schneider et al., 2014). We and others have previously shown that IFN-I signaling controls young LIMd expression and L1 retrotransposition in HSCs and various tissues (Barbieri et al., 2018; Goodier et al., 2015; Yu et al., 2015). However, through the formation of double-strand (ds)RNA or cytoplasmic cDNA

resembling viral nucleic acids, TEs are sensed by the cells as invading viruses and promote the activation of IRF3 and NF- κ B transcription factors and the major antiviral immune pathways (Gázquez-Gutiérrez et al., 2021; Volkman and Stetson, 2014). Notably, TE-derived dsRNAs have been shown to provide the inflammatory signal necessary for HSC generation during embryonic development (Lefkopoulos et al., 2020). Intriguingly, beside HSC maintenance genes, many genes involved in IFN and NF- κ B immune response pathway are found among genes downregulated in IR presenting an intronic LIMd with an NF- κ B binding site (Table S3). These include target genes of IFN and NF- κ B, such as *Eif2ak2* and *Oaslg*, that are known to control L1 retrotransposition and/or levels, and whose activity are triggered by virus- or TE-derived dsRNAs; *Jak2*, *Tyk2*, *Tnfrsf9*, and *Birc2* involved in IFN and TNF responses, respectively, as well as T-cell suppressing activity genes, *CD274* (PD-L1) and *CD86*. This further reinforces the causal relationships between TEs and immune genes and their coevolution. Interestingly, a higher TE occurrence has been found in immune gene-associated genomic regions and young TEs are specifically enriched in blood cells, as compared to other tissues (Trizzino et al., 2018; Ye et al., 2020). Using BAMMmotif for de novo motif search, we have found that the NF- κ B motif is specifically enriched in LIMd that are present in genes of the HSC signature, and in the myeloid-leucocyte-mediated-immunity signature (GO:0002444) as compared to genes enriched in pancreas, testis, kidney, liver, placenta, and salivary gland (Su et al., 2002; Fig. S3 K), or in genes from the immune system process (GO:0002376) as compared to genes from the reproductive process (GO:0022414; Fig. S3 L). This suggests that NF- κ B binding sites in LIMd might have been actively selected in introns of key HSC genes because of the immune-linked maintenance. This regulation might be important to expand the NF- κ B and TNF- α activity by engaging more genes, including HSC maintenance genes into the NF- κ B regulatory networks. Such activity could be important to maintain HSCs while allowing expression of immune gene during TNF- α -NF- κ B-induced myeloid regeneration or damage-induced bone marrow ablation, and further highlights the complex role of inflammation-induced pathways in HSCs. TNF- α levels are increased in patients with hematopoietic malignancies and the HSC-specific TNF- α signature is upregulated in myelodysplastic syndrome/AML malignant HSCs (Yamashita and Passegué, 2019). Exploring the mechanisms controlling TE expression and how inflammatory signals and aging impact them in normal and malignant HSC could lead to the identification of new selective dependencies of AML and new treatment strategies.

Materials and methods

Mice strains and treatments

WT C57BL/6J mice (6–8 wk old) were from the Envigo Laboratories. *Nfkb1*^{-/-} mice were from The Jackson Laboratory (B6.Cg-Nfkb1^{tm1Bai/J}; Stock No:006097). All the mice were housed in a specific pathogen-free environment. All procedures were reviewed and approved by the Animal Care Committee no. 26 approved by the French Ministry for Research (#2019_078_23286; CE). Mice were injected retro-orbitally with

2 μg TNF- α (Biolegend-Ozyme) before or after sublethal TBI (2 Gy; RX irradiator X- RAD 320).

Cell harvest and culture

Bone marrow was harvested from femur, tibia, and hip bones in mice. Total bone marrow was depleted of differentiated hematopoietic cells (lineage-positive cells) using Mouse Hematopoietic Progenitor (Stem) Cell Enrichment Set (BD). Magnetically sorted Lineage-negative (lin^-) cells were kept overnight (O/N) at 4°C in IMDM medium supplemented with 10% FBS (HyClone) and 1% penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Staining was performed for 20 min at room temperature (RT) using CD3e (Lin)-APC clone 145-2C11 (553066; BD), TER-119 (Lin)-APC clone Ter-119 (557909; BD), CD45R/B220 (Lin)-APC clone RA3-6B2 (553092; BD), Ly6G-6C (Lin)-APC clone RB6-8C5 (553129; BD), Ly-6A/E (Sca-1)-PeCy7 clone d7 (558162; BD), CD117 (c-Kit)-PE or PerCP-Cy5.5, clone 2B8 (553355 or 560557, respectively; BD), CD34-FITC or AF700 clone RAM34 (560238 or 560518; BD), CD135 (Flk2)-BV421 or PE clone A2F10.1 (562898 or 553842, respectively; BD). HSCs ($\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD34}^{\text{low}} \text{Flk2}^-$) were sorted using ARIA3, ARIA Fusion, or Influx cell sorters (BD) and collected in Stem Span (StemCell).

When the cells were irradiated *in vitro*, HSCs were cultured in medium containing Flt3-Ligand, IL-3, IL-6, SCF as described (de Laval et al., 2013) in the presence or absence of TNF- α . TNF- α was added to the medium at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 1 h before IR.

CRISPR-Cas9 deletion

gRNAs were designed to generate specific deletion of the intronic LIMd of Mecom using CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>; Table S4). 1 μg total gRNAs (0.5 μg 5'-gRNA + 0.5 μg 3'-gRNA; Dharmacon) were incubated with 1 μg Cas9 (CAS12205; Dharmacon) during 15 min at RT and the Cas9-gRNA RNP was then co-electroporated with an equimolar siglo-green transfection indicator (D-001630-01-05) in 100 000 LSK after an O/N culture in medium containing Flt3-Ligand, IL-3, IL-6, SCF, as described (de Laval et al., 2013), and using a Neon transfection system (Thermo Fisher Scientific) with the optimized electroporation condition 1700 V, 20 ms, 1 pulse as previously described (Gundry et al., 2016). Just after electroporation, FITC + HSC were sorted and collected in Stem Span (StemCell) containing Flt3-Ligand, IL-3, IL-6, SCF, and left O/N in culture before irradiation. Cells were finally collected 48 h after irradiation for further experiments.

DNA extraction and genomic deletion verification

DNA from electroporated HSC was extracted using the tissue XS kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions, and the specific deletion of Mecom intronic LIMd was checked through qRT-PCR using the ChIP-qPCR primers (Table S4).

qRT-PCR

HSCs were lysed in Tri-Reagent (Zymo Research) and stored at -80°C until used. Total RNA was extracted using the Direct-Zol RNA microprep kit (Zymo research) and reverse-transcribed with EZ Dnase VILO (Invitrogen). Real-time PCR was

performed using the SYBR pPCR premix Ex Taq (Takara) or LUNA Universal qPCR Master Mix (NEB) on a 7500 real-time PCR machine (Applied Biosystems). Samples were tested for qPCR before reverse transcription to rule out detection of contaminating DNA. qPCR primers used were designed in different exons so as to minimize possible gDNA amplification. All data were normalized to the mean expression of RPL32 and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT). Primer sequences are shown in Table S4.

When necessary, 1.25 μl of cDNA was preamplified for 14 PCR cycles in a multiplex reaction using Preamp Master-Mix (100-5580; Fluidigm) and primer mix (200 μM of each primer). To rule out primer dimerization or hairpin formation in the pre-amplification mix, primer sequences were previously analyzed using MFE3.0 PCR Primer Quality Control Software (Wang et al., 2019).

ChIP-qPCR

10,000 HSCs were harvested in 1 ml IMDM medium supplemented with 10% FBS and cross-linked using 1% formaldehyde (Invitrogen) for 10 min at RT. ChIP-qPCR experiments were performed using the True Micro-ChIP Kit (Diagenode) according to the manufacturer's instructions. Cells were sonicated using the Bioruptor Pico (Diagenode) sonication device for 10 cycles (20 s ON/40 s OFF). Chromatin was incubated O/N at 4°C using 0.25 μg of H3K9me3 (C15410193; Diagenode) per IP. ChIP DNA was eluted and purified using the MicroChIP Diapure Columns (Diagenode). Subsequent qPCR was performed as above. ChIP-qPCR primers for intronic LIMd were designed such that one primer is located in the 5' region of the LIMd, and the other primer is located in the intron of the host gene to allow the amplification of unique and specific product (Table S4).

Immunofluorescence

3,000–5,000 HSCs were cytospun on glass slides and immunofluorescence was performed as previously described (de Laval et al., 2013). Two different monoclonal anti-NFKB1 (p50) antibodies were used at 1/200: clone E10 was purchased from Santa Cruz Biotechnology, and clone D4P4D from Cell Signaling. γH2AX antibody was purchased from Millipore (05-636-1) and used at 1/2000. Detection was performed using Alexa Fluor 488-coupled antimouse secondary antibody (1/600). All slides were visualized using SPE confocal microscope (Leica). Pictures were analyzed using CellProfiler.

Statistical analysis

Results were statistically evaluated using either the one-way ANOVA or unpaired *t* test using GraphPad Prism version 6.0 software (GraphPad Software Inc.). The results are displayed as the means and SEM. The value of *, $P < 0.05$ was considered as significant, and **, $P < 0.01$ or ***, $P < 0.001$ as highly significant.

ChIP-seq

The ChIP-seq experiment has been conducted by Diagenode ChIP-seq (Cat# G02010000; Diagenode). The chromatin was prepared using the True MicroChIP Kit (Cat# C01010130; Diagenode). Chromatin was sheared using Bioruptor Pico sonication

Pelinski et al.

Cis-regulation of HSC genes by intronic LINE-1

device (Cat# B01060001; Diagenode) combined with the Bioruptor Water cooler for seven cycles using 30" (ON) 30" (OFF) settings. Shearing was performed in 0.65 ml Bioruptor Pico Microtubes (Cat# C30010011; Diagenode) with the following cell numbers: 10,000 cells in 100 μ l for batch #1 and 20,000 in 100 μ l for batch #2. 30 μ l of this chromatin was used to assess the size of the DNA fragments obtained by High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit (DNF-474) on a Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Inc.). CHIP was performed using IP-Star Compact Automated System (Cat# B03000002; Diagenode) following the protocol of the aforementioned kit. Chromatin corresponding to 7,000 or 18,000 cells was immunoprecipitated using 0.5 μ g of H3K9me3 antibody (C15410193; Diagenode antibody). Chromatin corresponding to 10% was set apart as Input.

For each sample, a library preparation was performed on 500 pg of DNA using the MicroPLEX v2 protocol. The CHIP samples were processed together and a control library was processed in parallel of the samples using the same amount of a control Diagenode CHIP'd DNA. According to the protocol, 12 cycles of amplification were performed to amplify the libraries. After amplification, 1 μ l of each library was loaded on Fragment Analyzer to check if enough material was generated. If not, additional cycles were performed until having enough material. The libraries were amplified for two to seven additional cycles, and then 1 μ l of the libraries was analyzed on the Fragment Analyzer. Using the quantification values from the Qubit and the size measurement generated by the Fragment Analyzer, the molar concentration of each library was calculated. Then, the different libraries were diluted to reach the final concentration each and pooled together. Batch #1 was sequenced into two lanes of a HiSeq 4000 (75 bp, paired end), and batch #2 was sequenced into one lane of a NovaSeq (150 bp, paired-end).

RNA-seq

HSCs from individual mice were lysed in Tri-Reagent (Zymo Research) and stored at -80°C until used. Total RNA was extracted using the Direct-Zol RNA microprep kit (Zymo research). For the IR vs. NIR analysis, the RNA integrity (RNA Integrity Score ≥ 7.0) was checked on the Agilent Fragment Analyzer (Agilent) and quantified. All samples were subjected to SMARTer cDNA synthesis using SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing - v3. Double-stranded cDNA (ds-cDNA) was sheared using Covaris to obtain ds-cDNA in the 200–500 bp size range. ds-cDNA fragments were end-repaired, extended with an "A" base on the 3' end, ligated with indexed paired-end adaptors (NEXTflex; Bioo Scientific) using the Bravo Platform (Agilent), amplified by PCR for 6 cycles and purified with AMPure XP beads (Beckman Coulter). For TNF- α analysis, all samples were subjected to SMARTer cDNA synthesis using SMARTer stranded total RNA-seq kit v3 following the manufacturer's instructions. Fragmentation time is adjusted depending on the quality of the RNA input.

The final libraries were pooled and sequenced using the on-board cluster method, as paired-end sequencing (2×100 bp reads) on Illumina NovaSeq-6000 sequencer at Gustave Roussy (Illumina).

CUT&Tag

CUT&Tag-IT assay kit (Active Motif) was used on 3,000 HSCs according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated O/N with 0.5 μ g of H3K9me3 (C15410193; Diagenode).

Genomic analysis

RNA-seq

Reads quality. Quality of RNA-seq reads was assessed with Fastqc v0.11.8, Fastq-screen (Wingett and Andrews, 2018) v0.13.0, and MultiQC (Ewels et al., 2016) v1.7.

RNA quantification. Salmon (Patro et al., 2017) tool v0.14.1 was used to quantify mm10 NCBI RNA reference sequences (O'Leary et al., 2016; RefSeq Curated, last updated 2017-11-16) downloaded from the UCSC Table Browser (Karolchik et al., 2004). Salmon was launched with the following parameters: --numBootstraps 60 --libType A --validateMappings.

For the second RNA-seq performed in NIR, IR, and IR + TNF- α conditions, we used nf-core/rnaseq (version 3.3) pipeline for RNAseq analysis (<https://doi.org/10.5281/zenodo.1400710>), with the following additional parameters: --genome mm10 --clip_r2 14, and performed on the Core Cluster of the Institut Français de Bioinformatique (ANR-11-INBS-0013).

Differential gene expression analysis. Statistical analysis was performed using R v3.5.1. Transcript expression levels were aggregated in gene expression levels using tximport Bioconductor package (Soneson et al., 2015) v1.13.16. Deseq2 (Love et al., 2014) v1.22.2 method was used to identify differentially expressed genes between groups with a P value threshold of 0.05.

Permutation test. To create the list of genes hosting an L1Md, browser extensible data (BED) files containing L1Md genomic localizations (reconstructed Repbase from Walter et al. [2016]) were intersected with the refseq_curated database from UCSC. Permutation test ($n = 10,000$) between lists of genes hosting an L1Md and DEG in IR vs. NIR, or the same number of random genes (randomly extracted from Refseq without DEG) was performed using R studio and considered significant if $P < 0.01$.

Motif enrichment analysis. Motif enrichment analysis was performed using BaMM! Web interface (Kiesel et al., 2018; Siebert and Söding, 2016) and de novo motif discovery module (pattern = 10, $P < 0.001$). Query motif was matched to known motifs using the Hocmococo mouse database.

GSEA analysis. GSEA analysis was performed using Hallmark Gene Sets V7. To plot graphs, $-\log_{10}$ P value is set to 4 when $P < 0.0001$.

CHIP-seq

Alignment. Human sequences were found in mouse CHIP-seq reads. The contamination was removed with Xenome (Conway et al., 2012) v1.0.0. After contamination removal, CHIP-seq sequence reads were mapped to the Mouse genome build mm10 by using Burrows-Wheeler Aligner MEM algorithm (Li and Durbin, 2009; BWA v0.7.17). The read group ID was attached to every read in the resulting alignment file (bam file) with the -R parameter, and shorter split hits were marked as secondary with -M. Samtools (Li et al., 2009) fixmate v1.9 was used to check mate-pair information between mates and fixed if needed on a

name-sorted bam file. The duplicate reads were tagged by samtools markduplicates using a position sorted bam file. Secondary alignments and unmapped reads have been filtered out and only properly paired reads have been kept. Two types of downstream analysis have been performed, with multimapped reads (mapping quality score ≥ 0) and one with uniquely mapped reads (mapping quality score ≥ 1). Cross-correlation scores (normalized or relative strand cross-correlation coefficient) have been calculated by phantompeakqualtools package (Kharchenko et al., 2008; Landt et al., 2012) v1.2. DeepTools (Ramírez et al., 2016) bamCoverage v3.3.0 has been used to generate normalized bigwig files with the following parameters: --binSize 1 --normalizeUsing BPM --extendReads --ignoreDuplicates. Then, deepTools bigwigCompare was used to subtract input signal from chip signal.

Peak calling. Areas in the genome enriched with aligned reads (also called peaks) were identified with MACS2 (Zhang et al., 2008) callpeak v2.1.2 with the following parameters: -f BAMPE -g mm10 -q 0.05 --broad --broad-cutoff 0.05 for H3K9me3 broad mark.

Irreproducible discovery rate (IDR) analysis. To measure the reproducibility between replicate experiments, we used the IDR method (Li et al., 2011) v2.0.4.2 with the following parameters: --rank q.value --random-seed 12345 --plot. Peaks with a global IDR score < 0.05 were selected and used for downstream analysis.

Peak annotation. Annotatr 1.8.0 (R3.5.1) was used for peak annotation.

H3K9me3 quantification and differential binding. To quantify H3K9me3 concentration at TE or promoters (-2 kb; $+1$ kb TSS), the Bioconductor package Diffbind (Ross-Innes et al., 2012) v2.10 was used in R v3.5.1. Paired-end mode was activated for read counting step with SummarizeOverlaps method. The default mapping quality threshold (mapQCth) was modified in 0 for multimapping analysis or 1 for unique mapping analysis. DBA_DESEQ2_BLOCK method was used to consider unwanted variable during normalization. Normalized H3K9me3 concentration at all TE loci from a same family/subfamily was summed to get a total H3K9me3 concentration per TE family. The age of a TE was calculated as in Sookdeo et al. (2013): divergences were converted to time assuming a neutral rodent genomic substitution rate of 1.1%/million yr.

Differential binding at peaks was identified with a P value threshold of 0.05.

Heatmaps. To plot heatmaps of H3K9me3 enrichment at peaks, deeptools package v3.2.0 was used in R v3.5.1. The peaks (IDR < 0.05) files obtained for NIR and IR conditions were first fused using bedops. A matrix was then built using ComputeMatrix tool in the scale-regions mode between the generated fused bed file and the corresponding normalized bigwig files after input subtraction. A body length of 2.5 kb (mean size of the peaks) was selected, as well as a 4-kb distance upstream and downstream of the start and the end of the peak. We asked for a “-outFileSortedRegions” that gives the sorted bed file used for the heatmap. This sorted bed file was then used for genome coverage analysis, i.e., identification of the presence of a given

TE in each row after computing a matrix with the TE genome coverage bigwig.

TE genome coverage. To generate TE genome coverage, bedtools package v2.27.1 was used. -bga option on the genomeCoverageBed tool was used. The bedGraphs generated were then converted to bigwig files using the bedGraphToBigWig tool.

CUT&Tag

CUT&Tag was analyzed as described as in https://yezhengstat.github.io/CUTTag_tutorial/index.html with the following parameters: Quality Control was performed using FastQC (0.11.9) and MutiQC (1.10.1); Bowtie2 (2.4.1) alignment to mm10 (UCSC genome) was performed with the following parameters: --end-to-end --very-sensitive --no-mixed --no-discordant --phred33 -I 10 -X 700; duplicate reads were removed using Picar (2.26.9) with the following parameters: --REMOVE_DUPLICATES true --VALIDATION_STRINGENCY LENIENT; aligned read quality score was set to 0 to keep all reads by using samtools (1.13) with the following parameters: -q 0; aligned reads were sorted and indexed using samtools (1.13); a coverage track (bigWig) was generated using deeptools (3.5.0) with the following parameters: -bs 5 --normalizeUsing BPM; peak calling was performed using macs2 (2.2.7.1) with the following parameters: -B --broad --broad-cutoff 0.1 -f BAMPE -g mm --max-gap 2000 --min-length 200; profile plot for scores over genomic regions (mm10.rmsk.mod.LIMd.bed) were performed using deeptools (3.5.0) with the following parameters: --beforeRegionStartLength 1000 --regionBodyLength 5000 --afterRegionStartLength 1000 \; statistics of the CUT and TAG signal were performed using the R package Rseeb 0.2.0: using as input a score matrix computed by deeptools's computeMatrix, we plotted the mean density profile of all condition with the SEM.

Online supplemental material

Fig. S1 relates to Figs. 1 and 2 showing additional information on ChIP-seq data. Fig. S2 relates to Figs. 3 and 4 showing additional information on RNA-seq data and the comparison between the ChIP-seq and the RNA-seq data. Fig. S3 relates to Fig. 5 showing ChIP-qPCR at intronic LIMd of additional target genes, the gating strategy for sorting HSC electroporated with the Cas9/gRNA RNP complex for intronic LIMd deletion, the results of the tests for gRNAs efficiency, and additional de novo motif search. Fig. S4 relates to Fig. 6 showing NFKB1 immunofluorescence data using another antibody (sc-8414, clone E10) and the effect of TNF- α on gene expression upon IR at additional target genes. Fig. S5 relates to Figs. 7 and 8 showing comparison of ChIP-seq and CUT&Tag profiles, additional gene signatures affected by IR and TNF- α treatment, and the gating strategies for analyzing HSC reconstitution capacity in blood and BM after IR and with or without TNF- α treatment. Table S1 shows quality control of the reads and peak calling data for the ChIP-seq analysis, Table S2 shows information on differentially expressed genes upon IR for RNA-seq analysis, Table S3 gives information on intragenic LIMd, and Table S4 lists primers and gRNAs used for the study.

Data availability

The dataset generated from the ChIP-seq for Figs. 1 and 2 are available in ArrayExpress accession no. E-MTAB-11865, from the RNA-seq for Figs. 3 and 4 in ArrayExpress accession no. E-MTAB-11866, and from RNA-seq and CUT&Tag for Fig. 7 in ArrayExpress accession nos. E-MTAB-11867 and E-MTAB-11864, respectively.

Acknowledgments

We thank the animal facility, the Genomic and the Imaging and Cytometry Platforms of Gustave Roussy for RNA-seq, confocal, and cell sorting analysis, respectively; S. Gregoricchio and Drs. C. Lobry and C. Guillouf (INSERM U1170, Gustave Roussy) for their advice for ChIP-seq analysis; D. Dubray for statistical analysis; and Drs. M. Goodhardt and D. Garrick (INSERM UMRS-1126, Paris) for helpful discussions. We also thank A. Teissandier and D. Bourc'his for providing us with the reconstructed repeatMasker database.

This work was supported by INSERM and grants from Ligue National Contre le Cancer (LNCC; Equipe labellisée EL2020) and Institut National du Cancer (PLBIO No. 2020-095) to F. Porteu, ARC Foundation (No. 20161204988), GEFLUC Paris-Ile de France (2017), LNCC (2018–2019), and Agence National de la Recherche (ANRJJC20-CE14-0018-01) to E. Elvira-Matelot. Y. Pelinski and D. Hidaoui are recipients of fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation. A. Stolz is recipient of a fellowship from LNCC. F. Hermetet is supported by Institut National du Cancer (PLBIO no. 2020-095 to F. Porteu).

Author contributions: Y. Pelinski, A. Stolz, and E. Elvira-Matelot performed the RNA-seq, ChIP-seq, CUT&Tag, and ChIP-qPCR experiments and analyzed the results. M.K. Diop, R. Chelbi, A.M. Chioukh, and E. Elvira-Matelot performed bioinformatic analyses. D. Hidaoui, F. Hermetet, and A. Stolz performed IF, qPCR, and reconstitution experiments and analyzed the results. F. Porteu and E. Elvira-Matelot designed and supervised the study, analyzed the results and wrote the manuscript.

Disclosures: The authors declare no competing interests exist.

Submitted: 23 June 2021

Revised: 23 December 2021

Accepted: 21 June 2022

References

Adoue, V., B. Binet, A. Malbec, J. Fourquet, P. Romagnoli, J.P.M. van Meerwijk, S. Amigorena, and O.P. Joffre. 2019. The histone methyltransferase SETDB1 controls T helper cell lineage integrity by repressing endogenous retroviruses. *Immunity*. 50:629–644.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.003>

Aguilera, A., and H. Gaillard. 2014. Transcription and recombination: When RNA meets DNA. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 6:a016543. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016543>

Antonaki, A., C. Demetriades, A. Polyzos, A. Banos, G. Vatsellas, M.D. Lavigne, E. Apostolou, E. Mantouvalou, D. Papadopoulou, G. Mosialos, and D. Thanos. 2011. Genomic analysis reveals a novel nuclear factor- κ B

(NF- κ B)-binding site in Alu-repetitive elements. *J. Biol. Chem.* 286: 38768–38782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.234161>

Apontewan, C., C. Phokaew, J. Piriyapongsa, C. Ngamphiw, C. Ittiwut, S. Tongshima, and A. Mutirangura. 2011. Hypomethylation of intragenic LINE-1 represses transcription in cancer cells through AGO2. *PLoS One*. 6:e17934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017934>

Barau, J., A. Teissandier, N. Zamudio, S. Roy, V. Nalesso, Y. Héroult, F. Guillouf, and D. Bourc'his. 2016. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*. 354:909–912. <https://doi.org/10.1126/science.aah5143>

Barbieri, D., E. Elvira-Matelot, Y. Pelinski, L. Genève, B. de Laval, G. Yogarajah, C. Pecquet, S.N. Constantinescu, and F. Porteu. 2018. Thrombopoietin protects hematopoietic stem cells from retrotransposon-mediated damage by promoting an antiviral response. *J. Exp. Med.* 215:1463–1480. <https://doi.org/10.1084/jem.20170997>

Bulut-Karslioglu, A., I.A. De La Rosa-Velázquez, F. Ramirez, M. Barenboim, M. Onishi-Seebacher, J. Arand, C. Galán, G.E. Winter, B. Engist, B. Gerle, et al. 2014. Suv39h-dependent H3K9me3 marks intact retrotransposons and silences LINE elements in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell*. 55: 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.029>

Cabezas-Wallscheid, N., F. Buettner, P. Sommerkamp, D. Klimmick, L. Ladel, F.B. Thälheimer, D. Pastor-Flores, L.P. Roma, S. Renders, P. Zeisberger, et al. 2017. Vitamin A-retinoic acid signaling regulates hematopoietic stem cell dormancy. *Cell*. 169:807–823.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.018>

Cartwright, T., N.D. Perkins, and C. L. Wilson. 2016. NFKB1: A suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J.* 283:1812–1822. <https://doi.org/10.1111/febs.13627>

Cartwright, T.N., J.C. Worrell, L. Marchetti, C.M. Dowling, A. Knox, P. Kiely, J. Mann, D.A. Mann, and C.L. Wilson. 2018. HDAC1 interacts with the p50 NF- κ B subunit via its nuclear localization sequence to constrain inflammatory gene expression. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1861:962–970. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.09.001>

Chambers, S.M., C.A. Shaw, C. Gatz, C.J. Fisk, L.A. Donehower, and M.A. Goodell. 2007. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol.* 5:e201. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050201>

Chuong, E.B., N.C. Elde, and C. Feschotte. 2016. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science*. 351:1083–1087. <https://doi.org/10.1126/science.aad5497>

Chuong, E.B., N.C. Elde, and C. Feschotte. 2017. Regulatory activities of transposable elements: From conflicts to benefits. *Nat. Rev. Genet.* 18: 71–86. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.139>

Clapes, T., A. Polyzou, P. Prater, Sagar, A. Morales-Hernández, M.G. Ferrarini, N. Kehrler, S. Lefkopoulos, V. Bergo, B. Hummel, et al. 2021. Chemotherapy-induced transposable elements activate MDA5 to enhance haematopoietic regeneration. *Nat. Cell Biol.* 23:704–717. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00707-9>

Conway, T., J. Wazny, A. Bromage, M. Tymms, D. Sooraj, E.D. Williams, and B. Beresford-Smith. 2012. Xenome: A tool for classifying reads from xenograft samples. *Bioinformatics*. 28:i172–i178. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts236>

Criscione, S.W., Y.V. Teo, and N. Neretti. 2016. The chromatin landscape of cellular senescence. *Trends Genet.* 32:751–761. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.09.005>

Deniz, Ö., M. Ahmed, C.D. Todd, A. Rio-Machin, M.A. Dawson, and M.R. Branco. 2020. Endogenous retroviruses are a source of enhancers with oncogenic potential in acute myeloid leukaemia. *Nat. Commun.* 11:3506. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17206-4>

Djehghoul, D., K. Kuranda, I. Kuzniak, D. Barbieri, I. Naguibneva, C. Choisy, J.-C. Bories, C. Dosquet, M. Pla, V. Vanneaux, et al. 2016. Age-associated decrease of the histone methyltransferase SUV39H1 in HSC perturbs heterochromatin and B lymphoid differentiation. *Stem Cell Rep.* 6: 970–984. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.007>

Ea, C.-K., S. Hao, K.S. Yeo, and D. Baltimore. 2012. EHT1 protein binds to nuclear factor- κ B p50 and represses gene expression. *J. Biol. Chem.* 287: 31207–31217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365601>

Elsarkawy, A.M., F. Oakley, F. Lin, G. Packham, D.A. Mann, and J. Mann. 2010. The NF-kappaB p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes. *J. Hepatol.* 53:519–527. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.025>

Ewels, P., M. Magnusson, S. Lundin, and M. Käller. 2016. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 32:3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>

Pelinski et al.

Cis-regulation of HSC genes by intronic LINE-1

Journal of Experimental Medicine
<https://doi.org/10.1084/jem.20211356>

20 of 22

- Fang, J., T. Muto, M. Kleppe, L.C. Bolanos, K.M. Hueneman, C.S. Walker, L. Sampson, A.M. Wellendorf, K. Chetal, K. Choi, et al. 2018. TRAF6 mediates basal activation of NF- κ B necessary for hematopoietic stem cell homeostasis. *Cell Rep.* 22:1250–1262. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.013>
- Fleener, C.J., A.I. Rozhok, V. Zaberezhnyy, D. Mathew, J. Kim, A.-C. Tan, I.D. Bernstein, and J. DeGregori. 2015. Contrasting roles for C/EBP α and Notch in irradiation-induced multipotent hematopoietic progenitor cell defects. *Stem Cell.* 33:1345–1358. <https://doi.org/10.1002/stem.1936>
- Gázquez-Gutiérrez, A., J. Witteveldt, S. R Heras, and S. Macias. 2021. Sensing of transposable elements by the antiviral innate immune system. *RNA.* 27:735–752. <https://doi.org/10.1261/rna.078721.121>
- Goodier, J.L., G.C. Pereira, L.E. Cheung, R.J. Rose, and H.H. Kazazian. 2015. The broad-spectrum antiviral protein ZAP restricts human retrotransposition. *PLoS Genet.* 11:e1005252. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005252>
- Gundry, M.C., L. Brunetti, A. Lin, A.E. Mayle, A. Kitano, D. Wagner, J.I. Hsu, K.A. Hoegenauer, C.M. Rooney, M.A. Goodell, and D. Nakada. 2016. Highly efficient genome editing of murine and human hematopoietic progenitor cells by CRISPR/Cas9. *Cell Rep.* 17:1453–1461. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.092>
- Han, J.S., S.T. Szak, and J.D. Boeke. 2004. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature.* 429:268–274. <https://doi.org/10.1038/nature02536>
- Hermant, C., and M.-E. Torres-Padilla. 2021. TFs for TEs: The transcription factor repertoire of mammalian transposable elements. *Genes Dev.* 35:22–39. <https://doi.org/10.1101/gad.344473.120>
- Hu, M., Y. Lu, H. Zeng, Z. Zhang, S. Chen, Y. Qi, Y. Xu, F. Chen, Y. Tang, M. Chen, et al. 2021. MicroRNA-21 maintains hematopoietic stem cell homeostasis through sustaining the NF- κ B signaling pathway in mice. *Haematologica.* 106:412–423. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.236927>
- Jachowicz, J.W., X. Bing, J. Pontabry, A. Bošković, O.J. Rando, and M.-E. Torres-Padilla. 2017. LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nat. Genet.* 49:1502–1510. <https://doi.org/10.1038/ng.3945>
- Jang, H.S., N.M. Shah, A.Y. Du, Z.Z. Dailey, E.C. Pehrsson, P.M. Godoy, D. Zhang, D. Li, X. Xing, S. Kim, et al. 2019. Transposable elements drive widespread expression of oncogenes in human cancers. *Nat. Genet.* 51:611–617. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0373-3>
- Jones, P.A. 2012. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 13:484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Kaer, K., J. Branovets, A. Hallikma, P. Nigumann, and M. Speek. 2011. Intronic L1 retrotransposons and nested genes cause transcriptional interference by inducing intron retention, exonization and cryptic polyadenylation. *PLoS One.* 6:e26099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026099>
- Karolchik, D., A.S. Hinrichs, T.S. Furey, K.M. Roskin, C.W. Sugnet, D. Haussler, and W.J. Kent. 2004. The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res.* 32:D493–D496. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh103>
- Kaya-Okur, H.S., S.J. Wu, C.A. Codomo, E.S. Pledger, T.D. Bryson, J.G. Henikoff, K. Ahmad, and S. Henikoff. 2019. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells. *Nat. Commun.* 10:1930. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09982-5>
- Keenan, C.R., N. Iannarella, G. Naselli, N.G. Bediaga, T.M. Johanson, L.C. Harrison, and R.S. Allan. 2020. Extreme disruption of heterochromatin is required for accelerated hematopoietic aging. *Blood.* 135:2049–2058. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002990>
- Kharchenko, P.V., M.Y. Tolstorukov, and P.J. Park. 2008. Design and analysis of ChIP-seq experiments for DNA-binding proteins. *Nat. Biotechnol.* 26:1351–1359. <https://doi.org/10.1038/nbt.1508>
- Kiesel, A., C. Roth, W. Ge, M. Wess, M. Meier, and J. Söding. 2018. The BaMM web server for de-novo motif discovery and regulatory sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 46:W215–W220. <https://doi.org/10.1093/nar/gky431>
- Koide, S., M. Oshima, K. Takubo, S. Yamazaki, E. Nitta, A. Saraya, K. Aoyama, Y. Kato, S. Miyagi, Y. Nakajima-Takagi, et al. 2016. Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes. *Blood.* 128:638–649. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-694810>
- De La Mata, M., C.R. Alonso, S. Kadener, J.P. Fededa, M. Blaustein, F. Pelisch, P. Cramer, D. Bentley, and A.R. Kornblihtt. 2003. A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol. Cell.* 12:525–532. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.001>
- Landt, S.G., G.K. Marinov, A. Kundaje, P. Kheradpour, F. Pauli, S. Batzoglou, B.E. Bernstein, P. Bickel, J.B. Brown, P. Cayting, et al. 2012. ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome Res.* 22:1813–1831. <https://doi.org/10.1101/gr.136184.111>
- de Laval, B., P. Pawlikowska, D. Barbieri, C. Besnard-Guerin, A. Cico, R. Kumar, M. Gaudry, V. Baud, and F. Porteu. 2014. Thrombopoietin promotes NHEJ DNA repair in hematopoietic stem cells through specific activation of Erk and NF- κ B pathways and their target, IEX-1. *Blood.* 123:509–519. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515874>
- de Laval, B., P. Pawlikowska, L. Petit-Cocault, C. Bilhou-Nabera, G. Aubin-Houzelstein, M. Souyri, F. Pouzoulet, M. Gaudry, and F. Porteu. 2013. Thrombopoietin-increased DNA-PK-dependent DNA repair limits hematopoietic stem and progenitor cell mutagenesis in response to DNA damage. *Cell Stem Cell.* 12:37–48. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.012>
- Lefkopoulou, S., A. Polyzou, M. Derecka, V. Bergho, T. Clapes, P. Cauchy, C. Jerez-Longres, M. Onishi-Seebacher, N. Yin, N.-A. Martagon-Calderón, et al. 2020. Repetitive elements trigger RIG-I-like receptor signaling that regulates the emergence of hematopoietic stem and progenitor cells. *Immunity.* 53:934–951.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.007>
- Li, H., and R. Durbin. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin, and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 25:2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, Q., J.B. Brown, H. Huang, and P.J. Bickel. 2011. Measuring reproducibility of high-throughput experiments. *Am. Appl. Stat.* 5:1752–1779. <https://doi.org/10.1214/11-AOAS466>
- Liu, N., C.H. Lee, T. Swigut, E. Grow, B. Gu, M.C. Bassik, and J. Wysocka. 2018. Selective silencing of euchromatic L1s revealed by genome-wide screens for L1 regulators. *Nature.* 553:228–232. <https://doi.org/10.1038/nature25179>
- Love, M.I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Miousse, I.R., J. Chang, L. Shao, R. Pathak, É. Nzabarushimana, K.R. Kutanzi, R.D. Landes, A.J. Tackett, M. Hauer-Jensen, D. Zhou, and I. Koturbash. 2017a. Inter-strain differences in LINE-1 DNA methylation in the mouse hematopoietic system in response to exposure to ionizing radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1430. <https://doi.org/10.3390/ijms18071430>
- Miousse, I.R., K.R. Kutanzi, and I. Koturbash. 2017b. Effects of ionizing radiation on DNA methylation: From experimental biology to clinical applications. *Int. J. Radiat. Biol.* 93:457–469. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1287454>
- Moehrl, B.M., K. Nattamai, A. Brown, M.C. Florian, M. Ryan, M. Vogel, C. Bliederauser, K. Soller, D.R. Prows, A. Abdollahi, et al. 2015. Stem cell-specific mechanisms ensure genomic fidelity within HSCs and upon aging of HSCs. *Cell Rep.* 13:2412–2424. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.030>
- Moelling, K., and F. Broecker. 2019. Viruses and evolution—viruses first? A personal perspective. *Front. Microbiol.* 10:523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00523>
- Mohrin, M., E. Bourke, D. Alexander, M.R. Warr, K. Barry-Holson, M.M. Le Beau, C.G. Morrison, and E. Passegué. 2010. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell.* 7:174–185. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.014>
- Ninova, M., Y.A. Chen, B. Godneeva, A.K. Rogers, Y. Luo, K. Fejes Tóth, and A.A. Aravin. 2020. Su(var)2-10 and the SUMO pathway link piRNA-guided target recognition to chromatin silencing. *Mol. Cell.* 77:556–570.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.012>
- Ocampo, A., P. Reddy, P. Martinez-Redondo, A. Platero-Luengo, F. Hatanaka, T. Hishida, M. Li, D. Lam, M. Kurita, E. Beyret, et al. 2016. In vivo amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming. *Cell.* 167:1719–1733.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.052>
- O’Leary, N.A., M.W. Wright, J.R. Brister, S. Ciuffo, D. Haddad, R. McVeigh, B. Rajput, B. Robbette, B. Smith-White, D. Ako-Adjei, et al. 2016. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 44:D733–D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Patro, R., G. Duggal, M.I. Love, R.A. Irizarry, and C. Kingsford. 2017. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods.* 14:417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>

- Pezic, D., S.A. Manakov, R. Sachidanandam, and A.A. Aravin. 2014. piRNA pathway targets active LINE1 elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells. *Genes Dev.* 28:1410-1428. <https://doi.org/10.1101/gad.240895.114>
- Pietras, E.M., D. Reynaud, Y.-A. Kang, D. Carlin, F.J. Calero-Nieto, A.D. Leavitt, J.M. Stuart, B. Göttgens, and E. Passequé. 2015. Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. *Cell Stem Cell.* 17: 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>
- Ramírez, F., D.P. Ryan, B. Grüning, V. Bhardwaj, F. Kilpert, A.S. Richter, S. Heyne, F. Dündar, and T. Manke. 2016. deepTools2: A next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 44: W160-W165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>
- Rodriguez-Fraticelli, A.E., C. Weinreb, S.W. Wang, R.P. Migueles, M. Jankovic, M. Usart, A.M. Klein, S. Lowell, and F.D. Camargo. 2020. Single-cell lineage tracing unveils a role for TCF15 in haematopoiesis. *Nature.* 583:585-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2503-6>
- Ross-Innes, C.S., R. Stark, A.E. Teschendorff, K.A. Holmes, H.R. Ali, M.J. Dunning, G.D. Brown, O. Gojis, I.O. Ellis, A.R. Green, et al. 2012. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature.* 481:389-393. <https://doi.org/10.1038/nature10730>
- Saint-André, V., E. Batsché, C. Rachez, and C. Muchardt. 2011. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HPIγ favor inclusion of alternative exons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:337-344. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1995>
- Sanjuan-Pla, A., I.C. Macaulay, C.T. Jensen, P.S. Woll, T.C. Luis, A. Mead, S. Moore, C. Carella, S. Matsuo, T. Bouriez Jones, et al. 2013. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature.* 502:232-236. <https://doi.org/10.1038/nature12495>
- Schaefer, B.C., M.L. Schaefer, J.W. Kappler, P. Marrack, and R.M. Kedl. 2001. Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/dendritic cell interactions in vivo. *Cell Immunol.* 214:110-122. <https://doi.org/10.1006/cimm.2001.1895>
- Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice. 2014. Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32:513-545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schreiber, J., R.G. Jenner, H.L. Murray, G.K. Gerber, D.K. Gifford, and R.A. Young. 2006. Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:5899-5904. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510996103>
- Siebert, M., and J. Söding. 2016. Bayesian markov models consistently outperform PWMs at predicting motifs in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 44:6055-6069. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw521>
- Soneson, C., M.I. Love, and M.D. Robinson. 2015. Differential analyses for RNA-seq: Transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res.* 4:1521. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7563.2>
- Sookdeo, A., C.M. Hepp, M.A. McClure, and S. Boissinot. 2013. Revisiting the evolution of mouse LINE-1 in the genomic era. *Mob. DNA.* 4:3. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-4-3>
- Stein, S.J., and A.S. Baldwin. 2013. Deletion of the NF-κB subunit p65/RelA in the hematopoietic compartment leads to defects in hematopoietic stem cell function. *Blood.* 121:5015-5024. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-486142>
- Su, A.L., M.P. Cooke, K.A. Ching, Y. Hakak, J.R. Walker, T. Wiltshire, A.P. Orth, R.G. Vega, L.M. Sapinoso, A. Moqrich, et al. 2002. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:4465-4470. <https://doi.org/10.1073/pnas.012025199>
- Sun, D., M. Luo, M. Jeong, B. Rodriguez, Z. Xia, R. Hannah, H. Wang, T. Le, K.F. Faull, R. Chen, et al. 2014. Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell.* 14:673-688. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.03.002>
- Sun, X., X. Wang, Z. Tang, M. Grivainis, D. Kahler, C. Yun, P. Mita, D. Fenyő, and J.D. Boeke. 2018. Transcription factor profiling reveals molecular choreography and key regulators of human retrotransposon expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115:E5526-E5535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722565115>
- Sundaram, V., and T. Wang. 2018. Transposable element mediated innovation in gene regulatory landscapes of cells: Re-visiting the "Gene-Battery" model. *Bioessays.* 40. <https://doi.org/10.1002/bies.201700155>
- Teissandier, A., N. Servant, E. Barillot, and D. Bourc'his. 2019. Tools and best practices for retrotransposon analysis using high-throughput sequencing data. *Mob. DNA.* 10:52. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0192-1>
- Trizzino, M., A. Kapusta, and C.D. Brown. 2018. Transposable elements generate regulatory novelty in a tissue-specific fashion. *BMC Genom.* 19: 468. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4850-3>
- Tsurumi, A., and W.X. Li. 2012. Global heterochromatin loss: A unifying theory of aging?. *Epigenetics.* 7:680-688. <https://doi.org/10.4161/epi.20540>
- Vakoc, C.R., S.A. Mandat, B.A. Olenchok, and G.A. Blobel. 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HPIγ are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell.* 19:381-391. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.011>
- Volkman, H.E., and D.B. Stetson. 2014. The enemy within: Endogenous retroelements and autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 15:415-422. <https://doi.org/10.1038/ni.2872>
- Walter, M., A. Teissandier, R. Pérez-Palacios, and D. Bourc'his. 2016. An epigenetic switch ensures transposon repression upon dynamic loss of DNA methylation in embryonic stem cells. *Elife.* 5:e11418. <https://doi.org/10.7554/eLife.11418>
- Wang, K., H. Li, Y. Xu, Q. Shao, J. Yi, R. Wang, W. Cai, X. Hang, C. Zhang, H. Cai, and W. Qu. 2019. MFEprimer-3.0: Quality control for PCR primers. *Nucleic Acids Res.* 47:W610-W613. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz351>
- Whitaker, J.W., Z. Chen, and W. Wang. 2015. Predicting the human epigenome from DNA motifs. *Nat. Methods.* 12:265-272. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3065>
- White, R.R., and J. Vijg. 2016. Do DNA double-strand breaks drive aging?. *Mol. Cell.* 63:729-738. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.004>
- Wingett, S.W., and S. Andrews. 2018. FastQ screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res.* 7:1338. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>
- Yamashita, M., and E. Passequé. 2019. TNF-α Coordinates hematopoietic stem cell survival and myeloid regeneration. *Cell Stem Cell.* 25:357-372.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.019>
- Ye, M., C. Goudot, T. Hoyle, B. Lemoine, S. Amigorena, and E. Zueva. 2020. Specific subfamilies of transposable elements contribute to different domains of T lymphocyte enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 117: 7905-7916. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912008117>
- Yu, Q., C.J. Carbone, Y.V. Kadinskaya, H. Zheng, K. Zheng, M. Luo, P.J. Wang, R.A. Greenberg, and S.Y. Fuchs. 2015. Type I interferon controls propagation of long interspersed element-1. *J. Biol. Chem.* 290: 10191-10199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612374>
- Zhang, Y., T. Liu, C.A. Meyer, J. Eeckhoutte, D.S. Johnson, B.E. Bernstein, C. Nusbaum, R.M. Myers, M. Brown, W. Li, and X.S. Liu. 2008. Model-based analysis of ChIP-seq (MACS). *Genome biology.* 9:R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>

Supplemental material

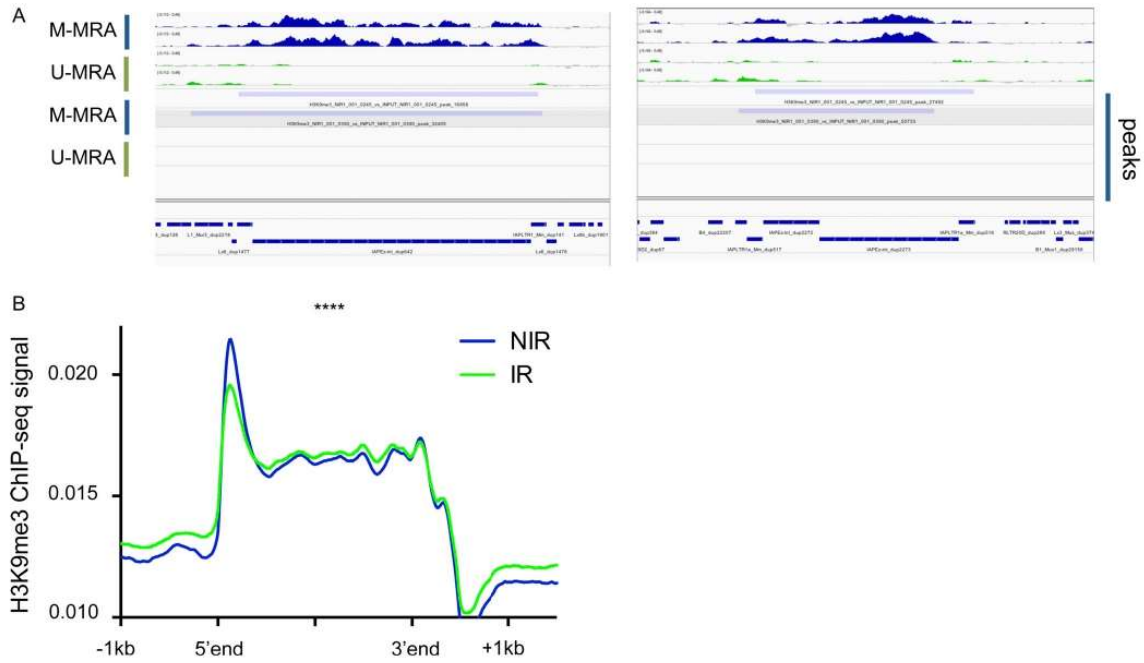


Figure S1. **H3K9me3 is lost at recent L1Md subfamilies in HSC.** (A) Integrative genomic viewer visualization of H3K9me3 enrichment and peaks at two described loci with M-MRA or U-MRA analysis, as indicated: (left) chr2:39209585-39320316; (right) chr6:5271421-5288640 (Bulut-Karslioglu et al, 2014). (B) Plot profile representing H3K9me3 enrichment along L1Md sequences ± 1 kb flanking regions in NIR (blue) vs. IR (green) conditions. ****, $P < 0.0001$, Wilcoxon test.

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/129/8/e20211356/1435569/jem_20211356.pdf by INSERM user on 30 August 2022

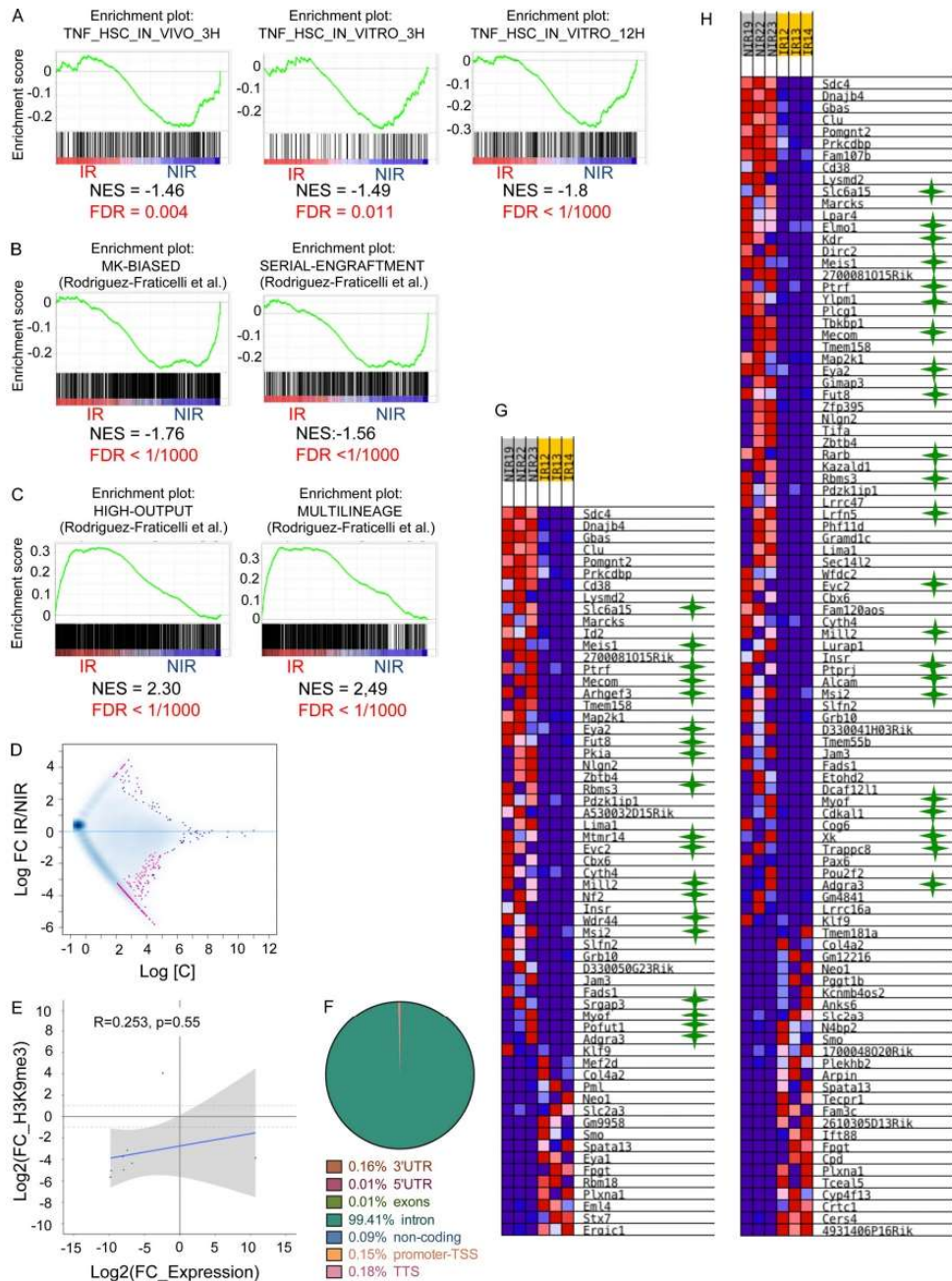


Figure S2. **Gene repression upon IR is associated with intronic L1Md.** (A-C) Enrichment plots in IR vs. NIR conditions obtained from GSEA for TNF signatures induced in HSCs after TNF- α treatment 3 h in vivo and 3 and 12 h in vitro (A); MK-biased and serial engraftment HSC signatures (B); high output and multilineage differentiation signatures (C). (D) Quantitative analysis of H3K9me3 enrichment at promoters (-2 kb;+1 kb TSS) performed by U-MRA. Non-significant (blue dots) and significant ($P < 0.05$, pink dots) differential H3K9me3 enrichment at genes promoters are shown. (E) Correlation plot between H3K9me3 concentration at gene promoters vs. gene expression at genes presenting both significant deregulation and differential H3K9me3 enrichment at their promoters upon IR ($P < 0.05$). (F) Repartition of intragenic L1Md localization in the genes. TTS, transcriptional termination site. (G and H) Heatmaps of the expression of genes from MK-biased (G) and the low-output (H) HSC signatures that are significantly either upregulated (red) or downregulated (blue) in IR vs. NIR. Green stars indicate the presence of an intronic L1Md in the downregulated genes. FC, fold change; FDR, false discovery rate; NES, normalized enrichment score.

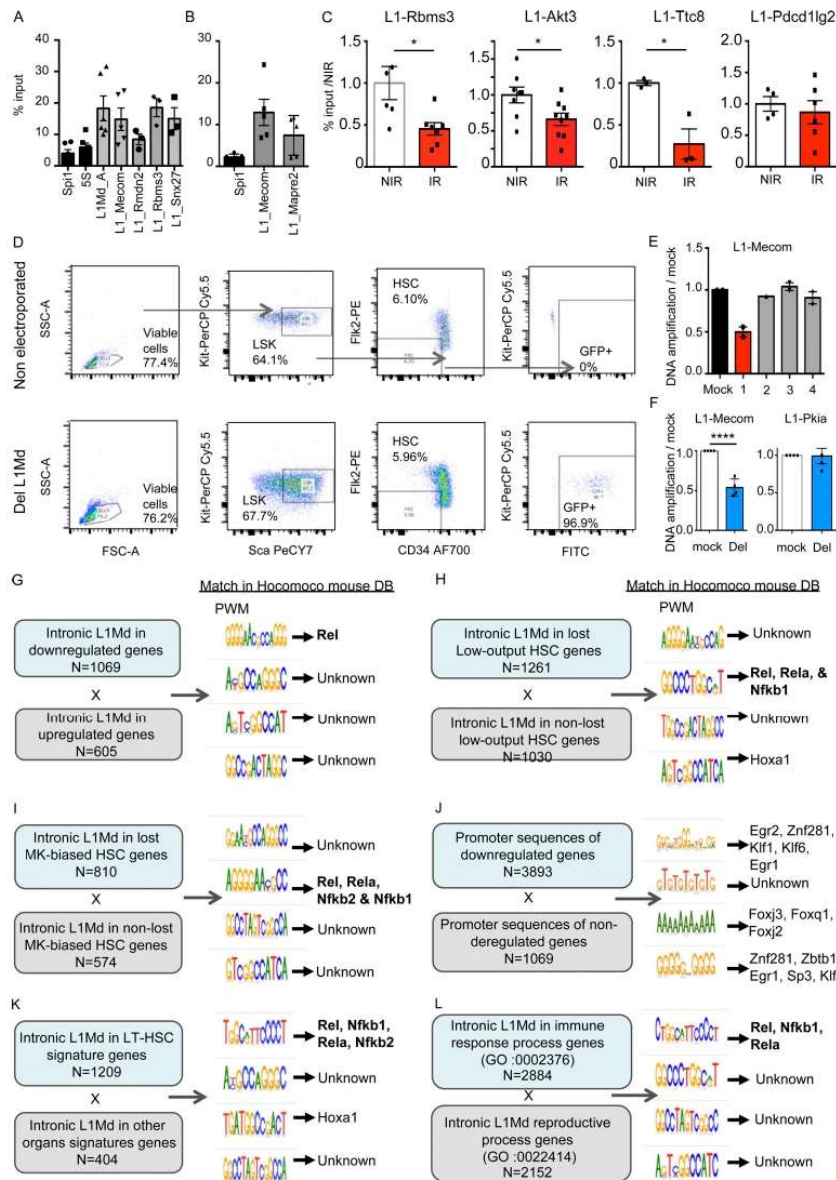


Figure S3. Gene repression upon IR is associated with the loss of H3K9me3 at intronic LIMd loci harboring NF-κB binding sites. (A and B) H3K9me3 enrichment in the NIR conditions evaluated by ChIP-qPCR at long (>5 kb) intronic LIMd promoters of the indicated genes compared to *Spi1* (A and B), and at L1_A promoter compared to repetitive 5S ribosomal RNA (A). Results are expressed as the means ± SEM of the percentage of input. Each dot represents a pool of three mice from two to four independent experiments. (C) H3K9me3 ChIP-qPCR enrichment 1 mo after TBI. Each dot represents a pool of three (NIR) or four (IR) mice from two to three independent experiments. Results are means ± SEM of the percentage of input normalized to the NIR condition. *t* test. (D) Gating strategy for electroporated siglo+ HSCs in del LIMd condition using nonelectroporated cells as a control for designing FITC gate. (E) To test the efficiency of the different combinations of gRNAs, DNA amplification of *Mecom* LIMd was assessed and normalized to the amplification of *Snx27* LIMd by qRT-PCR. In red, the couple of guides that were selected for further analysis. (F) DNA amplification assessed by qRT-PCR and in Cas9-gRNA RNP electroporated HSCs 48 h after irradiation in vitro. Ct values were normalized to L1-Snx27. *t* test. (G-L) De novo motif discovery analysis performed with the BaMMmotif tool on LIMd sequences located in: introns of downregulated genes vs. upregulated genes (G); genes participating vs. not participating to the loss of the low-output or MK-biased HSC signatures (H and I); promoter sequences (−2 kb; +1 kb TSS) from downregulated vs. nonderegulated genes (J); LIMd located in genes from the HSC signature vs. genes from other organs signatures (kidney + liver + pancreas + testis + salivary gland + placenta) from Su et al. (2002) (K). (L) LIMd located in genes from the Gene Ontology (GO) term immune response process (GO:0002376) vs. genes from the GO term reproductive process (GO: 0022414). Enriched motifs were matched to known motifs using the Hocomoco mouse database. *, *P* < 0.05; ****, *P* < 0.0001.

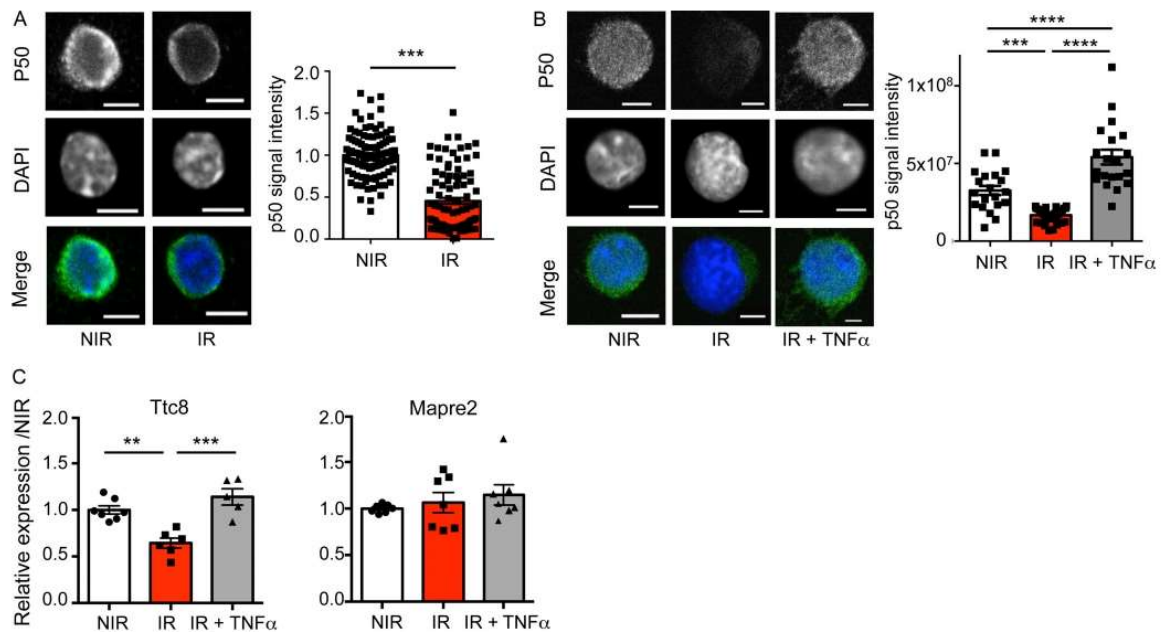


Figure S4. **TNF- α treatment prevents loss of NFKB1 and HSC gene repression in vitro.** **(A and B)** Representative images and quantification of NFKB1 protein mean IF intensity using the monoclonal anti-NFKB1 (p50) antibody clone from Santa Cruz Biotechnology. Bars, 5 μ M. Each dot represents a cell. Results are expressed as fold change from the mean value of the NIR condition from two independent experiments and represented as means \pm SEM. *t* test for A or one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for B. **(C)** *Ttc8* and *Mapre2* mRNA expression evaluated by qRT-PCR. Ct values were normalized to *Rpl32* and *Hprt*. Results are expressed as fold change from the mean value of the NIR condition and represented as means \pm SEM from two independent experiments. One-way ANOVA Tukey's multiple comparison test. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

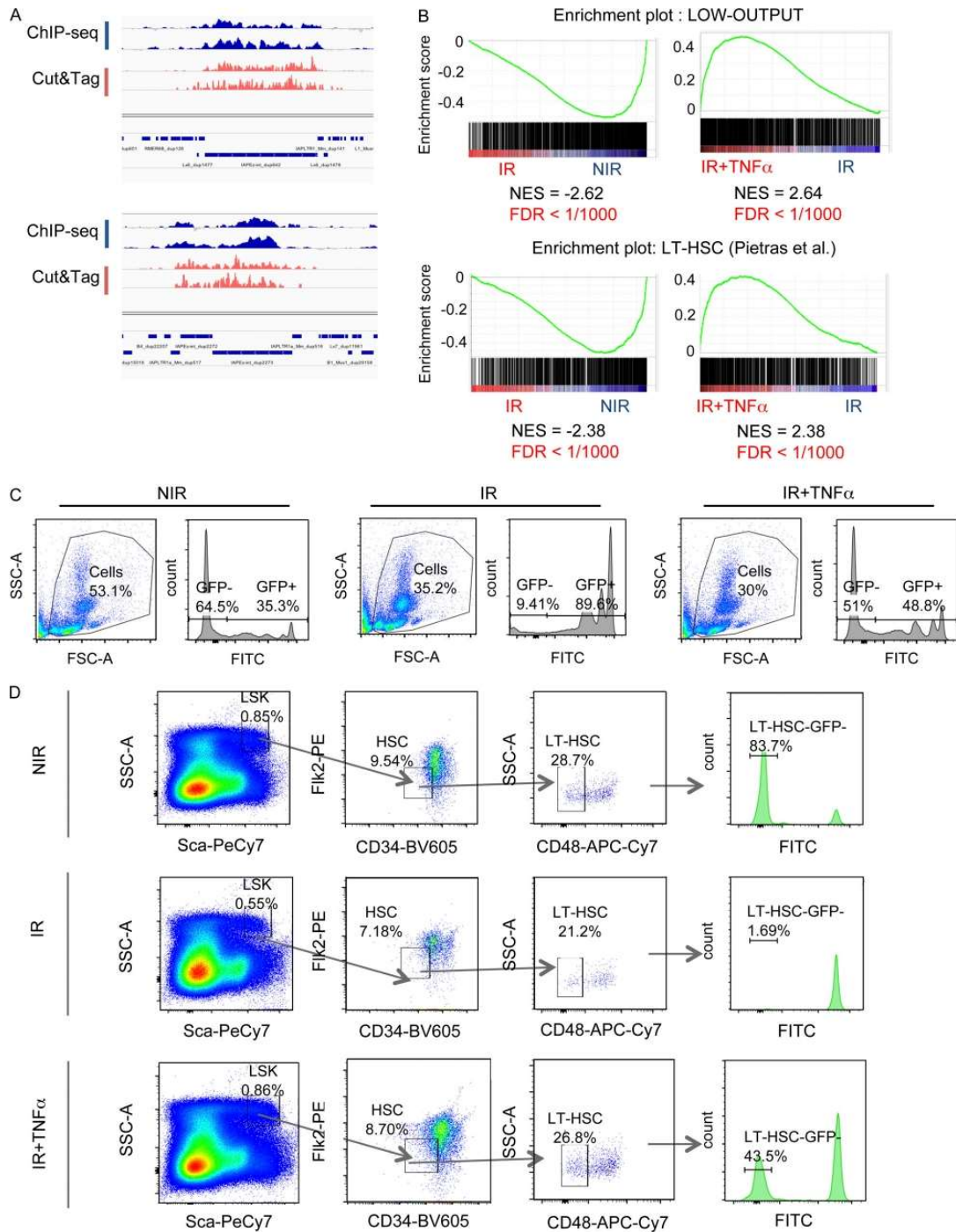


Figure S5. **TNF- α treatment prevents loss of H3H9me3 at intronic LIMd, HSC gene repression, and HSC loss of function upon IR.** (A) Integrative genomic viewer visualization of H3K9me3 enrichment obtained by ChIP-seq and CUT&Tag M-MRA analysis at two described loci as indicated: (left) chr2:39209585-39320316; (right) chr6:5271421-5288640 (Bulut-Karslioglu et al 2014). (B) Enrichment plots in IR vs. NIR and in IR + TNF- α vs. IR conditions obtained from GSEA for low-output and LT-HSC signatures. (C and D) Gating strategy to evaluate donor-derived GFP⁻ vs. recipient GFP⁺ cells in peripheral blood (C) and bone marrow HSCs (D). FDR, false discovery rate; NES, normalized enrichment score.

Provided online are four tables. Table S1 shows quality control of the reads and peak calling data for the ChIP-seq analysis, Table S2 shows information on differentially expressed genes upon IR for RNA-seq analysis, Table S3 gives information on intragenic L1Md, and Table S4 lists primers and gRNAs used for the study.

Downloaded from http://upress.org/jem/article-pdf/219/8/e20211356/1435559/jem_20211356.pdf by INSEERM user on 30 August 2022

Partie 2 : Article en preparation

Heterochromatin changes in HSCs from CMML patients confer sensitivity to the combination of G9A/GLP inhibitors and DNA hypomethylating agents via derepression of retroelement

Donia Hidaoui¹, Karima Naciri¹, Vincent Alcazer², Rabie Chelbi¹, Margot Morabito¹, Nathalie Droin¹, Aline Reneville¹, Stephane Depil², Emilie Elvira-Matelot¹, Eric Solary¹ and Françoise Porteu¹

- (1) INSERM U1287, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France,
- (2) Department TERI, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

Résumé :

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une maladie clonale de la cellule souche hématopoïétique (CSH) qui touche les personnes âgées. L'hétérochromatine, caractérisée par la méthylation de l'ADN et les marques H3K9me3, H3K9me2 et H3K27me3, est impliquée dans la répression des gènes et des rétroéléments (RE). Les RE jouent un rôle dans le développement des tumeurs en induisant une instabilité génomique et en modulant l'expression des gènes mais ils peuvent aussi être leur talon d'Achille. En effet, la production massive de REs déclenche un état de " mimétisme viral" conduisant à l'induction d'une réponse interféron (IFN) et fournit des antigènes immunogènes associés à la tumeur. Les agents hypométhylants de l'ADN (HMA) sont efficaces chez environ 40% des patients atteints de LMMC. Cependant, la réponse est toujours transitoire, masquant temporairement le phénotype des CSH malignes sans les éradiquer.

L'objectif est de tester l'hypothèse selon laquelle les CSH de la LMMC pourraient présenter des altérations de l'hétérochromatine qui limitent l'expression de RE, leur permettant d'échapper au système immunitaire et conduisant à une résistance aux HMA.

Nous avons observé que les CSH et progéniteurs (CSPH, CD34⁺) de patients atteints de LMMC ont un remaniement de l'hétérochromatine, caractérisée par une hausse de H3K9me2 et de G9A/GLP, les enzymes responsables du dépôt de cette marque et une baisse de H3K9me3 en comparaison à des sujets sains de même âge. Nous avons montré une ouverture de la chromatine au niveau des éléments répétées non transposables dans les CSPH de patients LMMC, pouvant être expliquée par la baisse de H3K9me3. De plus les séquences répétées transposables ont été très peu accessibles dans les CSPH de patients LMMC ; ce qui pourrait être due à la hausse de H3K9me2 qui compenserait en partie la perte de H3K9me3 au niveau de ces séquences.

Le traitement par la combinaison HMA et inhibiteurs de H3K9 di-méthyltransférase a induit une ouverture de la chromatine et une augmentation de l'expression des RE, en particulier des ERV. Des études fonctionnelles ont mis en évidence que le double traitement entraîne une réduction de la clonogénicité, de la survie et de la prolifération des CSH (CD34⁺CD38⁻CD90⁺) et des progéniteurs (CD34⁺CD38⁻CD90⁻) des patients LMMC tandis que le traitement HMA seul cible davantage les progéniteurs. Ces traitements n'ont eu aucun effet sur les cellules saines âgées. L'étude des mutations présentes dans les colonies formées à partir de CSPH qui n'ont pas été éliminés par les traitements après 14 jours de culture a montré que le double traitement a réduit, voire éradiqué les clones de LMMC mutés *in vitro*. Nous avons mis en évidence que la combinaison a généré une surproduction d'ARN-db et une activation de la signalisation IFN-I, caractérisée par une hausse du niveau de IRF3, IRF7, STAT1 et de sa forme phosphorylée pSTAT1. Le blocage du récepteur à l'IFN-I a restauré la capacité clonogénique des CSPH de patients LMMC en présence du double traitement, prouvant l'implication de la réponse antivirale et de l'IFN produit par les cellules tumorales dans l'efficacité du traitement.

De même, les CSH de souris *Tet2*^{-/-} qui développent une maladie semblable à la LMMC avec l'âge ont présenté des niveaux accrus de H3K9me2 par rapport aux CSH de type sauvage et aux CSH *Tet2*^{-/-} jeunes et une sensibilité sélective à la combinaison *in vitro* et *in vivo*.

En conclusion, nos résultats ont démontré que le ciblage de H3K9me2 a amélioré l'efficacité des HMA via l'induction des ERV, de l'IFN et d'une réponse immunitaire innée, ce qui laisse espérer de nouveaux traitements pour cette maladie handicapante et difficile à traiter.

Matériel et méthodes (partie 2)

Collecte des échantillons de donneurs sains et de patients

L'étude a été réalisée sur des patients ayant reçu un diagnostic de LMMC selon les critères de l'OMS et n'ayant pas encore eu de traitement (en inclusion) [Tableau S1]. Les échantillons de patients ont été obtenus dans le cadre d'un bilan médullaire de la maladie effectuée dans un service d'hématologie rattaché au Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM). La LMMC étant une pathologie du sujet âgé (âge médian 72 ans), des donneurs sains de même âge ont été utilisés comme contrôle [Tableau S1]. Ces échantillons contrôles ont été obtenus à partir de têtes fémorales provenant d'individus ayant subi une intervention chirurgicale dans le but de traiter une arthrose mécanique grâce à la collaboration avec Dr Juliette RAFFIN (Banque de tissus osseux, Hôpital Cochin). Les échantillons ont été collectés de manière séquentielle et directement utilisés à leur arrivée. Le consentement éclairé de tous les donneurs a été obtenu et en accord avec la déclaration d'Helsinki.

Isolement, stockage et mise en culture des CSPHs humaines

Les échantillons de patients ont été collectés par ponction médullaire avec aspiration sur EDTA. Les cellules de la moelle osseuse des sujets sains âgés ont été obtenues en réalisant un flush de solution saline (PBS 1X, *Gibco*) au sein de la tête fémorale. Après avoir effectué un lavage avec du PBS 1X, les cellules ont été mises en suspension dans du PBS 1X et filtrées (70 µM). Les CSPH ont été obtenues à partir de cellules mononuclées médullaires triées sur un gradient de Ficoll (*PanColl, PAN-Biotech*) et isolées par un tri cellulaire magnétique positif réalisé sur l'expression du marqueur CD34 en suivant les instructions du fabricant (*CD34 MicroBead Kit, AutoMACS Pro Separator, Miltenyi Biotec*). L'évaluation de l'enrichissement et le tri cellulaire des CD34⁺, CD34⁺CD38^{-/+}, CD34⁺CD38⁻CD90^{-/+} a été effectuée par le cytomètre analyseur-trieur Influx, ARIA II ou ARIA Fusion (*BD*).

Immédiatement après isolation, les cellules CD34⁺ ont été congelées sous forme de culots secs ou dans du trizol afin d'extraire ultérieurement, protéines et ARN, respectivement. Les cellules ont été également fixées et cytopspinées sur lame pour être utilisées dans des expériences d'immunofluorescence.

Les cellules CD34⁺, CD34⁺CD38^{-/+}, CD34⁺CD38⁻CD90^{-/+} ont été mises en culture liquide à 200 000 cellules/ml ou à l'échelle unicellulaire dans un milieu IMDM (*Gibco*) complété avec 25% de BIT9500 (*StemCell Technologies*), 1% de pénicilline/streptomycine (P/S), contenant les cytokines suivantes : FTL3-L (*FTL3-Ligand* ; 100ng/µL), TPO (*thrombopoietin* ; 100ng/µL), SCF (*stem cell factor* ; 60ng/µL) et IL3

(*interleukin 3* ; 10ng/μL), à 37°C, 20% O₂, 5% CO₂. Toutes les cytokines proviennent de *Miltenyi Biotec*. Le nombre de cellules a été évalué à différents temps de culture.

CD34⁺ (300 cellules/puit), 100 CD34⁺CD38^{-/+} (100 cellules/puit), CD34⁺CD38⁻CD90^{-/+} (100 cellules/puit), ont été également mises en culture en duplicat en méthylcellulose H4230 (*StemCell*), supplémentée avec 1% de P/S (*ThermoFischer Scientific*), FLT3-L (25ng/μL), TPO (25ng/μL), SCF (60ng/μL), IL3 (10ng/mL), EPO (2 unités), GM-CSF (10ng/mL) dans une plaque 24 puits. Les colonies ont été comptées après 14 jours de culture, récoltées dans du PBS, puis remises en culture en méthylcellulose à 5000 cellules/puit dans une plaque 24 puits. Ce processus a été répété au total deux fois.

Modèle de souris

Toutes les souris ont été hébergées dans un environnement exempt d'agents pathogènes avec une température ambiante (21 ± 1°C) et un taux d'humidité (20-70%), un accès libre à l'eau et à la nourriture, conformément aux lois françaises. Toutes les procédures ont été examinées et approuvées par le Comité de protection des animaux (2022 011 35147).

Les souris utilisées ont été des souris C57Bl/6 de type sauvage (WT) ou présentant une délétion homozygote constitutionnelle de *Tet2* (souris *Tet2*^{-/-}) (Quivoron et al. 2011). Deux tranches d'âges ont été étudiées : les souris jeunes de 2 mois et les souris âgées de 8-10 mois.

Mise en culture des CSPH murines

La moelle osseuse a été récupérée à partir des os iliaques, tibias et fémurs. La déplétion de la moelle osseuse en cellules hématopoïétiques matures a été effectuée en utilisant le kit *mouse hematopoietic progenitor (stem) cell enrichment set (BD)*. Les cellules Lin⁻ ont été isolées par un tri magnétique et conservées pendant une nuit à 4°C dans un milieu IMDM complété par 10% de sérum de veau foetal (SVF, *HyClone*) et 1% P/S. Le marquage des cellules Lin⁻ a été effectuée avec les anticorps cités dans le tableau 1 pendant 20 min à température ambiante.

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Référence (BD)
CD3ε (Lin)	APC	145-2C11	553066
TER-119 (Lin)	APC	Ter-119	557909
CD45R/B220 (Lin)	APC	RA3-6B2	553092
Ly6G-6C (Lin)	APC	RB6-8C5	553129
Ly-6A/E (Sca-1)	PeCy7	d7	558162

CD117 (c-Kit)	PE	2B8	553355
CD34	FITC	RAM34	560238
CD135 (Flk2)	BV421	A2F10.1	562898

Tableau 1. Marquage des cellules Lin⁻ murines

Les cellules Lin⁻ et Lin⁻Sca⁺Kit⁺ (LSK ou CSPH) ont été mises en culture liquide dans du Stem Span (SFEM, StemCell) complété de 1% P/S, FLT3-L (100ng/ml), IL-3 (10ng/ml), IL-6 (10ng/ml), SCF (100ng/ml), TPO (50ng/mL).

Elles ont été également mises en culture dans la méthylcellulose contenant des cytokines (GF M3434, *StemCell*). Les colonies ont été comptées après 7 jours de culture, récoltées dans du PBS, puis remises en culture en méthylcellulose en duplicat à 5000 cellules/puit dans une plaque de 24 puits.

Traitements avec les inhibiteurs

Pour les cultures *in vitro*, les cellules humaines CD34⁺, CD34⁺CD38^{-/+}, CD34⁺CD38⁻CD90^{-/+} et murines Lin⁻ ou LSK sont mises en culture pendant deux jours en présence ou absence d'un agent hypométhylant (HMA) (la décitabine DAC à 10 nM, ou bien la 5-Azacytidine à 500 nM). Puis elles sont incubées en présence ou absence d'un inhibiteur des enzymes G9A/GLP (UNC0638 à 1 μM ou bien UNC0642 à 2 nM) (Vedadi et al. 2011; F. Liu et al. 2013) [Figure 1]. En parallèle, d'autres cellules sont traitées ou non au premier jour et 48h après avec le CM-272 (200 nM), un inhibiteur double action (des DNMTs et de G9A/GLP). Une évaluation du pourcentage des différentes populations LK (Lin⁻ Kit⁺, progéniteurs myéloïdes), LSK (Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺, CSH et progéniteurs multipotents), CSH (LSK CD34⁻ Flk2⁻) au sein des cellules vivantes a été effectuée par cytométrie en flux après 8 jours de culture liquide des cellules murines Lin⁻.

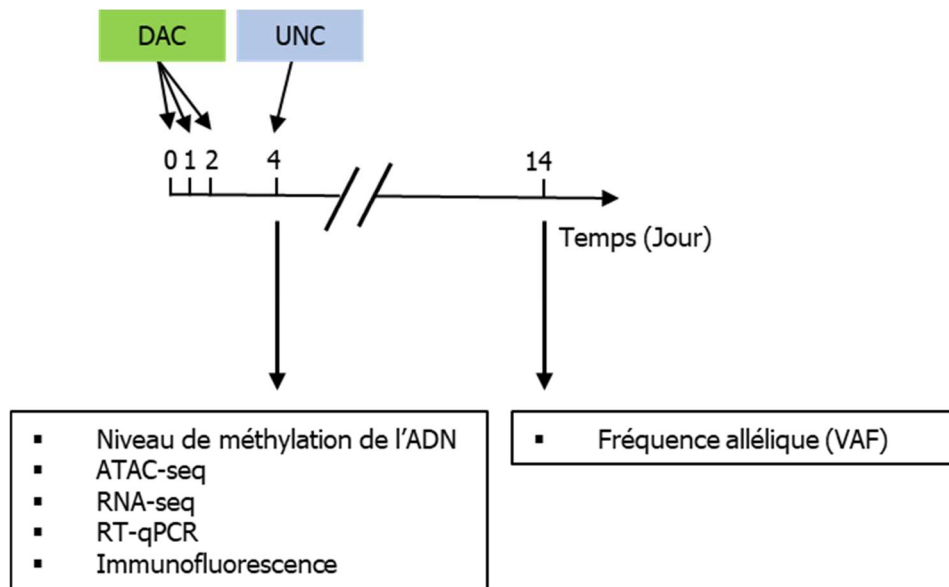


Figure 1. Prélèvements des cultures liquides de CD34⁺ de patients et/ou de sujets sains dans les différentes conditions de traitements (NT, UNC0638, DAC, DAC+UNC0638).

Les cellules CD34⁺ humaines de patients ont été incubées pendant 2 jours en présence ou absence de DAC (10nM), puis incubées en présence et en absence de l'UNC0638 (1µM) et gardées en milieu liquide pendant 14 jours pour effectuer des expériences de fréquence allélique (VAF). Des prélèvements de cellules ont été faits après 4 jours de cultures pour réaliser diverses expériences : de la quantification globale du niveau de méthylation de l'ADN, des ATAC-seq, des RNA-seq, des RT-qPCR et de l'immunofluorescence (ARN-db, IRF7, IRF3, phospho-STAT1).

Pour les traitements *in vivo*, les souris *Tet2*^{-/-} murines âgées de 8-10 mois sont traitées avec le diluant (5% DMSO, PBS) ou au CM-272 (2.5 mg/ kg) en intrapéritonéale, 3 fois par semaine, pendant 7 semaines. Des prélèvements sanguins et médullaires sont effectués une semaine après l'arrêt du traitement.

Détermination de la fréquence allélique dans les colonies (VAF, variant allele frequency)

La VAF a été analysée après traitement *in vitro* chez 4 patients présentant des mutations avec des VAF supérieures ou égales à 30%. Le séquençage complet de l'exome (*WES, whole exome sequencing*) a été réalisé sur les monocytes des patients au moment du prélèvement (Merlevede et al. 2016) [Tableau 2.].

Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
RUNX1 NM_001001890.2 exon 2 c.341C>T : p.Ser114Leu (61%)	TET2 NM_001127208.2 exon 9 c.4139A>G : p.His1380Arg (37%)	TET2 NM_001127208.2 exon 9 c.4140T>A : p.His1380Gln (44%)	KRAS c.G35A: p.G12D (30%)
TET2 NM_001127208.2 exon 8 c.4012A>T : p.Lys1338*, nonsense mutation, (54%)	TET2 NM_001127208.2 exon 3 c.2756dupA : p.Tyr919* (43%)		
	DNMT3A NM_022552.4 exon 8 c.1014+1delG : splice_donor_variant (34%)		

Tableau 2. Les mutations identifiées avec une VAF supérieure à 30% dans les monocytes de patients

Les cellules CD34⁺ de patients mises en culture à l'échelle unicellulaire pendant 14 jours en présence ou non de DAC et/ou de l'UNC0638 ont été conservées au -80°C en culots secs. Les colonies issues d'une cellule au départ ont été lysées avec une solution contenant de la protéinase K (0.1 mg/mL, *Fisher Scientific*), 2% Tween-20 (*Sigma*) et incubés pendant 1h à 65 °C suivi de 15 min à 95°C.

A partir des résultats de WES [Tableau 2], des amorces des régions mutées ont été générées afin de les amplifier dans les échantillons à tester et de déterminer si les traitements permettent de réduire la fréquence de la mutation [Tableau 3].

	Amorce sens	Amorce anti-sens
RUNX1-S114L (Patient 1)	CTATTGTTGGATCATATTCGTCC	GCATAGTTTTGACAGATAACG
TET2-K1338X (Patient 1)	CTAACTGATAGTCTCTTTTACATAGAG	GTAACAAGTAAGTTGTTACAATTGC
TET2-H1380R (Patient 2)	CAGATTGAATATGAACACAGAGC	CAGACTCAACAGCTGCTAAGC
TET2-Y919X (Patient 2)	CAGGAGCAGAAGTCACAACAAGC	GCAGCATGCTTTTGAGTGTCCCTC
DNMT3A c.1014+1 delG (Patient 2)	GCATTGTGTCTTGGTGGATG	CATCACCCCAATTCCAGACTG

TET2-H1380Q (Patient 3)	CAGATTGAATATGAACACAGAGC	CAGACTCAACAGCTGCTAAGC
KRAS-G12D (Patient 4)	GTGTGCATGTTCTAATATAGTC	CTATTGTTGGATCATATTCGTCC

Tableau 3. Liste des amorces utilisés pour étudier la VAF des patients

Il a été testé 8 à 12 clones par condition. L'amplification de la région à étudier a été effectuée par PCR en utilisant le kit *Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs)* et en suivant les recommandations du fabricant. La vérification de la production d'un amplicon de bonne taille a été effectuée en migrant l'échantillon d'ADN amplifiée sur un gel d'agarose à 1.8%. L'échantillon d'ADN amplifiée a été séquencé par Sanger chez *Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany)*.

Quantification globale de la méthylation de l'ADN :

La lyse cellulaire et l'extraction de l'ADN génomique des culots secs de cellules mises en culture pendant 4 jours en présence ou non de DAC et/ou d'UNC0638 ont été réalisées avec le kit *NucleoSpin Tissu XS (Macherey-Nagel)*. La qualité et la quantité d'ADN génomique a été mesurée par le nanoDrop (*ND-1000, Marshall Scientific*). La méthylation globale de l'ADN a été étudiée en utilisant le kit *global DNA methylation Assay – LINE-1 (Active Motif)*. Les ADN génomiques ont été digérés par l'enzyme *MseI* pour générer des fragments appropriés et s'hybrider à des séquences consensus de L1 humain biotinylées. Les fragments d'ADN hybridés ont été immobilisés sur une plaque de 96 puits. Les cytosines méthylées ont été identifiées en utilisant un anticorps primaire anti 5-mC, un anticorps secondaire conjuguée à la HRP et un réactif de détection colorimétrique. La lecture de l'absorbance de tous les échantillons testés en duplicats a été réalisée à 450 nM par le spectrophotomètre (*PerkinElmer*). En parallèle, une gamme étalon a été effectuée avec des fragments d'éléments L1 standards ayant 10 résidus CpG et dont le niveau de méthylation est connu (allant de 100 % lorsque tous les résidus sont méthylés à 0 % lorsqu'aucun des résidus est méthylé). Puis une courbe standard a été générée à partir de la gamme étalon permettant ainsi la quantification de la méthylation de l'ADN.

Purification des ARN et RT- PCR quantitative

50 000 - 150 000 cellules ont été lysées dans la solution Tri-Reagent (*Zymo Research*) et conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit *Direct-Zol RNA microprep (Zymo research)*. La qualité des ARNs a été mesurée sur une puce bioanalyzer pour vérifier l'absence d'ADN génomique contaminant (*Agilent*). Les ARN ont été rétro-transcrits avec le kit *EZ DNase VILO IV*

(Invitrogen). 1.25 µL d'ADNc a été pré-amplifié pour 15-18 cycles dans une réaction multiplex utilisant la solution Preamp Master-Mix (ref. 100-5580, Fluidigm) et le mélange des amorces (200 µM de chaque amorce). Les amorces qui ont été choisies se fixent sur des exons différents de façon à minimiser l'amplification d'ADN génomique [Tableau 4]. De plus, elles ont été analysées au préalable sur *MFE3.0 PCR Primer Quality Control* pour éliminer le risque de dimérisation des amorces ou la formation d'épingle à cheveux (K. Wang et al. 2019). La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée en utilisant du LUNA Universal qPCR Master Mix (*New England Biolabs*) sur la machine 7500 real-time PCR (*Applied Biosystems*). Les données ont été normalisées avec la moyenne d'expression des gènes de ménages (HPRT, Tubuline, Gus PPIA et/ou RPL32).

	Amorce sens	Amorce anti-sens
EHMT2	GGCCCCCTGAAATACAGCAT	TCGTCAGGGTCACTTCACCT
EHMT1	GTGTGAAAACCGAGCTGCTG	TCCTGCCTGTTTCTCTGCTG
SUV39H1	CCGCCTACTATGGCAACATCTC	CTTGTGGCAAAGAAAGCGATGCG
ERVL	ATATCCTGCCTGGATGGGGT	GAGCTTCTTAGTCCTCCTGTGT
ERVLB4	CAGTCAGCCTCTTCCCCAG	TGTTGCTGAGCCCATGCATA
MER4D0	TCCGGAGAGTCTGACACCTT	CCAGGTAGCAGGCTTCAGAG
ERVH	CCCTGTCCTCCTGCTCTTTG	TGGTGAGATGTTCTTGGGC
ALUYH9	CGCCTGTAATCCCAGCACTT	GCCAGGATGGTCTCGATCTC
IFNB1	AAACTCATGAGCAGTCTGCA	AGGAGATCTTCAGTTTCGGAGG
IRF7	CGAGACGAAACTCCCGTCC	GCTGCCTCGGTATGGATCTC
SPOP	TGAAGCCAGAGAGCGGTATGC	GATTGCTTCAGGCGTTTGCCTG
GUS	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA
HPRT	GGACAGGACTGAACGTCTTGC	CTTGAGCACACAGAGGGCTACA
TUBULINE	TCCAGATTGGCAATGCCTG	GGCCATCGGGCTGGAT
PPIA	GTCGACGGCGAGCCC	TCTTTGGGACCTTGTCTGCAA
RPL32	TGTCCTGAATGTGGTCACTG	CTGCAGTCTCCTTGCACACCT

Tableau 4. Listes des amorces utilisées pour les expériences de RT-qPCR

Immunofluorescence

5000 cellules CSHP humains et murins ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 10 min à température ambiante (RT) et centrifugées (*Tharmac*) sur des lames poly-L-Lysine (*Fisher Scientific*). L'immunofluorescence a été réalisée comme décrite précédemment (Pawlikowska et al. 2010). Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : G9A, GLP, IRF3, IRF7, J2 (ARN-db), H3K9me2, H3K9me3, SPOP1, STAT1, pSTAT1 (la forme phosphorylée de STAT1), SUV39H1 [Tableau 5]. La détection a été effectuée en utilisant l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa-Fluor 488 ou

l'anti-souris couplé à l'Alexa-Fluor-555 [Tableau 5]. Toutes les lames ont été visualisées au microscope confocal TCS SPE (*Leica*). Les images ont été analysées et les intensités de fluorescence calculées (dans au moins 50 cellules) avec le logiciel ImageJ.

Référence	Type anticorps	Anti	Hôte	Dilution	Fluorochrome
GTX129153 (<i>GeneTex</i>)	Primaire	G9A	Lapin	1/200	
HPA060022 (<i>Atlas antibody</i>)	Primaire	GLP	Lapin	1/200	
TA311894 (<i>Origen</i>)	Primaire	IRF3	Lapin	1/100	
HPA052757 (<i>Sigma-Aldrich</i>)	Primaire	IRF7	Lapin	1/200	
MABE1134-J2 (<i>Millipore</i>)	Primaire	ARN-db	Souris	1/150	
39239 (<i>Active Motif</i>)	Primaire	H3K9me2	Lapin	1/500	
8898 (<i>abcam</i>)	Primaire	H3K9me3	Lapin	1/1000	
16750-1-AP (<i>Proteintech</i>)	Primaire	SPOP1	Lapin	1/50	
14994 (<i>Cell Signaling</i>)	Primaire	STAT1	Lapin	1/400	
9167 (<i>Cell Signaling</i>)	Primaire	pSTAT1 (Tyr701)	Lapin	1/400	
8729 (<i>Cell Signaling</i>)	Primaire	SUV39H1	Lapin	1/200	
A11008 (<i>ThermoFisher Scientific</i>)	Secondaire	Lapin	Chèvre	1/600	AlexaFluor 488
A21425 (<i>ThermoFisher Scientific</i>)	Secondaire	Souris	Chèvre	1/600	AlexaFluor 555

Tableau 5. Les anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence.

Western-Blot

Les culots secs de 10 000 CSHP conservés à -80°C ont été resuspendus dans le tampon de lyse *Laemmli sample buffer* (ref. 1610747, bioRad®), et incubés à 95°C pendant 10 min. Les extraits protéiques dénaturés ont été séparés sur gel 15% de polyacrylamide-SDS et transférés sur une membrane de nitrocellulose (*ThermoFischer Scientific*). Les membranes ont été saturées en utilisant une solution de BSA 5%, 0.1% Tween-20 (*Sigma-Aldrich*) pendant 30 min sous agitation à température ambiante et incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires anti-H3, anti-H3K9me2 et anti-H3K9me3 [Tableau 6]. Puis elles ont été lavées dans du PBS-0.1% Tween-20, incubées en présence d'anticorps secondaires couplé à HRP durant 1h à RT, sur agitateur [Tableau 6]. Après 3 lavages successifs de 15 min en PBS 1X-Tween 0.1%, la membrane a été révélée par chimiluminescence à l'aide du réactif d'ECL (*Enhanced ChemiLuminescence, ThermoFischer Scientific™ SuperSignal™ West Pico*) et les images visualisées avec le système *iBright 1500 Western Blot imaging machine* (*Invitrogen*).

Référence	Type anticorps	Anti	Hôte	Dilution	Fluorochrome
18521 (<i>abcam</i>)	Primaire	H3	Lapin	1/5000	
39239 (<i>Active Motif</i>)	Primaire	H3K9me2	Lapin	1/2000	
8898 (<i>abcam</i>)	Primaire	H3K9me3	Lapin	1/2000	
31460 (<i>ThermoFisher Scientific</i>)	Secondaire	Lapin	Chèvre	1/2000	HRP

Tableau 6. Les anticorps utilisés pour les expériences de Western Blot

Analyses statistiques :

Les résultats ont été évalués statistiquement par des tests one-way ou two-way ANOVA ou un t-test en utilisant le logiciel *Prism GraphPad Prism™ version 8.0* (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA*). Les graphiques présentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM). $p < 0.05$ est considéré comme significatif. Pour toutes les figures, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$.

ATAC-seq

50 000 cellules CD34⁺ de contrôles et de patients fraîchement isolées ont été soumises à des étapes de lyses cellulaires, de transposition et de purification en utilisant le kit ATAC-seq (*Active Motif*), selon les recommandations du fabricant. Les fragments d'ADN transposés ont été amplifiés par PCR 10 fois en utilisant des adapteurs fournis par le kit. La purification de la PCR a été réalisée en utilisant MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, 28004) afin d'éliminer les amorces restantes et les grands fragments. La quantité et la qualité des librairies ont été évaluées par électrophorèse capillaire sur Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 50567-4626). Le séquençage des librairies a été effectué sur le NovaSeq-6000 à Gustave Roussy (Illumina ; 50 bp paired-end reads).

Analyse des données

La qualité des reads a été évaluée avec Fastqc v0.11.9 et MultiQC (1.10.1). Les reads ont été alignés sur le génome de référence hg19 (HRCh37) à l'aide de l'outil Bowtie2 v2.4.1 en appliquant les paramètres suivants : `--end-to-end --very-sensitive --no-mixed --no-discordant --phred33 -X 2000 -N 1`. Les duplicats de PCR sont retirés grâce à Picar v2.26.9 en suivant ces caractéristiques : `--remove_duplicates true --validation_stringency Lenient`. Le score de qualité des reads est fixé à 0 pour conserver tous les reads grâce à SAMtools v1.13 (`-q 0`). Les reads alignés ont été triés et indexés en utilisant également SAMtools v1.13. La couverture des reads (bigwig) a été générée à l'aide de deeptools v3.5.0 (`bs 5 --normalizeUsing BPM`). L'enrichissement des régions du génome a été effectué par la méthode du peak calling grâce à Macs2 v2.2.7.1 (`-g hs -f BAMPE`). Les analyses statistiques du signal d'ATAC-seq ont été réalisées avec le package R Rseeb 0.2.0 en utilisant comme entrée une matrice de score calculée par computeMarix (deepTool) et en représentant le profil de densité moyenne de toutes les conditions avec le SEM.

RNA-seq

Les librairies d'ADNc ont été synthétisées à partir de 250 pg d'ARN totaux extraits de cellules CD34⁺ cultivées pendant 4 jours *ex vivo* en présence ou en absence de DAC, d'UNC0638 ou les deux, en veillant à utiliser la même quantité d'ARN dans chaque condition pour un patient donné, en utilisant le kit SMARTer Stranded Total RNA-seq et selon les recommandations du fabricant (*Takara*). Le temps de fragmentation a été ajusté selon la qualité d'ARN totaux. La quantité et la qualité des librairies ont été évaluées sur Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 50567-4626). Les librairies

ont été regroupées et séquencées en (2 x 100bp) sur NovaSeq-6000 à Gustave Roussy (Illumina).

La qualité des reads a été évaluée avec Fastqc v0.11.8, Fastq-screen (Wingett et Andrews 2018) v0.13.0 et MultiQC (Ewels et al. 2016) v1.7.

Analyse des HERVs et des gènes

L'expression des HERV a été quantifiée en utilisant une approche basée sur les loci, comme décrit précédemment (Alcazer et al. 2022). En bref, les reads ont été alignées sur le transcriptome personnalisé constitué du transcriptome de référence hg38 avec 14 968 unités transcriptionnelles HERV compilées à partir des annotations RepeatMasker (Bendall et al. 2019) à l'aide de bowtie2 v2.2.1 (Langmead et Salzberg 2012) en utilisant des paramètres conservant les alignements multiples (-k 100 --very-sensitive-local --score-min "L,0,1.6"). Les sorties SAM ont été converties en fichiers BAM à l'aide de SAMtools v1.4 (H. Li et al. 2009). L'expression des HERV et des gènes a été ensuite quantifiée en utilisant respectivement Telescope (Bendall et al. 2019) et HTSeq 0.12.3 (Anders, Pyl, et Huber 2015). Les comptes bruts ont été concaténés et normalisés indépendamment pour chaque ensemble de données à l'aide de DESEQ2 v1.28.0 avec une transformation stabilisant la variance (VST) (Love, Huber, et Anders 2014).

Analyse d'expression différentielle

L'analyse de l'expression différentielle a été réalisée à l'aide de DESEQ2. Les comptes bruts des HERV et des gènes ont été fusionnés et intégrés dans le même objet DESEQ, en utilisant l'ID du patient et la condition comme co-variable dans la formule de conception pour tenir compte de l'appariement des données (conception = ~ patient_id + condition). Pour chaque comparaison, la condition non traitée (NT) a été considérée comme la référence. Les variations d'expression ont été réduits avec la méthode ASHR (Stephens 2017). Les ARN présentant un changement de $\log_2 > 0,58$ (FDR q-value < 0,05) ont été considérés comme significativement exprimés de manière différentielle.

Analyse gene set enrichment analysis (GSEA)

L'analyse GSEA a été réalisée à l'aide de Hallmark Gene Sets V7, GO biological processes V7 P, Reactome Gene sets V7. Les graphiques montrent des voies enrichies avec un FDR q-value < 0.05.

Analyse de la variation des ensembles de gènes

Les signatures de l'interféron (IFN) ont été extraites de la base de données Molecular Signatures Database (MSigDb) (Liberzon et al. 2015). Les scores d'enrichissement individuels ont été calculés pour chaque patient par l'analyse de la variation de l'ensemble de gènes d'un seul échantillon (ssGSVA) (Hänzelmann, Castelo, et Guinney 2013). Des regroupements hiérarchiques supervisés et non supervisés ont été ensuite effectués sur les scores ssGSVA mis à l'échelle à l'aide de l'outil R ComplexHeatmap (Zuguang Gu, Eils, et Schlesner 2016).

Tableau supplémentaire (S1) :

Paramètres	Cohorte	
	Sujet âgés sains (n=39)	Patients (n=72)
Sexe		
Femme	23 (58%)	37 (41%)
Homme	16 (42%)	52 (58%)
ND		
Age, médiane (gamme)	68 ans [45-91]	73 ans [39-90]
Type de CMML, n (%)		
LMMC-0	-	33 (46%)
LMMC-1	-	21 (29%)
LMMC-2	-	18 (25%)
Hémogramme		
Leucocytose, médiane en G/L [gamme]	-	14.3 [3.1-154]
Hémoglobine, médiane en g/dL [gamme]	-	11.8 [4.5-16.6]
Plaquettes, médiane en Gi/L [gamme]	-	112 [20-549]
Polynucléaires neutrophiles, médiane en Gi/L [gamme]	-	7 [0.65-47.4]
Monocyte, médiane en G/L [gamme]	-	2.5 [0.55-29.99]
Monocyte, médiane en % [gamme]	-	21 [10-38.6]
Myélogramme		
Blaste médullaire, médiane en % [gamme]	-	5 [1-19]
Profil mutationnel (réalisé dans les cellules CD14⁺)		
Patients sans analyse mutationnelle, n (%)	-	11 (12%)
AML1	-	8 (11%)
BRCC3	-	1 (1.4%)
CBL	-	8 (11%)
CSF3R	-	1 (1.4%)
CTCF	-	1 (1.4%)
CUX1	-	5 (7%)
DNMT3A	-	5 (7%)
ETNK1	-	1 (1.4%)
ETV6	-	2 (2.6%)
EZH2	-	4 (5.6%)
IDH1	-	2 (2.8%)
IDH2	-	2 (2.8%)
KDM6A	-	1 (1.4%)
KIT	-	1 (1.4%)
KRAS	-	8 (11.1%)
NRAS	-	10 (13.9%)
PHF6	-	2 (2.6%)
PTPN11	-	1 (1.4%)
RIT1	-	1 (1.4%)
SF3B1	-	7 (9.7%)
SRSF2	-	28 (38.9%)
TET2	-	45 (62.5%)
TP53	-	1 (1.4%)
U2AF35	-	1 (1.4%)
U2AZF1	-	1 (1.4%)
ZRSR2	-	1 (1.4%)

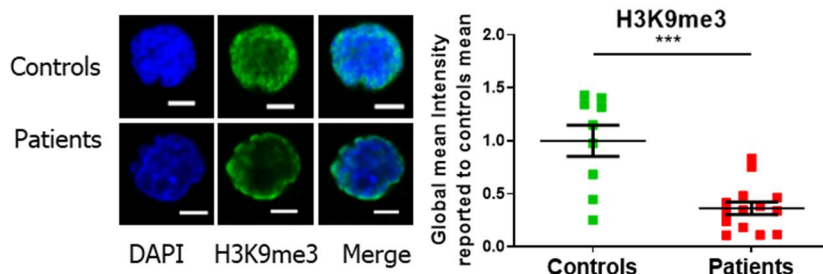
Tableau S1. Données des sujets âgés sains et patients.

Résultats (partie 2)

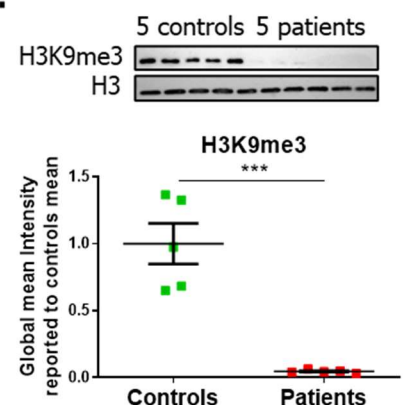
Les cellules CD34⁺ de patients atteints de LMMC ont un remaniement de l'hétérochromatine.

Avec le vieillissement, des changements dans la structure de la chromatine et notamment une perte globale de l'hétérochromatine, ont été décrits dans les CSH. Nous avons montré précédemment que l'expression de SUV39H1 dans les CSH diminue avec l'âge, conduisant à une réduction de H3K9me3 (Djeghloul et al. 2016). De même, nos résultats récents montrent que l'irradiation qui induit un vieillissement prématuré des CSH est associée à une perte de cette marque (Pelinski et al. 2022). La LMMC étant une pathologie liée à l'âge, nous avons émis l'hypothèse que les CSH de patients LMMC pourraient présenter un remodelage de l'hétérochromatine accentué par rapport à des contrôles d'âges similaires. Afin de tester cette hypothèse, des expériences d'immunofluorescence et de western blot des marques H3K9me2 et H3K9me3 ont été réalisées. Nous avons observé que le niveau global de H3K9me3 est significativement diminué dans les CD34⁺ des 14 patients testés par rapport aux CD34⁺ de 9 sujets sains (Fig. 1 A). Ce résultat est confirmé par western blot chez 5 autres patients et contrôles (Fig. 1 B). Bien que le niveau d'expression de *SUV39H1* dans les cellules CD34⁺ ne se soit pas avéré différent à l'échelle de l'ARNm (Fig. 1 C), il est diminué à l'échelle protéique dans les 5/8 patients (Fig. 1 D). A l'inverse, la marque H3K9me2 est significativement augmentée dans les CD34⁺ de 26/27 patients par rapport aux CD34⁺ de sujets sains (n=16) (Fig. 1 E). Cette hausse de H3K9me2 dans les cellules de patients est également confirmée par western blot chez 5 nouveaux patients et contrôles âgés (Fig. 1 F). Elle est corrélée à une augmentation de l'expression des enzymes H3K9 diméthyl-transférases, *G9A* (Fig. 1 G) et *GLP* (Fig. 1 H), notamment au niveau des protéines (Fig. 1 I-J).

A.



B.



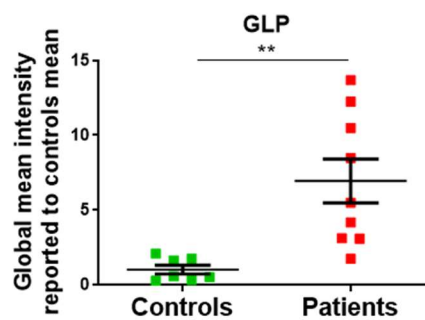
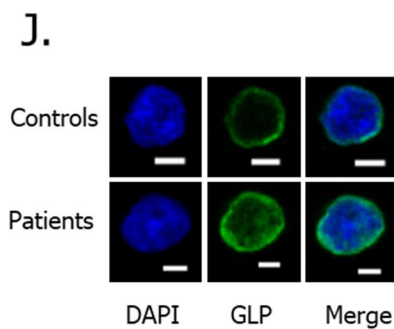
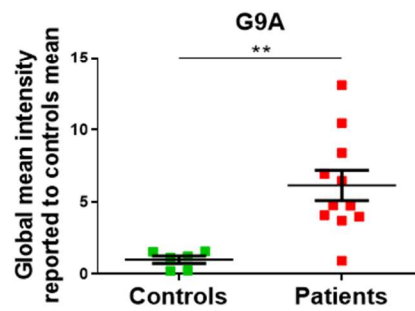
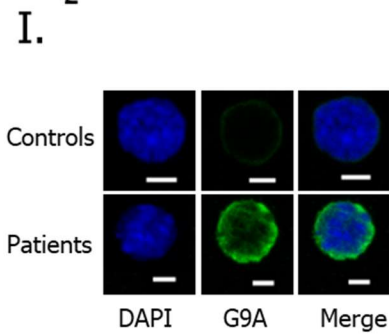
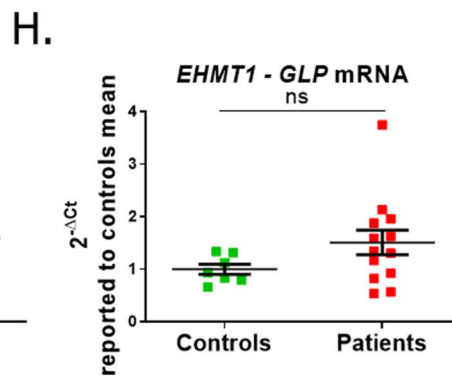
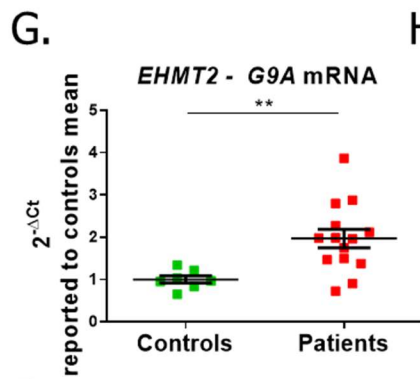
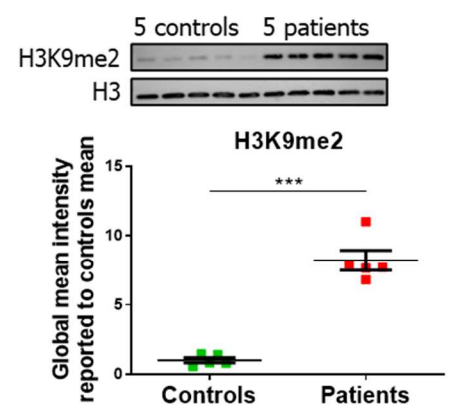
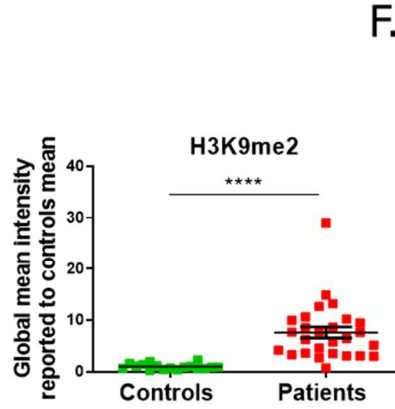
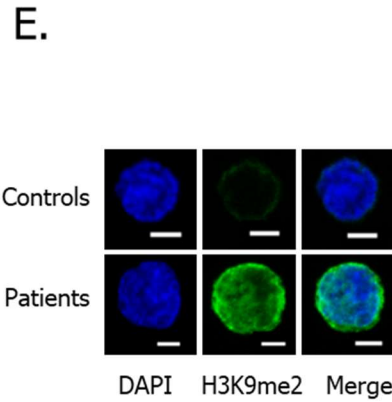
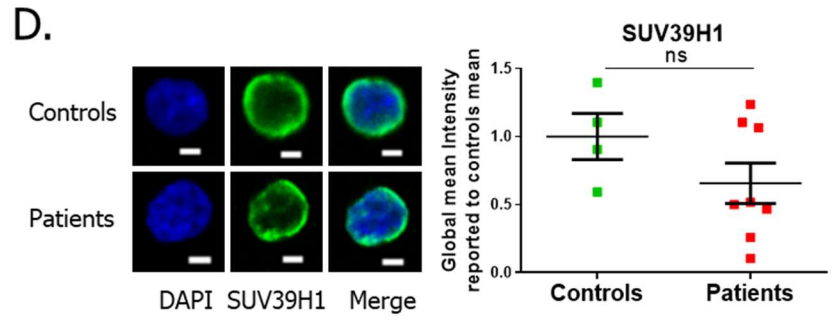
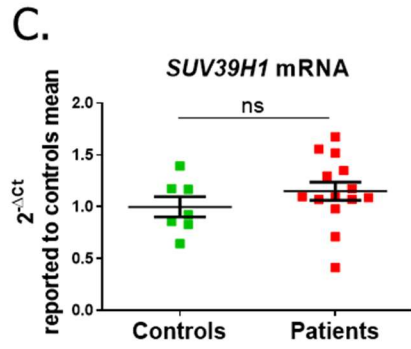


Figure 1. Etude des changements dans les marques de l'hétérochromatine dans les cellules CD34⁺ de patients LMMC.

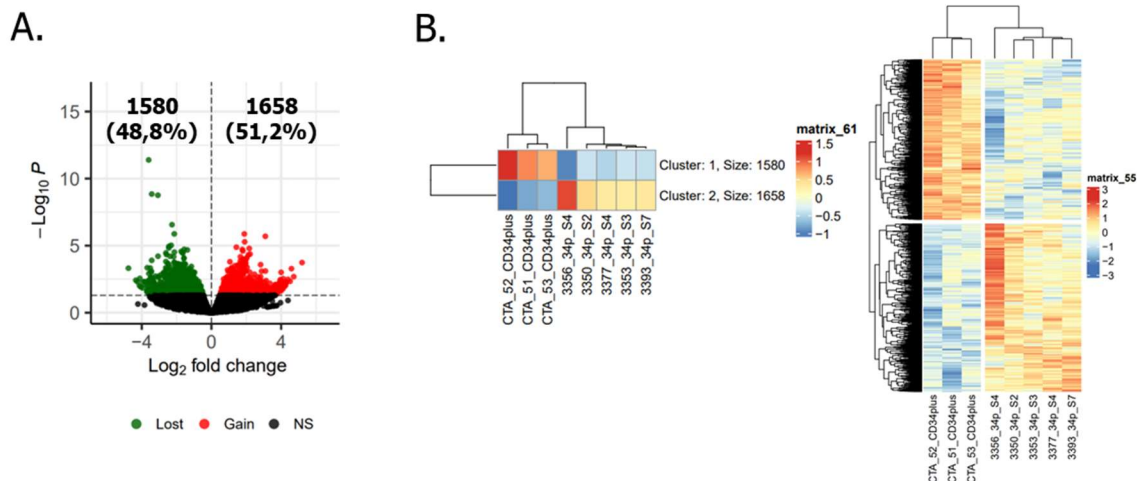
(A) Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence de H3K9me3 dans les cellules CD34⁺ (contrôles, n=9; patients, n=14) rapportée à la moyenne des sujets sains. Moyenne +/- SEM issues de 2 expériences indépendantes. (B) Représentation en images et quantification du Western-Blot de H3K9me3 dans les cellules CD34⁺(contrôles, n=5; patients, n=5). Chaque point des graphiques représente l'intensité globale moyenne de H3K9me3 chez un individu rapporté à la moyenne de celle des sujets sains en utilisant le logiciel ImageJ. (C) Niveau d'expression de l'ARNm *SUV39H1* mesuré par RT-qPCR dans les cellules CD34⁺(contrôles, n=7; patients, n=14) rapporté à la moyenne des contrôles. Les valeurs de Ct sont normalisées à la moyenne des gènes de ménages (HPRT, PPIA, Tubuline, Gus et/ou RPL32). Moyennes +/- SEM issues de 2 expériences indépendantes. (D) Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence de SUV39H1 dans les cellules CD34⁺ (contrôles, n=4; patients, n=8), rapporté à la moyenne des sujets sains. (E) Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence de H3K9me2 dans les cellules CD34⁺ (contrôles, n=16; patients, n=27) rapporté à la moyenne des sujets sains. Moyennes +/- SEM issues de 4 expériences indépendantes. (F) Représentation en images et quantification du Western-Blot de H3K9me2 dans les cellules CD34⁺(contrôles, n=5; patients, n=5). (G-H) Niveau d'expression des l'ARNm de (G) *EHMT2*, (H) *EHMT1* mesuré par RT-qPCR dans les cellules CD34⁺(contrôles, n=7; patients, n=14) rapporté à la moyenne de ceux des contrôles. Les valeurs de Ct sont normalisées à la moyenne des gènes de ménages (HPRT, PPIA, Tubuline, Gus et/ou RPL32). (I-J) Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence de (I) G9A et (J) GLP dans les cellules CD34⁺ (contrôles, n=6-9 ; patients, n=9-11) rapporté à la moyenne des sujets sains. La quantification des images est réalisée en utilisant le logiciel ImageJ. Echelle : 3 µm. t.test, *P<0.05 ; **P<0.01 ; ***p<0.001 ; ****, P<0.0001.

Pour comprendre comment ces modifications inverses des marques d'hétérochromatine répressives H3K9me2 et H3K9me3 impactent l'ouverture de la chromatine à l'échelle du génome, nous avons réalisé des expériences d'ATAC-seq. Les marques H3K9me2 et H3K9me3 étant trouvées essentiellement au niveau des séquences répétées, incluant les éléments transposables, nous avons réalisé l'analyse sur tous les reads, multiples et uniques. L'analyse différentielle des ATAC-seq de CD34⁺ provenant de 3 sujets âgés sains et de 5 patients a permis de distinguer 3238 régions différentielles entre les contrôles et les patients (p<0.05). 48.8% et 51.2% de ces régions sont moins et plus accessibles, respectivement, chez les patients. (Fig. 2 A-B). Ces régions différentielles se trouvent majoritairement dans les gènes (80%, contre 20% dans les séquences répétées) (Fig. 2 C). Dans les régions géniques, les régions différentielles ouvertes chez les patients sont enrichies dans les promoteurs, les exons et le 5'UTR (Fig. 2 D). Au contraire chez les contrôles ces régions ouvertes sont enrichies

dans les introns et les régions intergéniques (Fig. 2 D). Au sein des séquences répétées, les régions plus accessibles chez les patients sont enrichies au niveau des séquences répétées non transposables (constituant 61% des régions plus ouvertes, et 21% des régions plus fermées) (Fig. 2 D). A l'inverse, les régions différentielles de chromatine moins accessibles chez les patients se trouvent majoritairement au niveau des rétro-éléments (RE), SINE, LINE et LTR (représentant 73% des pics différentiels fermés, et seulement 36% des pics différentiels ouverts) (Fig. 2 D). Ces résultats suggèrent que les changements de chromatine chez les patients se traduisent par une fermeture des régions intergéniques et introniques contenant les RE et par une ouverture des régions répétées non transposables.

L'analyse de l'enrichissement des différentes classes d'éléments répétés dans les pics ATAC différentiels entre les patients et les contrôles confirme cette hypothèse (Fig. 2 E-F). Mis à part les ERV1, les L1 et les Alu, la plupart des familles de RE sont enrichies dans les régions différentiellement fermées chez les patients (Fig. 2 F).

Globalement, ces résultats montrent que la perte de H3K9me3 et le gain de H3K9me2 dans les cellules CD34⁺ de patients LMMC par rapport à celles des sujets sains sont corrélés chez les patients par une fermeture des régions intergéniques, introniques et de tous les types de RE : LINE, LTR, SINE, et une ouverture au niveau des séquences répétées non transposables (satellites, éléments répétés simples). Ils sont en accord avec le fait que la marque H3K9me3 est retrouvée dans les régions enrichies en séquences répétées non transposables (Vojvoda Zeljko, Ugarković, et Pezer 2021). Bien que H3K9me3 se lie aussi aux éléments transposables, la diminution de cette marque répressive ne semble pas augmenter l'accessibilité de la chromatine au sein des éléments transposables. Ce résultat suggère que l'augmentation de la marque H3K9me2 pourrait en partie compenser la perte de H3K9me3 au niveau des RE dans les CD34⁺ de patients.



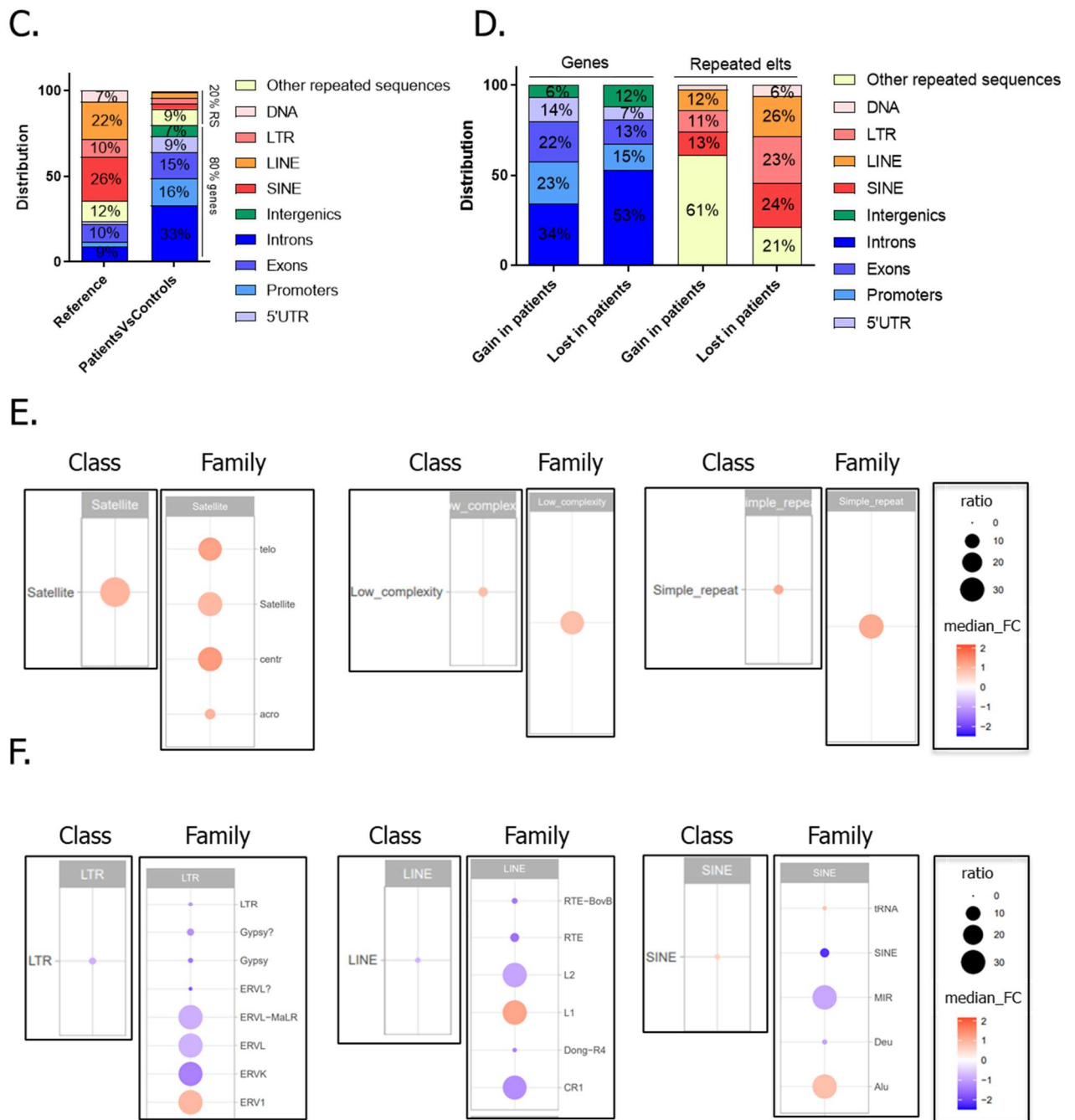


Figure 2. Etat de l'hétérochromatine dans les cellules CD34⁺ de patients atteints de LMMC analysé par ATAC-seq.

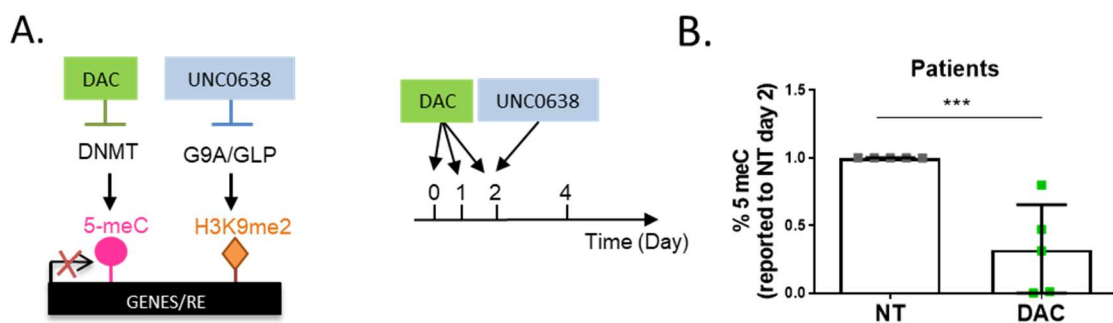
(A-B). Analyse différentielle d'expériences d'ATAC-seq de CD34⁺ (sujet âgés, n=3, CTA51 CTA52, CTA53; patients LMMC, n=5, 3350, 3353, 3356, 3377, 3393, p<0.05); (A) Représentation en volcano plot des régions ouvertes et fermées: l'axe horizontal représente le « - log₂ fold change » et l'axe vertical le « - log₁₀ (pValue) »; les loci significativement augmentés et diminués sont indiqués respectivement *en rouge* et *vert*. (B) Représentation sous forme de heatmap de l'accessibilité de toutes les régions différentielles ouvertes et fermées par individu (*à gauche*, moyenne de toutes les régions différentielles et *à droite*, niveau d'accessibilité de chacune de ces régions). (C) Répartition dans le génome humain

des différents pics annotés différentiels entre les patients et les contrôles ($p < 0.05$). (D) Répartition des pics différentiels au sein des gènes et des éléments répétés ($p < 0.05$). (E-F) Représentation sous forme de dot plot du médiane fold change de l'accessibilité des loci (couleur ; bleu, loci fermés ; rouge, loci ouverts) et du nombre de loci différentiels (taille des ronds) par rapport à la classe et à la famille (E) des séquences répétées non transposables et (F) des éléments transposables ($p < 0.05$).

La combinaison HMAs et inhibiteurs H3K9 di-méthyltransférase entraine une augmentation de l'expression des rétro-éléments.

Les agents hypométhylants de l'ADN (HMA) sont utilisés comme traitements chez les patients atteints de LMMC à haut risque. Des données récentes ont montré que la déméthylation de l'ADN par les HMA peut entraîner une libération massive des ERV (Chiappinelli et al. 2015; Roulois et al. 2015). La hausse de H3K9me2 dans les CD34⁺ des patients suggère que cette marque pourrait bloquer l'expression des RE dans les CSPH des patients LMMC. Son inhibition pourrait favoriser l'effet des HMA. Afin de tester l'hypothèse d'une coopération de la marque H3K9me2 et de la méthylation de l'ADN au niveau moléculaire, les cellules CD34⁺ de patients LMMC et de sujets âgés sains ont été traitées par un HMA (DAC, décitabine), puis par un inhibiteur de G9A/GLP (UNC0638) (Fig. 3 A).

Un test ELISA mesurant le taux de méthylation globale de l'ADN à partir du statut de méthylation des éléments L1 qui représentent 20% du génome humain et sont riches en îlots CpG, a montré qu'après 2 jours de traitement DAC, le niveau de méthylation de l'ADN est significativement réduit chez tous les patients testés (5/5), confirmant l'efficacité du traitement (Fig. 3 B). Le double traitement DAC+UNC0638 maintient la déméthylation de l'ADN après 4 jours de culture tandis que les traitements individuels n'altèrent pas le niveau de méthylation de l'ADN (Fig. 3 C). Le niveau de H3K9me2, mesuré par des expériences d'immunofluorescence, ne change pas après 2 jours de culture en présence de DAC (Fig. 3 D). Le traitement par l'UNC0638 pendant les deux derniers jours de culture réduit drastiquement la quantité de H3K9me2, prouvant le bon fonctionnement de cet inhibiteur (Fig. 3 E).



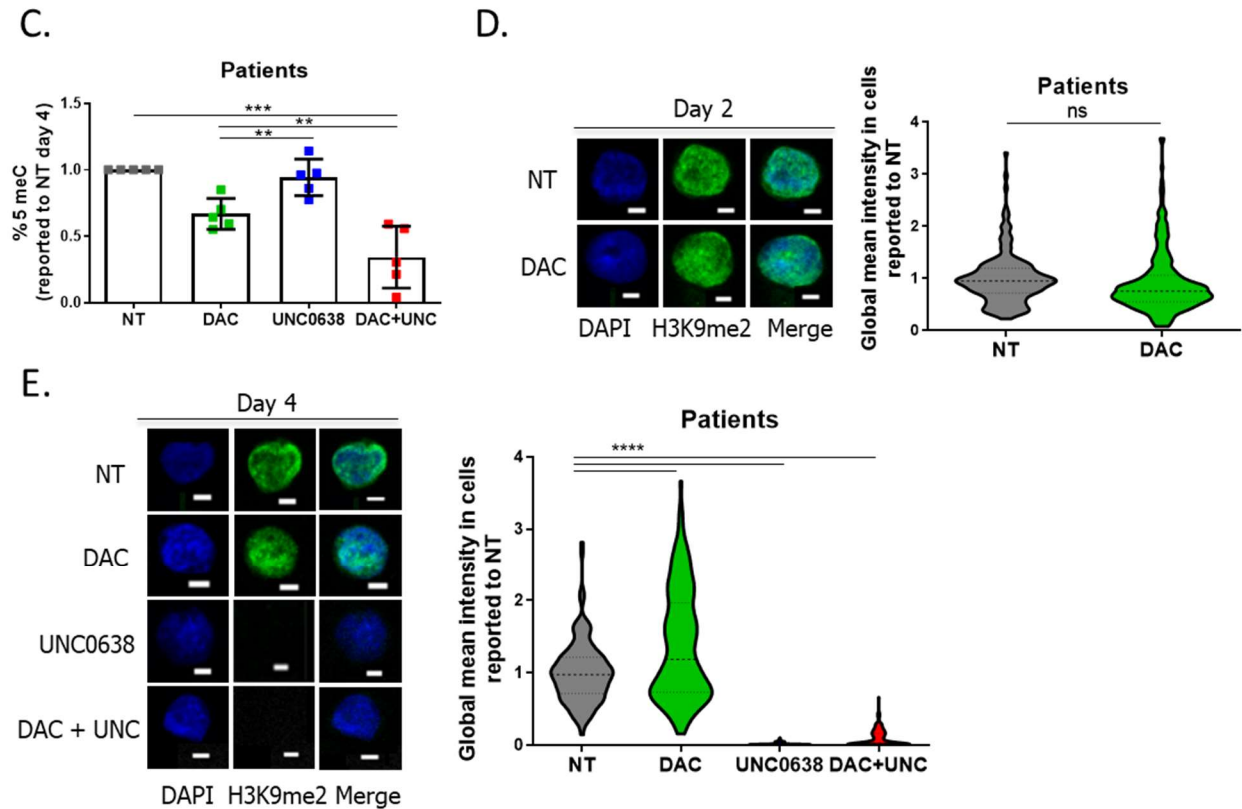
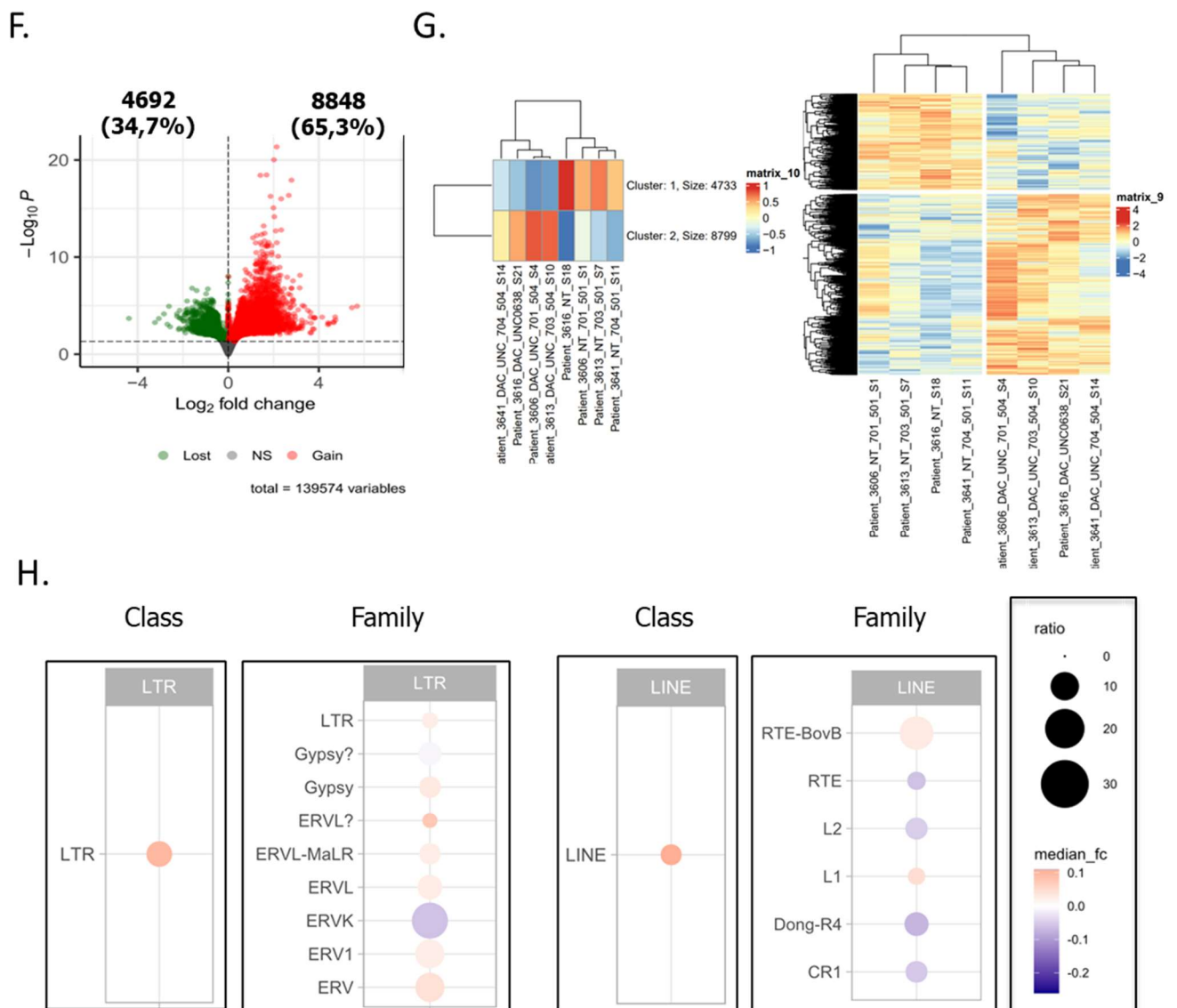


Figure 3. Etude de l'accessibilité de la chromatine au niveau des RE après le traitement par la combinaison HMA et inhibiteurs H3K9 di-méthyltransférase.

(A) Protocole de traitement : les cellules CD34⁺ sont incubées en milieu liquide pendant 2 jours en présence ou non de HMA (DAC). Puis elles sont plantées en méthylcellulose en présence ou absence d'inhibiteurs de H3K9 di-méthyltransférase (UNC0638). (B-C) Mesure du niveau de méthylation de l'ADN (% 5meC) après (B) 2 jours et (C) 4 jours de culture liquide en présence ou absence (DAC, 10 nM et UNC0638 1µM) (n=5 patients). (D-E). Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence de H3K9me2 après (D) 2 jours et (E) 4 jours de culture liquide rapporté à la moyenne de celle obtenue dans la condition sans traitement (n=3 patients). Echelle : 3 µm. La quantification des images est réalisée en utilisant le logiciel ImageJ. Moyenne +/- SEM. One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison & t.test. **p<0.01;***p<0.001.

L'impact des traitements sur l'accessibilité de la chromatine aux RE a été évalué par ATAC-seq. Ces expériences sont effectuées sur des CD34⁺ provenant de patients LMMC après 4 jours de traitements *ex vivo* dans les 4 conditions de cultures (Fig. 3 F-I). La chromatine des CD34⁺ de patients traités par la combinaison est remaniée avec plus de 8800 régions ouvertes (65%) et 4692 régions fermées (35%) en comparaison aux cellules n'ayant pas reçu de traitement (Fig. 3 F-G). La répartition de l'intensité médiane des loci ATAC différentiels au sein de chaque classe et famille de RE montre que la

combinaison a entrainé une ouverture la chromatine au niveau de toutes les familles de LTR (excepté les ERVK) et aussi des LINE-1 (L1) (Fig. 3 H). Les effets des traitements individuels sur l'accessibilité de la chromatine sur les loci de RE sont en cours étude. En ciblant l'étude sur l'état de la chromatine dans les ERV différentiellement dérégulés par la combinaison par rapport à l'absence de traitements, nous constatons que les traitements individuels (DAC, UNC0638) semblent réduire l'accessibilité de la chromatine des loci ouverts en l'absence de traitement et d'augmenter ceux fermés, avec un effet plus fort apporté par le DAC seul que par l'UNC0638 seul (Fig. 3 I). La combinaison semble accentuer ces remaniements de la chromatine de façon synergique (Fig. 3 I).



I.

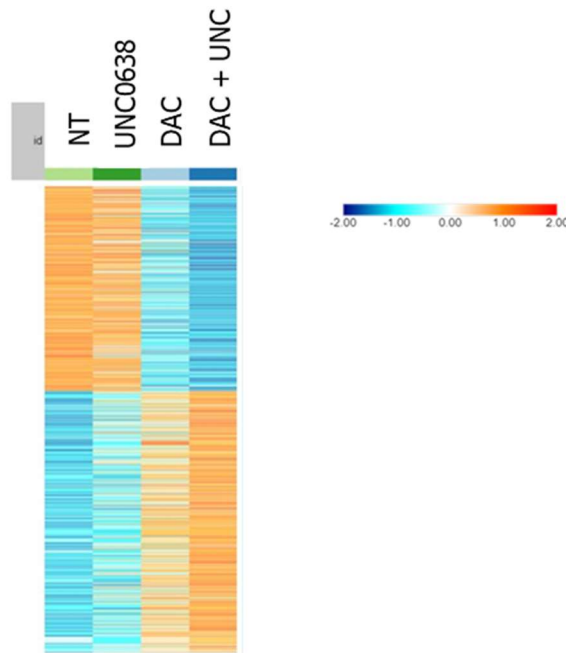


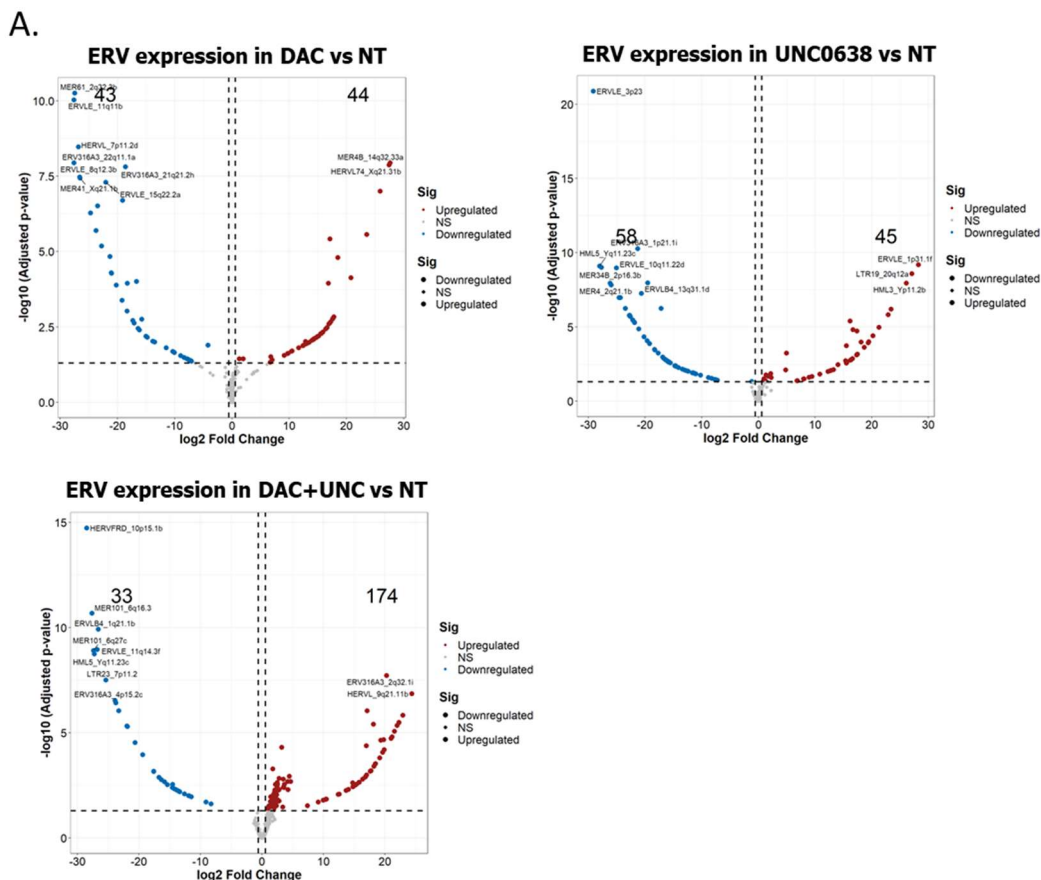
Figure 3 suite. Etude de l'accessibilité de la chromatine au niveau des RE après le traitement par la combinaison HMA et inhibiteurs H3K9 diméthyltransférase.

(F-H) Analyse différentielle d'expériences d'ATAC-seq de CD34⁺ (n=4 patients LMMC, 3606, 3613, 3616, 3641, p<0.05). (F) Représentation des régions ouvertes et fermées sous forme de volcano Plot : l'axe horizontal représente le « - log₂ fold change » et l'axe vertical le « - log₁₀ (pValue) »; les gènes significativement augmentés et diminués sont montrés respectivement en rouge et vert. (G) Représentation de l'intensité de l'accessibilité de toutes les régions différentielles ouvertes et fermées par individu sous forme de heatmap à gauche (moyenne de toutes les régions différentielles et à droite, niveau d'accessibilité de chacune de ces régions). (H) Représentation sous forme de dot plot de la médiane du fold change de l'accessibilité des loci (couleur ; bleu, loci fermés ; rouge, loci ouverts) et du nombre de loci différentiels (taille des ronds) par rapport à la classe et à la famille des séquences LTR (à gauche) et des séquences LINE (à droite). (I) Représentation en heatmap du niveau médian d'accessibilité des loci ERV différentiels en combinaison par rapport à l'absence de traitement, dans les différentes conditions : NT, UNC0638, DAC, DAC+UNC0638.

L'effet des traitements sur le transcriptome a été étudié par RNA-seq. Ces expériences sont également réalisées sur des CD34⁺ de LMMC après 4 jours de traitements *ex vivo*. L'analyse différentielle est effectuée sur les transcrits ERV qui sont les RE les plus dérégulés par la combinaison (Fold change 1.5 ; padj<0.05). Elle montre une augmentation de l'expression de 174 loci ERV (soit 84% des ERV différentiellement dérégulés) et une diminution de seulement 33 loci par la combinaison en comparaison à la condition non traitée (Fig. 4 A). Les traitements seuls induisent et répriment autant

d'ERV par rapport à l'absence de traitement (44 et 45 loci ERV différenciellement augmentés, 43 et 58 diminués, respectivement en DAC et UNC0638) (Fig. 4 A). De plus, la combinaison augmente spécifiquement l'expression de 129 ERV (74%) alors que les traitements seuls induisent l'expression de très peu d'ERV uniques (Fig. 4 B). En se focalisant uniquement sur les ERV différenciellement exprimés par la combinaison par rapport aux cellules non traitées nous constatons que la majorité (80%) des loci ont une expression augmentée de façon synergique par la combinaison des traitements (Fig. 4 C). Des expériences de RT-qPCR sur certaines sous-familles d'ERV dérégulées par les traitements confirment les résultats du RNA-seq. Pour certains ERV, tels que ERVL-B4 ou MER4D0 (appartenant respectivement à la famille des ERVL et ERV1), un traitement par l'UNC0638 seul suffit pour induire une augmentation, suggérant que ces ERV sont réprimés majoritairement par H3K9me2 (Fig. 4 D). D'autres ERV, tels que ERVL et ERVH (faisant partie respectivement de la famille des ERVL et ERV1) sont augmentés uniquement par la combinaison, mettant en évidence une répression de ces ERV à la fois par la méthylation de l'ADN et la marque H3K9me2 (Fig. 4 D).

L'ensemble de ces données suggèrent que la combinaison HMA et inhibiteurs de H3K9 di-méthyltransférase entraîne une dérégulation importante de RE, en particulier les ERV, dans les CD34⁺ de patients LMMC.



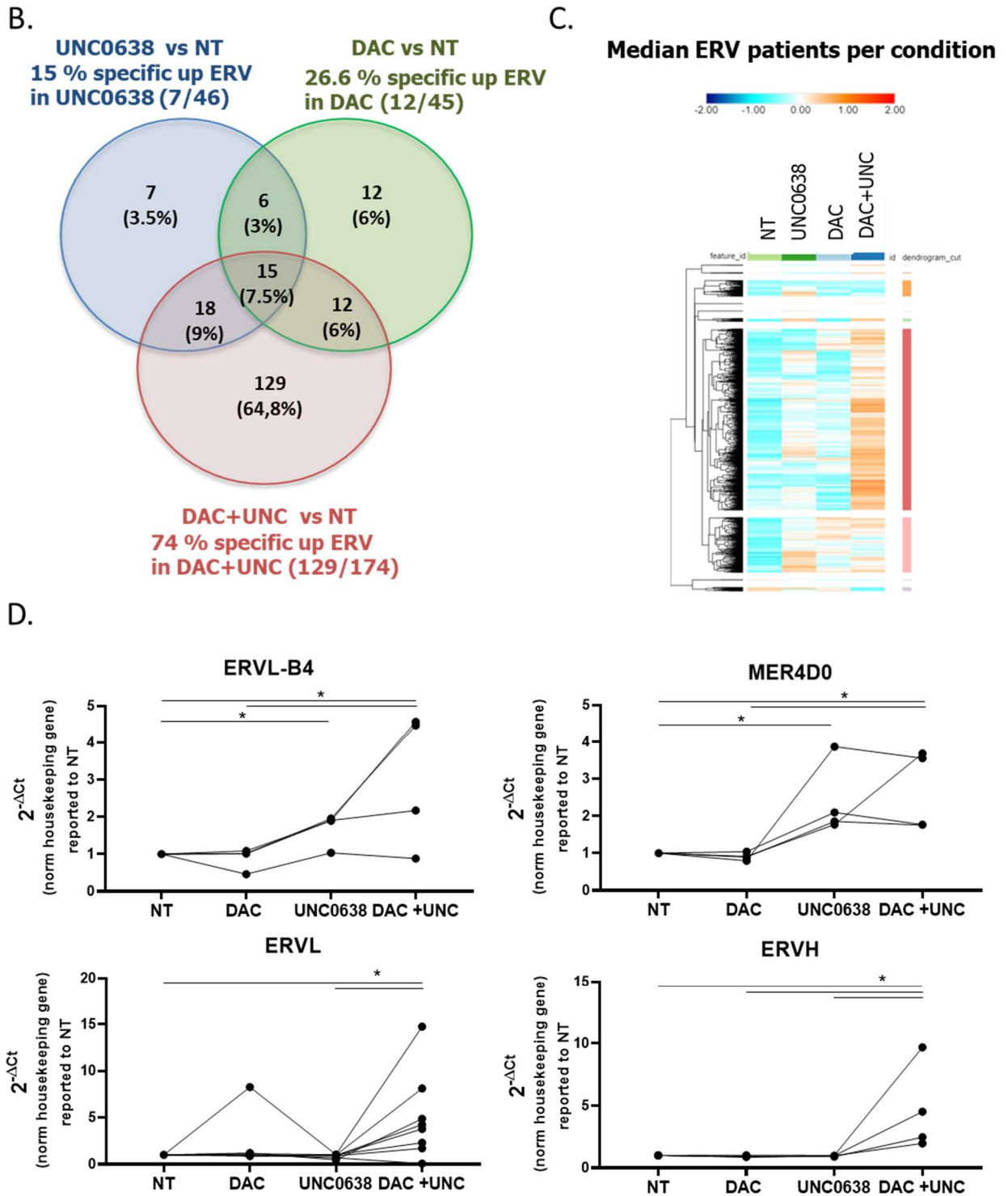


Figure 4. Etude de l'expression des ERV après le traitement par la combinaison.

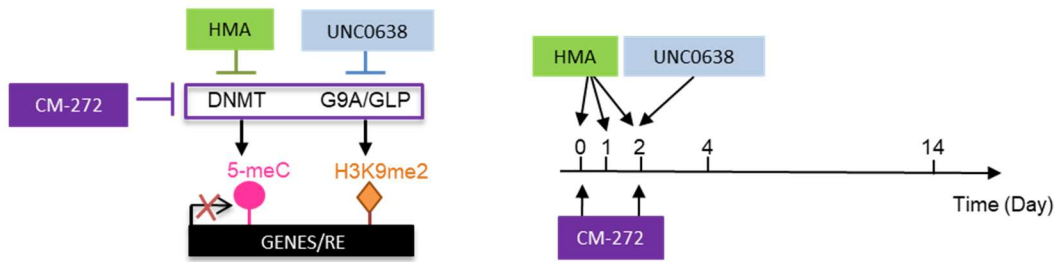
(A-C) Analyses différentielles de l'expression des transcrits ERV en condition traité (DAC seul, UNC0638 seul ou DAC+UNC0638) par rapport à la condition non traité (NT) dans les CD34⁺ de patients (n=6) après 4 jours de culture (Fold change 1.5; FDR q-value <0.05) : (A) Représentation sous forme de volcano plot des transcrits ERV différentiels sur-exprimés (*en rouge*) et sous-exprimés (*en bleu*) en condition traité ; (B) Représentation en Venny des

transcrits ERV différentiels sur-exprimés dans les traitements. (C) Représentation en heatmap du niveau médian d'expression des ERV différentiels en combinaison par rapport à l'absence de traitement, dans les différentes conditions : NT, UNC0638, DAC, DAC+UNC0638. (D) Mesure du niveau d'expression de ERVL-B4, MER4D0, ERVL et ERVH par RT-qPCR normalisés aux gènes de ménages (HPRT, Tubuline, Gus, PPIA et/ou RPL32) et rapporté à celui obtenu dans la condition NT (patients, n=4 à 8). Moyenne +/- SEM. One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison * p<0.05.

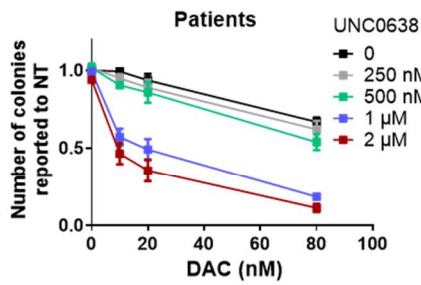
La combinaison HMA et inhibiteurs de G9A/GLP réduit la clonogénicité des CD34⁺ de patients LMMC de façon synergique sans affecter les cellules saines.

Pour déterminer si la synergie observée sur l'augmentation de l'accessibilité à la chromatine et l'expression des ERV peut être utilisée pour tuer les cellules LMMC, nous avons effectué des études fonctionnelles en évaluant l'impact des traitements (HMA et/ ou UNC) sur la clonogénicité des CD34⁺ de patients LMMC et de sujets sains. Les expériences de dose-réponse montrent que la combinaison DAC et UNC0638 réduit la clonogénicité en méthylcellulose des CD34⁺ de patients LMMC même à des doses faibles sans affecter les CD34⁺ de sujets âgés sains (Fig. 5 A-B) et (Fig. S1 A). Les analyses suivant la méthode de Chou-Talalay (Chou 2006) révèlent que les inhibiteurs DAC et UNC0638 agissent en synergie (indice de combinaison (IC) < 1) dans toutes les conditions testées (Fig. 5 C-D). Pour la suite des expériences, nous avons choisi les concentrations de 10 nM pour la DAC et 1 µM pour l'UNC0638. En absence de traitement, le nombre de colonies formées est équivalent entre les CD34⁺ de sujets sains et de patients (en moyenne 82 +/-10, n=28 et 72 +/- 4, n=12, colonies pour 600 cellules mises en culture, respectivement) (Fig 5 E). Le traitement *ex vivo* des cellules CD34⁺ de LMMC avec la DAC puis l'UNC0638 induit une inhibition de leur clonogénicité en méthylcellulose chez 26/28 des patients testés alors que chaque inhibiteur seul n'a que peu d'effet (Fig. 5 F). Ces traitements n'affectent pas les CD34⁺ des sujets âgés (Fig. 5 G). L'utilisation d'un autre HMA (AZA) et inhibiteur de G9A/GLP (UNC0642) (Fig. S1 B-C), ou bien du CM-272, un inhibiteur à double action contre les DNMTs et G9A/GLP (Fig. 5 H-I) conduit également à une réduction de la clonogénicité spécifique aux cellules CD34⁺ de patients LMMC. L'ensemble de ces résultats met en évidence que la combinaison a un effet bénéfique sur la clonogénicité des cellules CD34⁺ de patients.

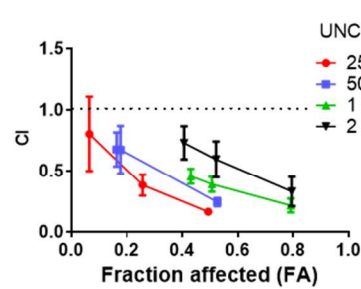
A.



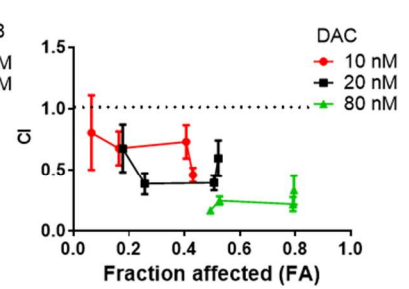
B.



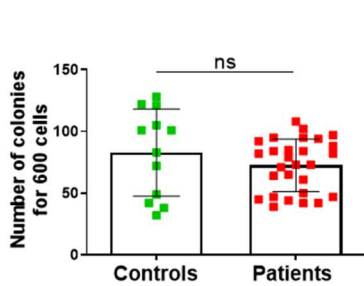
C.



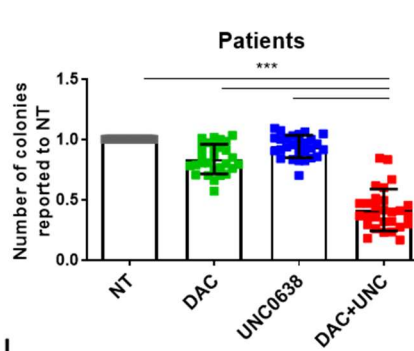
D.



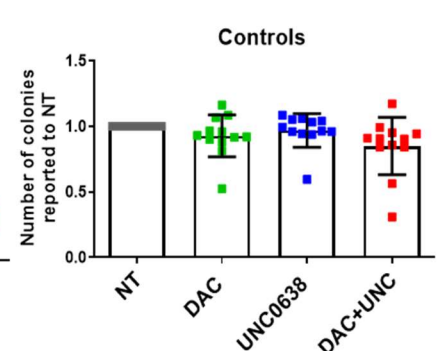
E.



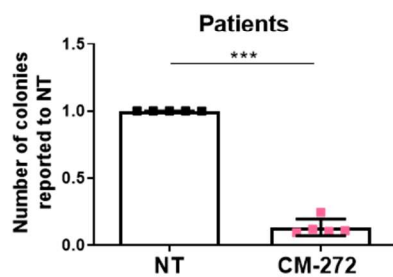
F.



G.



H.



I.

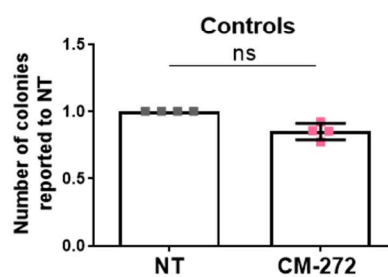


Figure 5. La clonogénicité des CD34⁺ de patients LMMC est altérée par la combinaison, HMA et inhibiteurs de G9A/GLP, contrairement aux sujets sains.

(A) Protocole de traitement : les cellules CD34⁺ sont incubées en milieu liquide pendant 2 jours en présence ou non de HMA. Puis elles sont plantées en méthylcellulose en présence ou absence d'inhibiteurs de H3K9 di-méthyltransférase (UNC0638). En parallèle, d'autres cellules sont traitées ou non avec du CM-272 (inhibiteur des DNMTs et de G9A/GLP). Les

colonies sont comptées après 14 jours de culture. (B) Etude de l'effet dose-réponse du DAC et de l'UNC0638 sur la formation de colonies en méthylcellulose (pool de 3 patients). (C-D) Modèle de Chou-Talalay des effets de la combinaison de différentes doses de DAC et de l'UNC0638. La fraction affectée (fa) correspond à la proportion de colonies éliminées par les traitements. L'indice de combinaison (CI) est calculé par le logiciel CompuSyn (ComboSyn, Inc.), $CI < 1$, $CI = 1$, $CI > 1$ indique respectivement un effet synergique, additif et antagoniste. (E) Nombre de colonies formées en méthylcellulose à partir de 600 cellules CD34⁺ sans traitement (contrôles, n=12 et patients, n=28). (F-G) Nombre de colonies à partir de CD34⁺ traités ou non au DAC, 10 nM et UNC0638 1 μ M issues de patients (F, n=28) et de sujets sains (G, n=12). (H-I) Nombre de colonies obtenues à partir de CD34⁺ traités ou non au CM-272 issues de patients (H, n=5) et de sujets sains (I, n=4). Moyenne +/- SEM. One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison & t.test, ***p<0.001.

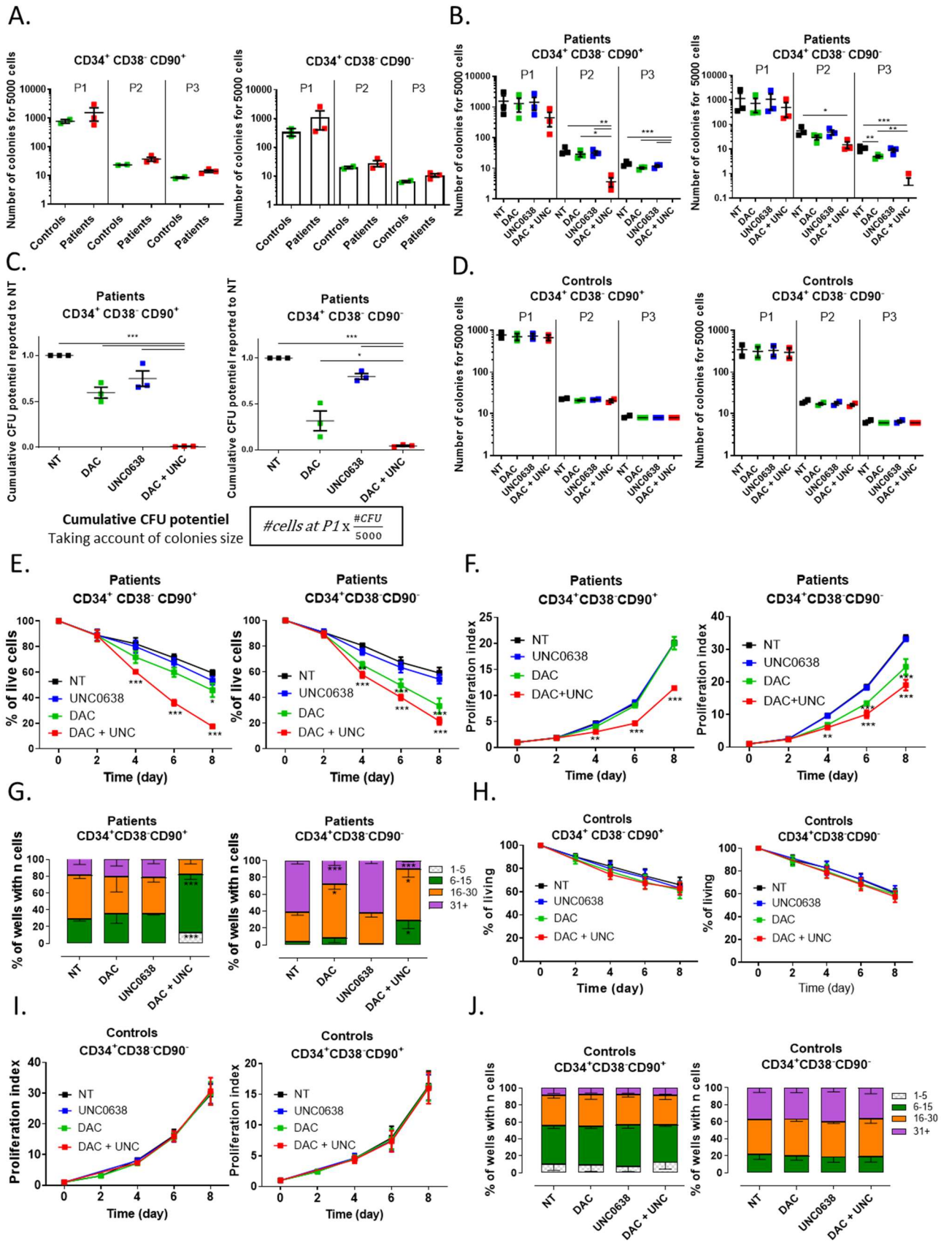
La combinaison HMA et inhibiteurs G9A/GLP réduit la clonogénicité, la survie et la prolifération des CSH et des progéniteurs tandis que le traitement HMA seul cible davantage les progéniteurs

Afin de déterminer la population ciblée par la combinaison, des expériences de clonogénicité en méthylcellulose et en culture liquide à l'échelle unicellulaire ont été effectuées sur des cellules CD34⁺CD38⁻CD90⁺ (enrichies en CSH) et CD34⁺CD38⁻CD90⁻ (enrichies en progéniteurs). La capacité clonogénique de ces deux populations cellulaires a été étudiée au cours des trois passages (P1, P2, P3). En absence de traitement, aux trois passages, le nombre de colonies formées par les CSH des patients est plus élevé (double voir triple en moyenne) que chez les sujets sains (P1 : 1552 +/- 759 vs 780 +/- 119, P2 : 38 +/- 6 vs 23 +/- 1, P3 : 14 +/- 2 vs 8 +/- 0.5 colonies formées pour 5000 cellules, n=3 patients LMMC vs n=2 sujets sains) tout comme celles formées à partir de progéniteurs (P1 : 347 +/- 103 vs 1138 +/- 731, P2 : 20 +/- 2 vs 28 +/- 7, P3 : 7 +/- 1 vs 11 +/- 2 colonies formées pour 5000 cellules, n=2 vs n=3 respectivement) (Fig. 6 A). Au passage 3 (P3), le traitement seul par la DAC réduit de façon significative le nombre de colonies formées à partir des progéniteurs mais reste sans effet sur la population enrichie en CSH (Fig. 6 B). Le double traitement entraîne une diminution drastique des colonies formées à partir des progéniteurs comme des CSH (Fig. 6 B). Des résultats similaires ont été obtenus en mesurant le potentiel clonogénique cumulatif (Higa et al. 2021) qui tient compte du nombre de colonies formées ainsi que de la taille des colonies (Fig. 6 C). Le nombre de colonies formées à partir des CSH et des progéniteurs issus des sujets sains n'est pas affecté par les traitements aux trois passages (Fig. 6 D).

Des expériences en culture liquide à l'échelle unicellulaire ont été réalisées pour étudier trois paramètres : la viabilité cellulaire définie par le nombre de puits ayant au moins

une cellule, l'expansion cellulaire déterminée par le nombre de cellules totales dans tous les puits à un instant t , et la taille des colonies caractérisée par le nombre de cellules totales par puits. En absence de traitement, la viabilité et l'expansion cellulaire des CSH ainsi que celles des progéniteurs sont similaires entre les sujets âgés sains et les patients (Fig. S2 A-B). La taille des colonies des CSH et également celles des progéniteurs de patients LMMC sont plus grandes que celles des sujets âgés sains (Fig. S2 C). Dans ces expériences, il est observé une réduction de la viabilité, la prolifération et la taille des colonies des CSH et des progéniteurs issus de patients par la combinaison, à la différence du traitement DAC seul qui cible uniquement les progéniteurs (Fig. 6 E-G). L'UNC0638 seul n'a pas d'effet. Les traitements n'ont aucun effet sur la viabilité et la prolifération de ces deux populations chez les sujets âgés sains (3/3) (Fig. 6 H-J).

L'étude des mutations présentes dans les colonies formées à partir de CSPH qui n'ont pas été éliminées par les traitements après 14 jours de culture a été réalisée par séquençage Sanger pour 4 patients. Les résultats montrent que la combinaison a permis de réduire le nombre de clones mutés chez les patients 1 et 2 présentant les mutations RUNX1/TET2 et TET2/DNMT3A (passant respectivement de 90% à 20%, et de 75% à 12.5% de clones mutés) et même d'éradiquer les clones mutés chez les patients 3 et 4 ayant respectivement une mutation dans TET2 ou dans KRAS (Fig. 6 K). Le traitement par la DAC seule a montré très peu d'effet sur les clones mutés, confirmant les données cliniques et l'absence d'éradication du clone muté LMMC par les traitements HMA (Merlevede et al. 2016). Le traitement par l'UNC0638 seul a peu d'impact sur les clones mutés, excepté pour les patients 3 et 4 pour lesquels une faible diminution du pourcentage de clones mutés a été observée (passant respectivement de 60% à 50%, et de 64% à 55%) (Fig. 6 K). Ces données montrent une efficacité de la combinaison des HMA et d'inhibiteurs de G9A/GLP dans l'élimination des CSH mutées, contrairement aux traitements individuels.



K.

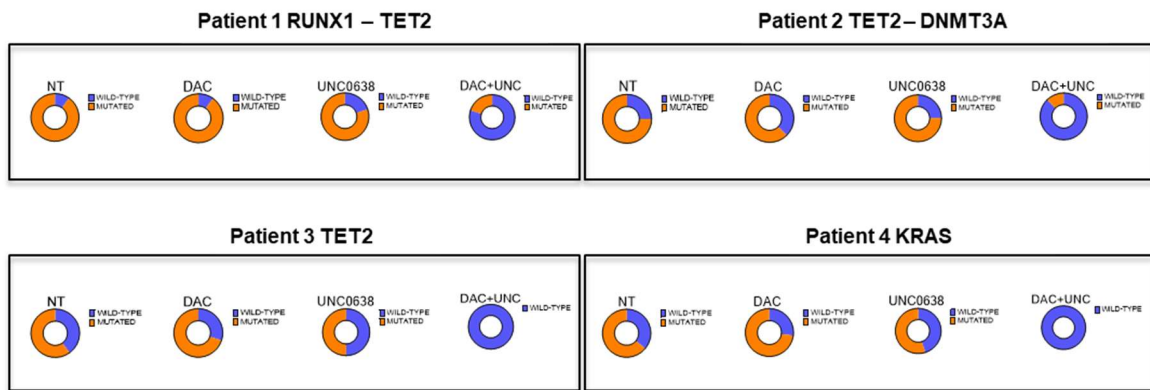


Figure 6. La clonogénicité, la survie et la prolifération des CSH et des progéniteurs de LMMC est affectée par la combinaison DAC+UNC.

(A) Nombre de colonies formées à partir de 5000 cellules CD34⁺CD38⁻CD90⁺ et CD34⁺CD38⁻CD90⁻ de patients (n=3) et de contrôles (n=2) en méthylcellulose après les différents passages (P1, passage 1, P2, passage 2, P3, passage 3). (B) Nombre de colonies formées à partir de 5000 cellules CD34⁺CD38⁻CD90⁺ et CD34⁺CD38⁻CD90⁻ de patients (n=3) en présence ou absence de DAC et/ou de l'UNC0638 en méthylcellulose après les différents passages. (C) Effets des traitements DAC et/ou UNC0638 sur le potentiel clonogénique cumulatif ((nb colonies P2/nb de cellules plantées au départ) X nb cellules P1) des deux populations CD34⁺CD38⁻CD90⁺ et CD34⁺CD38⁻CD90⁻ issues de patients (n=3). (D) Nombre de colonies formées à partir de 5000 cellules CD34⁺CD38⁻CD90⁺ et CD34⁺CD38⁻CD90⁻ de contrôles (n=2) en présence ou absence de DAC et/ou de l'UNC0638 en méthylcellulose après les différents passages. (E-G) Etude du comportement des CD34⁺CD38⁻CD90⁺ et CD34⁺CD38⁻CD90⁻ de patients (n=3) et de contrôles (n=2) en culture liquide à l'échelle unicellulaire en absence de traitement : (E) viabilité, (F) prolifération cellulaire et (G) répartition du nombre de cellules dans chaque puits. (H-J) Etude du comportement des CD34⁺CD38⁻CD90⁺ et CD34⁺CD38⁻CD90⁻ de contrôles (n=3) en culture liquide à l'échelle unicellulaire en présence et en absence de DAC et/ou UNC0638 : (H) viabilité, (I) prolifération cellulaire, (J) répartition du nombre de cellules dans chaque puits. (K) Evaluation de la fréquence allélique des gènes identifiés mutés après 14 jours de culture dans les 4 conditions (NT, DAC, UNC0638, DAC+UNC). Pourcentage de clones mutés (orange) et sauvages (bleu). Moyenne +/- SEM. One-way ANOVA & Two-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison. * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

La combinaison HMAs et inhibiteurs H3K9 di-méthyltransférase induit un état mimant une infection virale

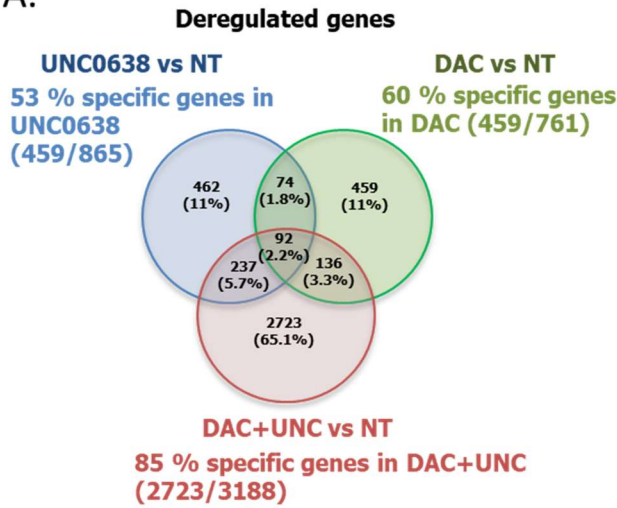
L'analyse différentielle des gènes du RNA-seq après 4 jours de traitement avec la combinaison d'inhibiteurs met en évidence 3188 gènes différentiels (p<0.05) exprimés (DEG), 2877 (90%) dont l'expression est augmentée et 311 (10%) dont l'expression est diminuée par rapport à la condition sans traitement (NT) (Fig. 7 A-B). Le traitement par la DAC seule et l'UNC0638 seul induisent respectivement seulement 761 et 865 DEG,

dont 417 (55%) et 520 (60%) sont sur-exprimés et 344 (45%) et 345 (40%) sont sous-exprimés (Fig. 7 A-B). Les analyses GSEA (*gene set enrichment analysis*) effectuées sur ces gènes différentiels révèlent que la combinaison DAC+UNC0638 induit un enrichissement positif des signatures des voies de la mort cellulaire et un enrichissement négatif pour la voie de la prolifération cellulaire par rapport à la condition sans traitement (Fig. 7 C-F). Aucune de ces voies n'est enrichie dans les conditions de traitement individuel. Ces résultats mettent en évidence l'enclenchement d'un programme anti-prolifératif et de mort cellulaire dans les CD34⁺ de patients LMCC par la combinaison. Le double traitement, mais pas les traitements individuels UNC0638 ou DAC, induit aussi un enrichissement positif des signatures de la voie IFN et de la réponse immune (Fig. 7 C et G-H).

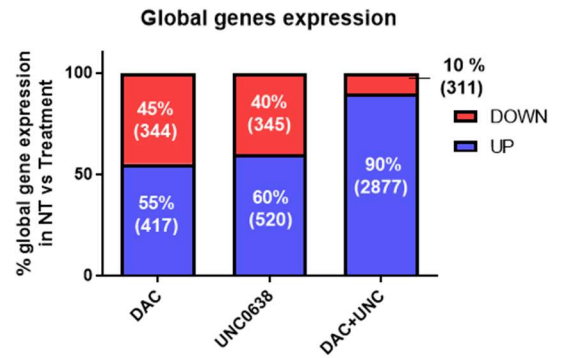
Le clustering du niveau d'expression des gènes différentiels dérégulés spécifiquement par les traitements dans les conditions NT, UNC0638, DAC, DAC+UNC identifie 4 clusters majeurs (Fig. 7 I). Le cluster C1 est composé de gènes dont l'expression diminue plus fortement avec la combinaison qu'en présence de chaque traitement indépendamment (Fig. 7 I). Ce cluster C1 est constitué de gènes ayant un rôle dans la prolifération cellulaire (Fig. 7 I), renforçant les données obtenues en GSEA (Fig. 7 D). A l'inverse, le cluster C2, le plus grand, est composé de gènes peu exprimés en NT, faiblement induits en DAC et UNC0638 seuls et induits de façon synergique par la combinaison (Fig. 7 I). Il est enrichi en gènes impliqués dans les voies de la réponse IFN et de la réponse aux dommages à l'ADN (Fig. 7 I), confirmant à nouveau les résultats obtenus par GSEA (Fig. 7 I). Le cluster C3 contient des gènes induits par le traitement UNC0638 et qui sont impliqués dans la réponse IFN, suggérant que la baisse de H3K9me2 seule pourrait induire une voie anti-virale (Fig. 7 I). Les gènes dérégulés par la DAC seule sont représentés dans le cluster C4 et ont un rôle dans la voie de signalisation TGF- β , une autre voie anti-proliférative (Fig. 7 I).

L'étude des différentes signatures de production et de signalisation IFN par GSVA (*gene set variation of analysis*) révèle que la majorité de ces signatures sont enrichies positivement par le double traitement en comparaison aux traitements individuels (Fig. 7 J). Des expériences de RT-qPCR montrent que le double traitement entraîne une hausse significative de l'expression des *interferon stimulated genes* (ISG) tels que IRF9 et IRF7 (Fig. 7 K), confirmant les résultats du RNA-seq.

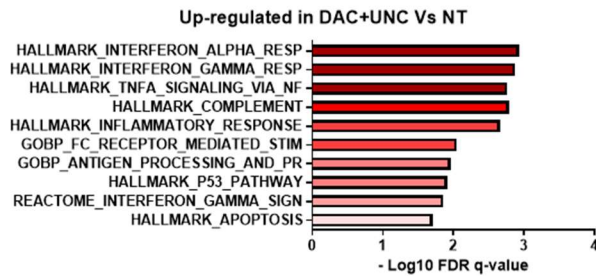
A.



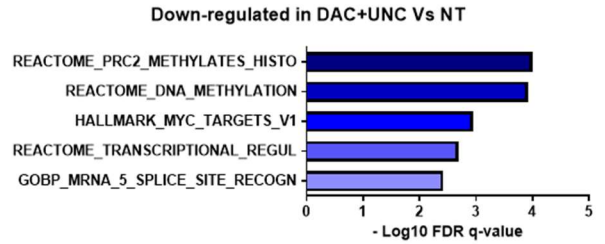
B.



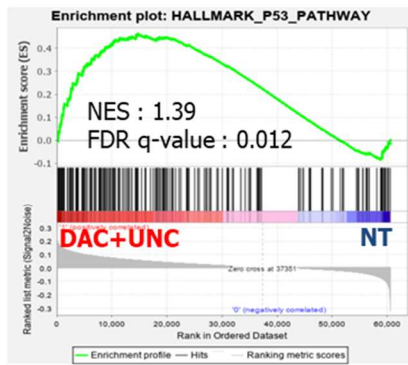
C.



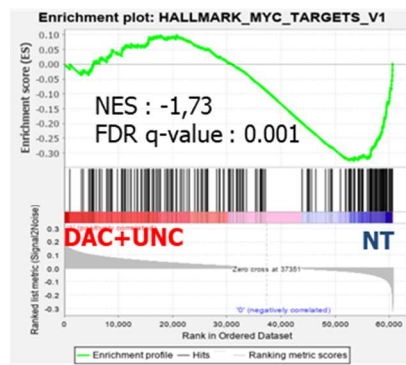
D.



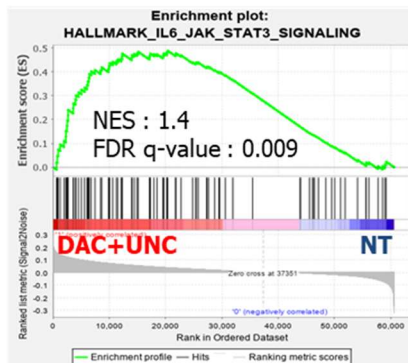
E.



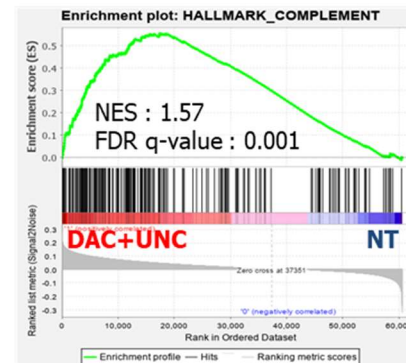
F.



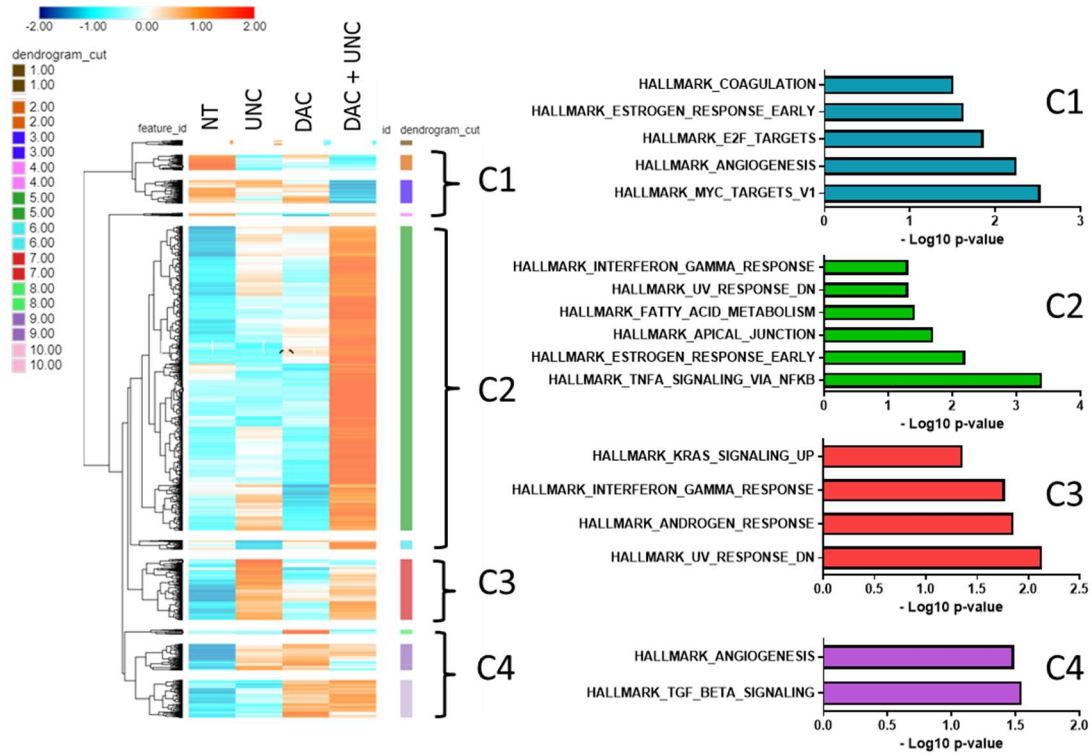
G.



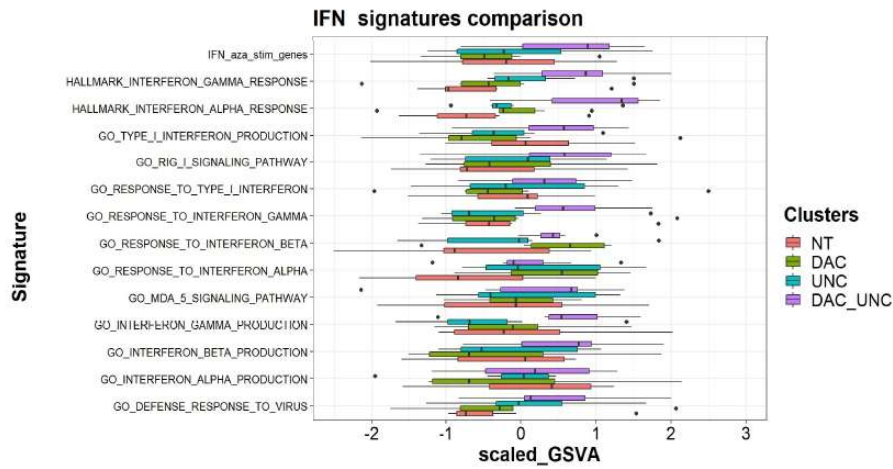
H.



I.



J.



K.

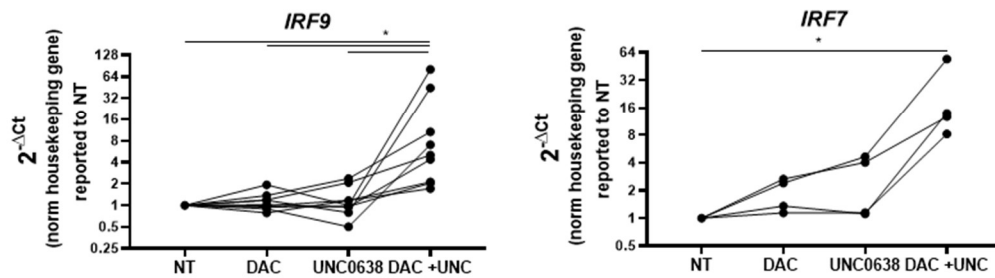


Figure 7. Induction des voies de mort cellulaire, de l'immunité et de l'IFN par la combinaison HMA et inhibiteurs G9A/GLP.

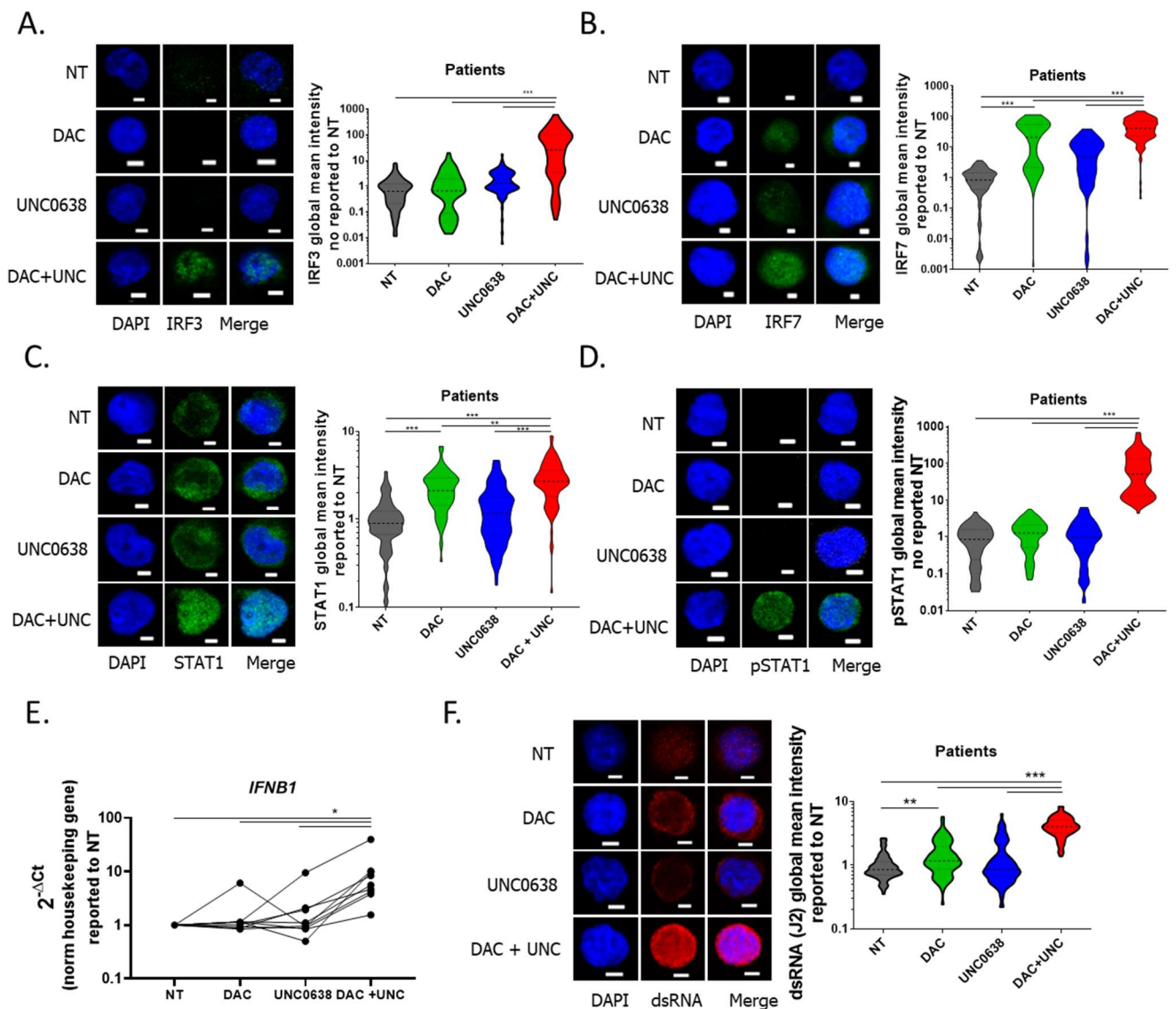
(A-B) Analyse différentielle de l'expression des gènes en condition traité (DAC seul, UNC0638 seul ou DAC+UNC0638) par rapport à la condition non traité (NT) dans les CD34⁺ de patients (n=6) après 4 jours de culture (p<0.05). (A) Représentation en Venny des gènes différentiels dans chaque condition. (B) Répartition des gènes différentiels sur-exprimés (*en bleu*) et sous-exprimés (*en rouge*). (C-D) Analyse des différentes voies enrichies positivement ou négativement par *gene set enrichment analysis* (GSEA). (E-H) Représentation GSEA des signatures (E) « *Hallmark P53 pathway* », de (F) « *Hallmark Myc targets v1* », (G) « *Hallmark IL6 JAK STAT3 signaling* » et (H) « *Hallmark complement* ». (I) Clusterisation des gènes différentiels dérégulés spécifiquement par les traitements dans les différentes conditions : NT, UNC0638, DAC, DAC+UNC068 (p < 0.05). (J) Analyse de l'enrichissement des différentes signatures IFN par *single sample gene-set variation analysis* (ssGSVA). (K) Niveau d'expression des ARNm de IRF9 et de IRF7 mesurés par RT-qPCR normalisés par les gènes de ménages (HPRT, Tubuline, Gus, PPIA et/ou RPL32) et rapportés à la condition NT. Moyenne +/- SEM. One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison. * p<0.05.

La mesure du niveau protéique par immunofluorescence des acteurs impliqués dans la production d'IFN-I (IRF3 et IRF7) et de la signalisation IFN (STAT1) dans CD34⁺ après 4 jours de culture montre une augmentation significative d'IRF3, d'IRF7 et de STAT1 par la combinaison en comparaison à l'absence de traitements (68, 50 et 3 fois, respectivement) et aux traitements individuels (Fig. 8 A-C). De plus, seule la combinaison entraîne une forte hausse de la forme phosphorylée de STAT1 (pSTAT1), (98 fois par rapport à l'absence de traitement), démontrant l'activation de la signalisation IFN après 4 jours de culture (Fig 8 D). Étonnamment, les niveaux des protéines IRF7 et STAT1 sont augmentés de façon significative par le traitement HMA seul mais ils restent significativement inférieurs à ceux obtenus par la combinaison (Fig. 8 B-C). Chez les contrôles, seule une augmentation significative d'IRF3 par la combinaison a pu être observée par la combinaison (Fig. S3 A-D). Cette hausse reste cependant faible par rapport à celle observée chez les patients (1.5 fois en comparaison à l'absence de traitement) (Fig. S3 A-D). L'activation des voies IFN dans les CD34⁺ de patients en réponse au double traitement est corrélée à l'augmentation de l'expression de l'ARNm *IFNB1* codant pour IFN-β, mesurée par RT-qPCR (Fig. 8 E).

Compte tenu de leur structure répétée, les ARNm des RE dérprimés peuvent s'hybrider et former des ARN-db. La cellule en détectant la présence de ces ARN-db qui sont assimilés à des parasites, déclenche une réponse antivirale de type IFN-I. Pour déterminer si les ERV sont responsables de la formation d'ARN-db, des expériences d'immunofluorescence avec l'anticorps J2 qui reconnaît des ARN-db de façon spécifique ont été réalisées. Elles montrent que le double traitement augmente

fortement l'expression des ARN-db dans les cellules CD34⁺ des patients LMMC mais pas celles des sujets sains âgés (Fig. 8 F) et (Fig. S3 E). Ces résultats suggèrent que le double traitement conduit à un état mimant une infection virale dans les CSPH de patients atteint de LMMC contrairement au traitement HMA seul.

Afin de savoir si la mort cellulaire est due à l'activation de la signalisation IFN-I, les cellules CD34⁺ ont été traitées par la combinaison DAC+UNC0638 en présence d'un anticorps bloquant le récepteur IFNAR2 (récepteur IFN-I) avant mise en culture en méthylcellulose (Fig. 8 G). Les résultats montrent que l'ajout de l'anticorps bloquant anti-IFNAR2 restaure, au moins partiellement, la capacité clonogénique des CD34⁺ de patients LMMC en présence de DAC+UNC0638, démontrant l'importance de la réponse antivirale et l'IFN-I produit par les cellules malignes dans l'efficacité du traitement (Fig. 8 H-I).



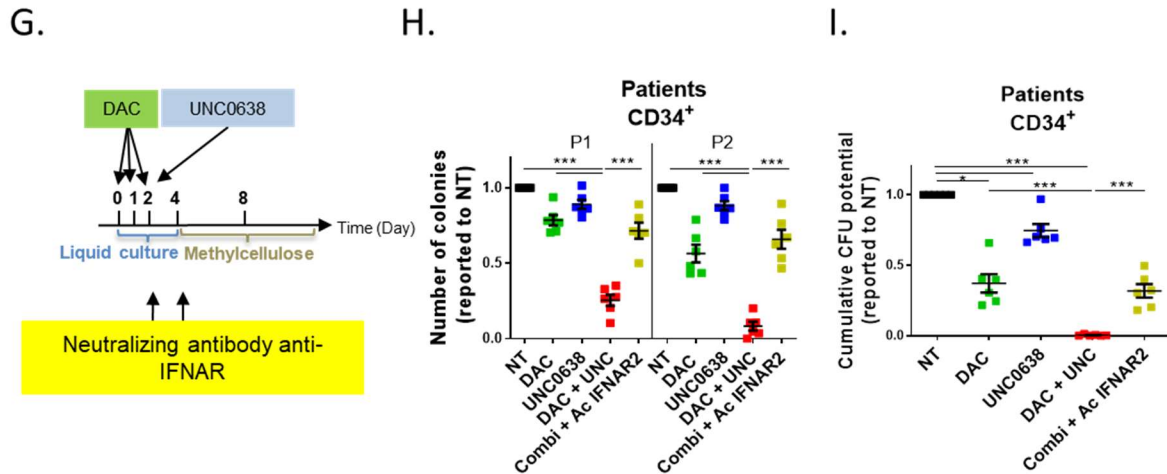


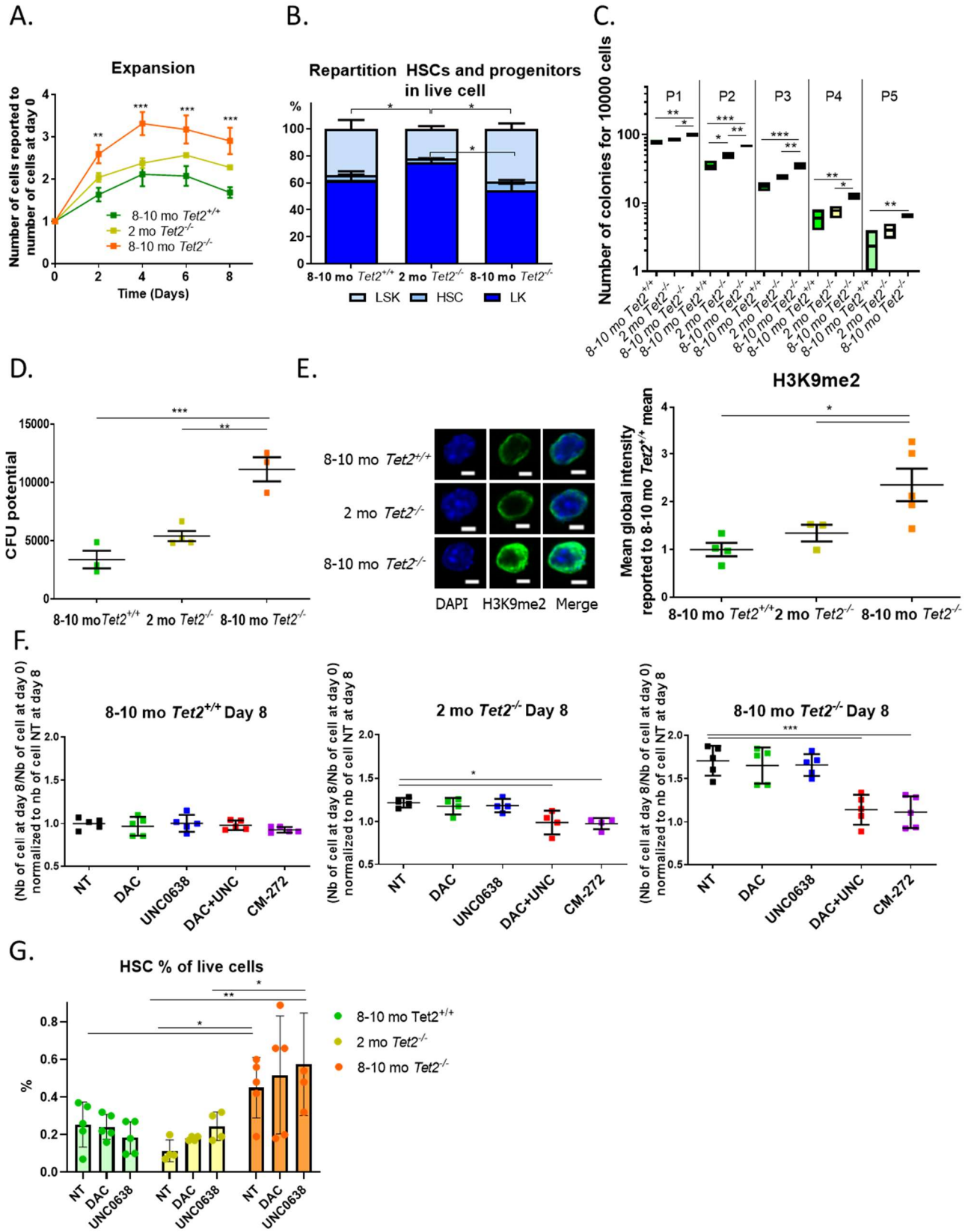
Figure 8. Induction des voies de mort cellulaire, de l'immunité et de l'IFN par la combinaison HMA et inhibiteurs G9A/GLP.

(A-D) Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence (A) IRF3, (B) IRF7, (C) STAT1, (D) pSTAT1 dans les CD34⁺ de patients (n=2) après 4 jours de culture rapportée à la moyenne de celle obtenue dans la condition NT. (E) Niveau d'expression des ARNm de *IFNB1* mesuré par RT-qPCR normalisé par les gènes de ménages (HPRT, Tubuline, Gus, PPIA et/ou RPL32) et rapporté à celui obtenu dans la condition NT. (F) Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence des ARN-db en utilisant l'anticorps J2 dans les CD34⁺ de patients (n=2); Echelle : 3 μ m. La quantification est réalisée en utilisant le logiciel ImageJ. (G) Protocole de traitement : les cellules sont incubées en milieu liquide comme décrit précédemment (Fig. 4. A) en présence ou absence d'anticorps neutralisant anti-IFNAR2 (1 μ g/ml) ajouté aux jours 2 et 4, puis plantées en méthylcellulose au jour 4. (H) Nombre de colonies formées à partir des cellules CD34⁺ de patients LMMC rapporté à celui obtenu dans la condition NT en présence ou absence de l'anticorps neutralisant IFNAR2. (I) Mesure du potentiel clonogénique cumulé dans les différentes conditions de traitements, (Patients, n=6). Moyenne +/- SEM. One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison. * p<0.05; **p<0.01;***p<0.001.

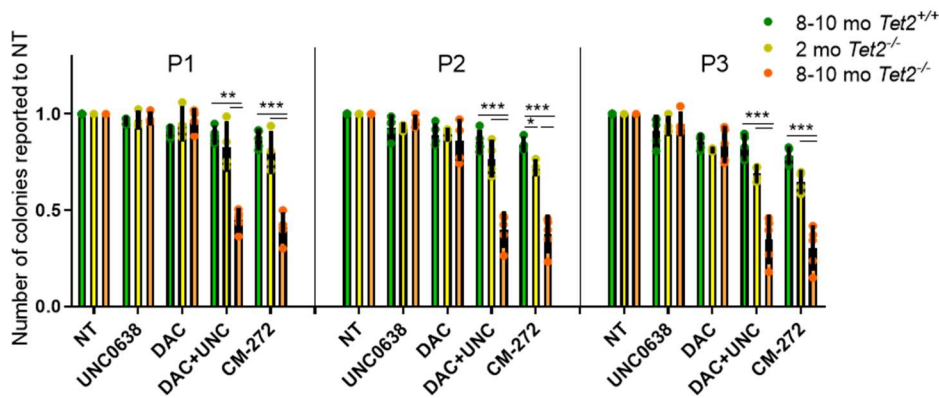
Les cellules hématopoïétiques immatures murines *Tet2*^{-/-} présentent une augmentation du niveau de H3K9me2 et une sensibilité sélective à la combinaison DAC+UNC0638 avec l'âge.

TET2 est le gène le plus fréquemment muté (60%) dans la LMMC (Jian et al. 2021). Certaines souris *Tet2*^{-/-} développent des caractéristiques similaires à la LMMC avec l'âge incluant une monocytose, et une hématopoïèse extra-médullaire (Moran-Crusio et al. 2011; Zhe Li et al. 2011b; Quivoron et al. 2011). Nous avons testé l'effet des inhibiteurs sur les cellules immatures (Lin⁻) de ces souris, âgées de 2 mois ou de 8-10 mois avant qu'elles ne développent de maladie, en comparaison de cellules sauvages (WT) âgées de 8-10 mois, en culture liquide et en méthylcellulose. Dès l'âge de 8 mois, les cellules

$\text{Lin}^- \text{Tet2}^{-/-}$ prolifèrent plus rapidement en culture liquide en comparaison aux cellules $\text{Lin}^- \text{Tet2}^{-/-}$ de 2 mois et que les cellules WT du même âge (Fig. 9 A). L'analyse en cytométrie des populations de CSH et progéniteurs après 8 jours de culture liquide montre que les cellules $\text{Tet2}^{-/-}$ plus âgées restent plus immatures (6.5% +/- 1.1 de CSH et 39% +/- 3.9 de LSK) que les cellules $\text{Tet2}^{-/-}$ jeunes (2.5% +/- 0.3 de CSH et 22% +/- 1.8 de LSK) (Fig. 9 B). De plus, les cellules $\text{Lin}^- \text{Tet2}^{-/-}$ de 8-10 mois ont une capacité clonogénique 2.3 fois et 1.8 fois plus importante que les cellules Lin^- WT du même âge ou $\text{Tet2}^{-/-}$ jeunes, respectivement (Fig. 9 C-D). Des expériences d'immunofluorescence montrent que la marque H3K9me2 est fortement augmentée dans les CSH des souris $\text{Tet2}^{-/-}$ âgées de 8-10 mois par rapport aux cellules $\text{Tet2}^{-/-}$ jeunes (2 fois) et WT du même âge (2.5 fois), suggérant un remaniement de la chromatine dans les cellules CSH $\text{Tet2}^{-/-}$ avec l'âge précédant le développement de la maladie (Fig. 9 E). Cette hausse de H3K9me2 dans les CSH $\text{Tet2}^{-/-}$ âgées de 8-10 mois pourrait les rendre plus sensibles à la combinaison DAC+UNC0638. Afin de tester cette hypothèse, les cellules Lin^- des trois groupes de souris ont été traitées ou non avec DAC et/ou UNC0638, ou CM-272. La combinaison permet de réduire de façon significative l'expansion des cellules $\text{Lin}^- \text{Tet2}^{-/-}$ plus âgées après 8 jours de culture liquide (Fig. 9 F). Les cellules $\text{Lin}^- \text{Tet2}^{-/-}$ jeunes semblent également sensibles à la combinaison (réduction de 20% en moyenne +/- 1.4, n=4) mais cette sensibilité reste moins forte que celle des $\text{Lin}^- \text{Tet2}^{-/-}$ âgées (baisse de 35% +/- 4, n=5) (Fig. 9 F). Les inhibiteurs seuls (DAC ou UNC0638) n'ont aucun effet sur la prolifération (Fig. 9 F) ou le maintien en culture des CSH des $\text{Tet2}^{-/-}$ quel que soit leur âge (Fig. 9 G). Contrairement aux cellules $\text{Lin}^- \text{Tet2}^{-/-}$ de 2 mois, la capacité clonogénique des cellules $\text{Lin}^- \text{Tet2}^{-/-}$ de 8-10 mois est réduite par la combinaison alors que les traitements individuels n'ont pas d'effets (Fig. 9 H-I). Les cellules WT âgées de 8-10 mois ne sont pas affectées par les différents traitements en culture liquide et en méthylcellulose (Fig. 9 F-I). L'ensemble de ces données mettent en évidence que la perte de *Tet2* seule dans les cellules hématopoïétiques immatures murines conduit avec l'âge à une augmentation de H3K9me2 et une sensibilité sélective à la combinaison HMA et inhibiteur de H3K9me2.



H.



I.

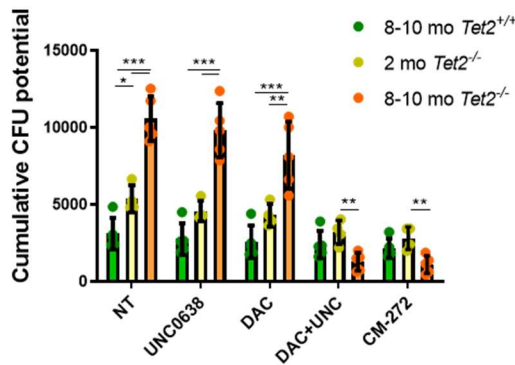


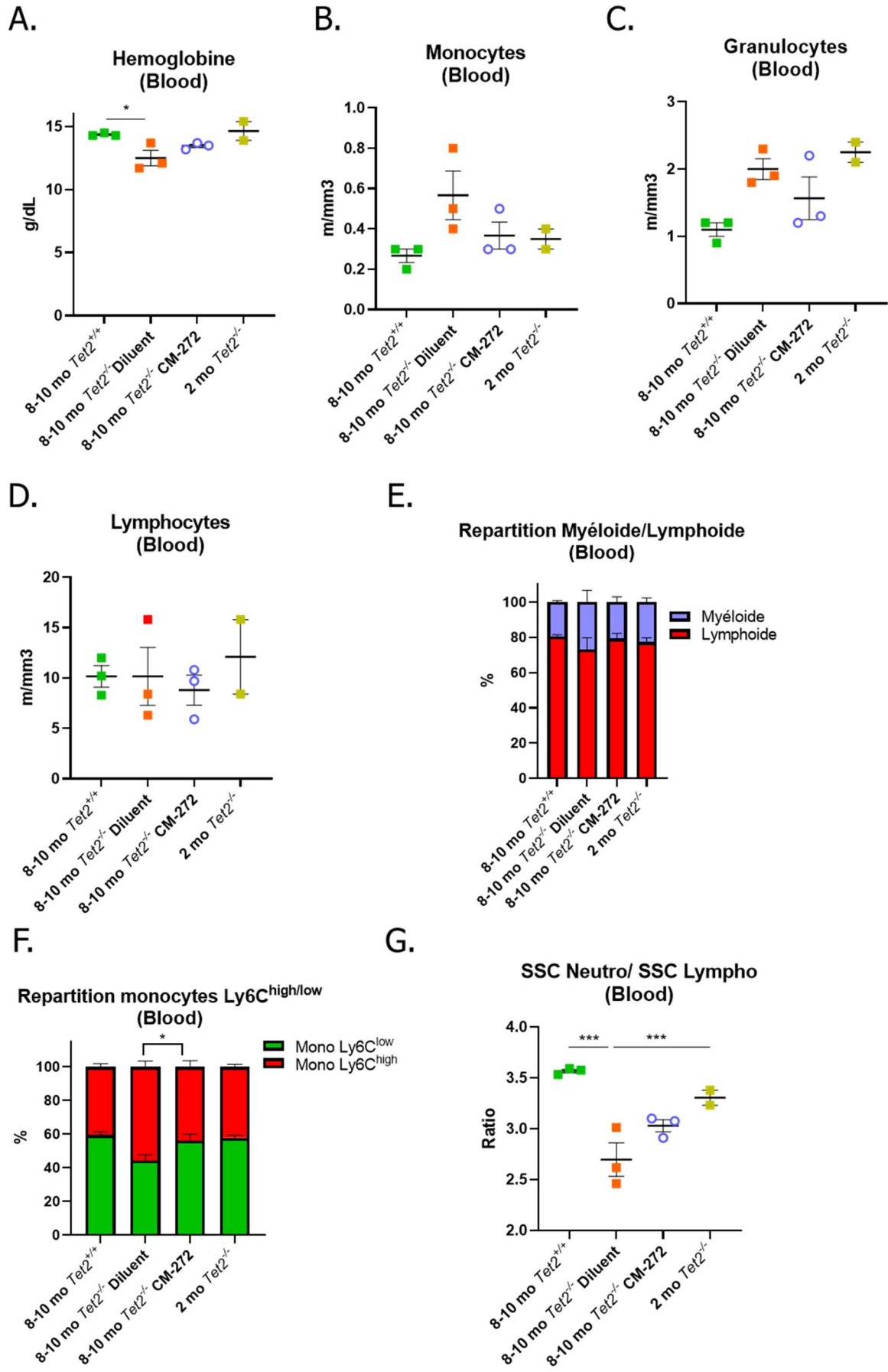
Figure 9. Augmentation de la marque H3K9me2 et de la sensibilité à la combinaison DAC+UNC0638 des CSPH *Tet2*^{-/-} avec l'âge.

(A-B) Etude du comportement des cellules hématopoïétiques murines dans les trois groupes de souris *Tet2*^{+/+} âgées de 8-10 mois, *Tet2*^{-/-} âgées de 2 mois et 8-10 mois : (A) Expansion des cellules Lin⁻ en culture liquide ; (B). Répartition des différentes populations LK (Lin⁻ Kit⁺, progéniteurs myéloïdes), LSK (Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺, CSH et progéniteurs multipotents), CSH (LSK CD34⁻ Flk2⁻) parmi les cellules vivantes après 8 jours de culture de liquide; (C-D) Etude de la clonogénicité des Lin⁻ en méthylcellulose; (C) Nombre de colonies formées à partir de 10 000 cellules lors des passages P1, P2, P3, P4, P5; (D) Potentiel clonogénique cumulatif; (E) Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence de H3K9me2 dans les CSH, rapportée à la moyenne de celle des CSH *Tet2*^{+/+} âgées de 8-10 mois; Echelle : 3 μm. La quantification est réalisée en utilisant le logiciel ImageJ. (F à I) Effets des traitements (UNC0638, 1 μM; DAC, 10 nM; CM-272, 200 nM) (F-G) après 8 jours de culture sur (F) l'expansion des cellules Lin⁻ par rapport au jour 0; (G) le pourcentage de CSH parmi les cellules vivantes; (H-I) la clonogénicité en méthylcellulose : (H) nombre de colonies dans une condition donnée rapporté au nombre de colonies dans la condition NT après plusieurs passages (P1, P2, P3) ; (I) potentiel clonogénique cumulatif. Moyenne +/- SEM. One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001.

L'inhibiteur double CM-272 freine les changements hématologiques observés dans les souris *Tet2*^{-/-} avec l'âge

Dans le but de déterminer si la combinaison HMA et inhibiteurs de G9A/GLP est capable de prévenir les altérations hématopoïétiques et/ou d'en empêcher la progression de la maladie avec l'âge nous avons ensuite traité *in vivo* les souris *Tet2*^{-/-} âgées de 8-10 mois, soit avec le CM-272 (2.5 mg/ kg ; injection i.p. 3 fois par semaine pendant 7 semaines), soit avec l'agent diluent seul. Les paramètres hématologiques, la prolifération et la clonogénicité des progéniteurs ont été étudiés après 1 semaine après l'arrêt du traitement et comparés à ceux des souris WT du même âge et des souris *Tet2*^{-/-} jeunes (2 mois). Cette expérience préliminaire suggère que dès 8-10 mois d'âge les souris *Tet2*^{-/-} présentent des défauts dans le sang, tels qu'une légère anémie et une augmentation des pourcentages et des valeurs absolues de monocytes et de granuleux par rapport aux souris WT du même âge ou au souris *Tet2*^{-/-} jeunes (Fig. 10 A-D et S4 A-E). L'analyse en cytométrie de flux confirme une diminution du rapport lymphocytes sur myéloïdes et montre une augmentation de la proportion monocytes classiques Ly6C^{high} par rapport aux monocytes LY6C^{low}, anomalie caractéristique des patients atteints de LMMC (Selimoglu-Buet et al. 2015; 2018) (Fig. 10 E-F). La diminution du rapport de granulométrie des neutrophiles par rapport aux lymphocytes suggère également une dysplasie dans cette population (Fig. 10 G). L'injection de CM-272 restaure en partie ces anomalies, ramenant tous les paramètres proches de ceux des souris WT âgées ou *Tet2*^{-/-} jeunes. (Fig. 10 A-G). L'analyse des cellules matures dans la moelle osseuse au sacrifice des souris confirme ces résultats (Fig. S4 F-I). L'analyse des compartiments immatures indique une augmentation des fréquences de Lin⁻, de CSPH (LSK) et des progéniteurs multipotents (MPP) (mais pas des CSH SLAM, LSK CD150⁺CD48⁻) dans les *Tet2*^{-/-} dès 8-10 mois par rapport WT du même âge ou aux *Tet2*^{-/-} jeunes (Fig. 10 H-L). Ces anomalies sont partiellement corrigées, par le traitement CM-272 (Fig. 10 H-L). Enfin, l'injection du CM-272 a permis de réduire l'augmentation de la prolifération *ex vivo* et la clonogénicité des cellules Lin⁻ des souris *Tet2*^{-/-} âgées (Fig. 10 M-N).

L'ensemble de ces résultats suggère que les souris *Tet2*^{-/-} âgées de 8-10 mois commencent à développer des caractéristiques d'une maladie ressemblant à la LMMC qui sont ralenties par le traitement CM-272 *in vivo*. Ces expériences sont en cours de confirmation sur des cohortes d'animaux plus grandes. De plus, les moelles des 4 groupes de souris ont été utilisées dans des greffes compétitives afin de déterminer si le traitement CM-272 a affecté l'auto-renouvellement des cellules *Tet2*^{-/-}.



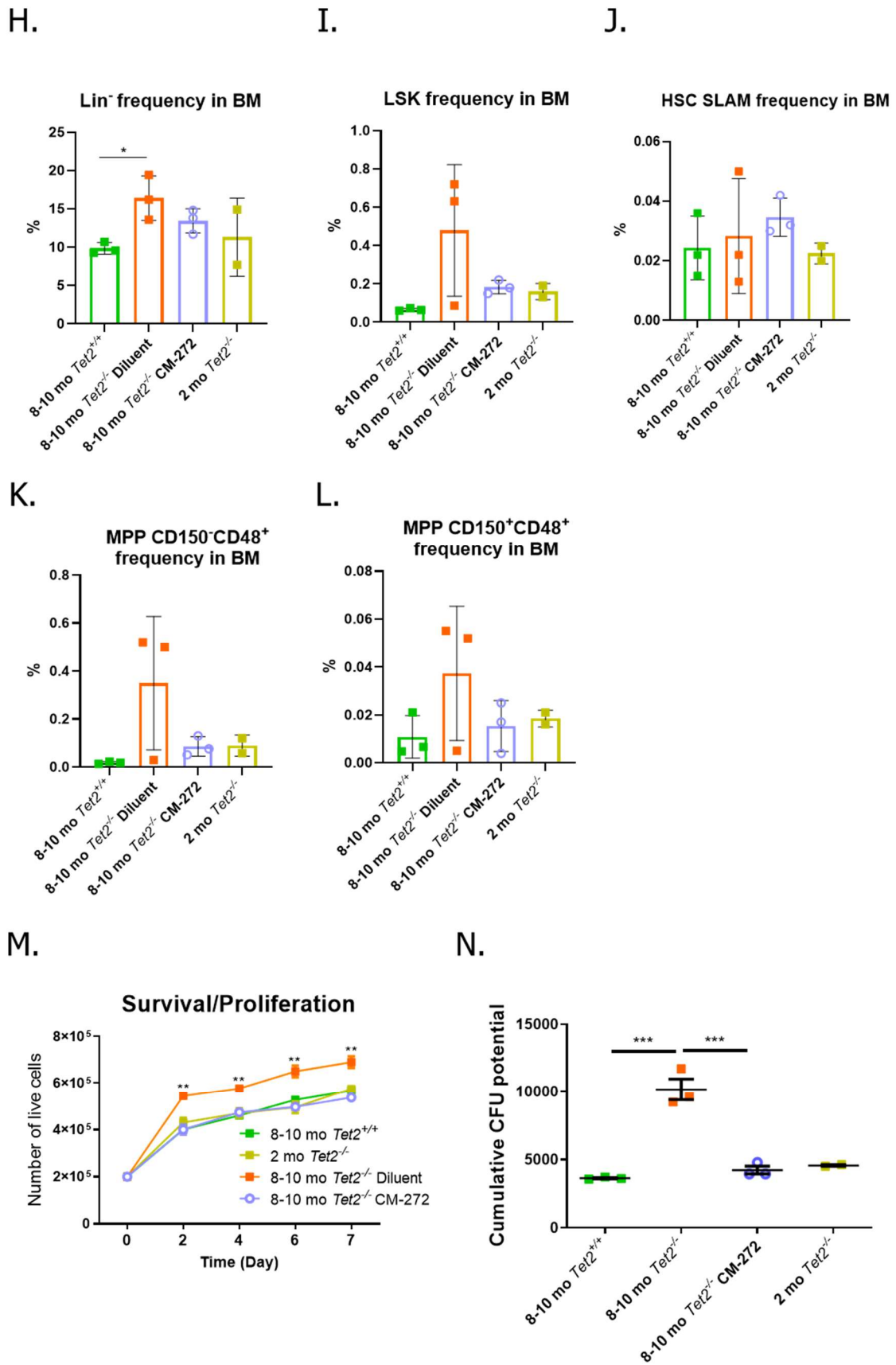


Figure 10. Effet du CM-272 in vivo dans les souris *Tet2*^{-/-}.

(A-J) Etude des paramètres sanguins (A-G) et médullaires (H-K) des souris *Tet2^{-/-}* de 8-10 mois ayant reçu le diluant ou le traitement CM-272, en comparaison à des souris WT du même âge et des souris *Tet2^{-/-}* jeunes (2 mois) : (A-D) mesure au sein de toutes les cellules sanguines de (A) l'hémoglobine (g/dL), (B-D) du nombre (millions/mm³) de (B) monocytes, (C) granulocytes, (D) lymphocytes ; (E-G). Analyse en cytométrie de flux des différentes populations. Répartition des cellules myéloïdes (monocytes et neutrophiles) et lymphoïdes (lymphocytes B et lymphocytes T) ; (F) Répartition des monocytes Ly6C^{high} et Ly6C^{low} ; (G) Rapport de la granularité des neutrophiles sur celle des lymphocytes ; SSC : *Side Scatter channel*; (H-L) Fréquence des populations immatures dans la moelle osseuse (*BM, bone marrow*) : (H) Lin⁻ ; (I) LSK (Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺) ; (J) CSH SLAM (LSK CD150⁺CD48⁻) ; (K-L) progéniteurs multipotents, MPP : (K) LSK CD150⁻ CD48⁺, (L) LSK CD150⁺CD48⁺. (M-N) Etude de la prolifération (M) en culture liquide et du (N) potentiel clonogénique cumulatif en méthylcellulose des cellules Lin⁻ issues des différents groupes de souris. Moyenne +/- SEM. One-way & Two-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison. * p<0.05; **p<0.01;***p<0.001.

Figures supplémentaires

Figure S1. related to Figure 5

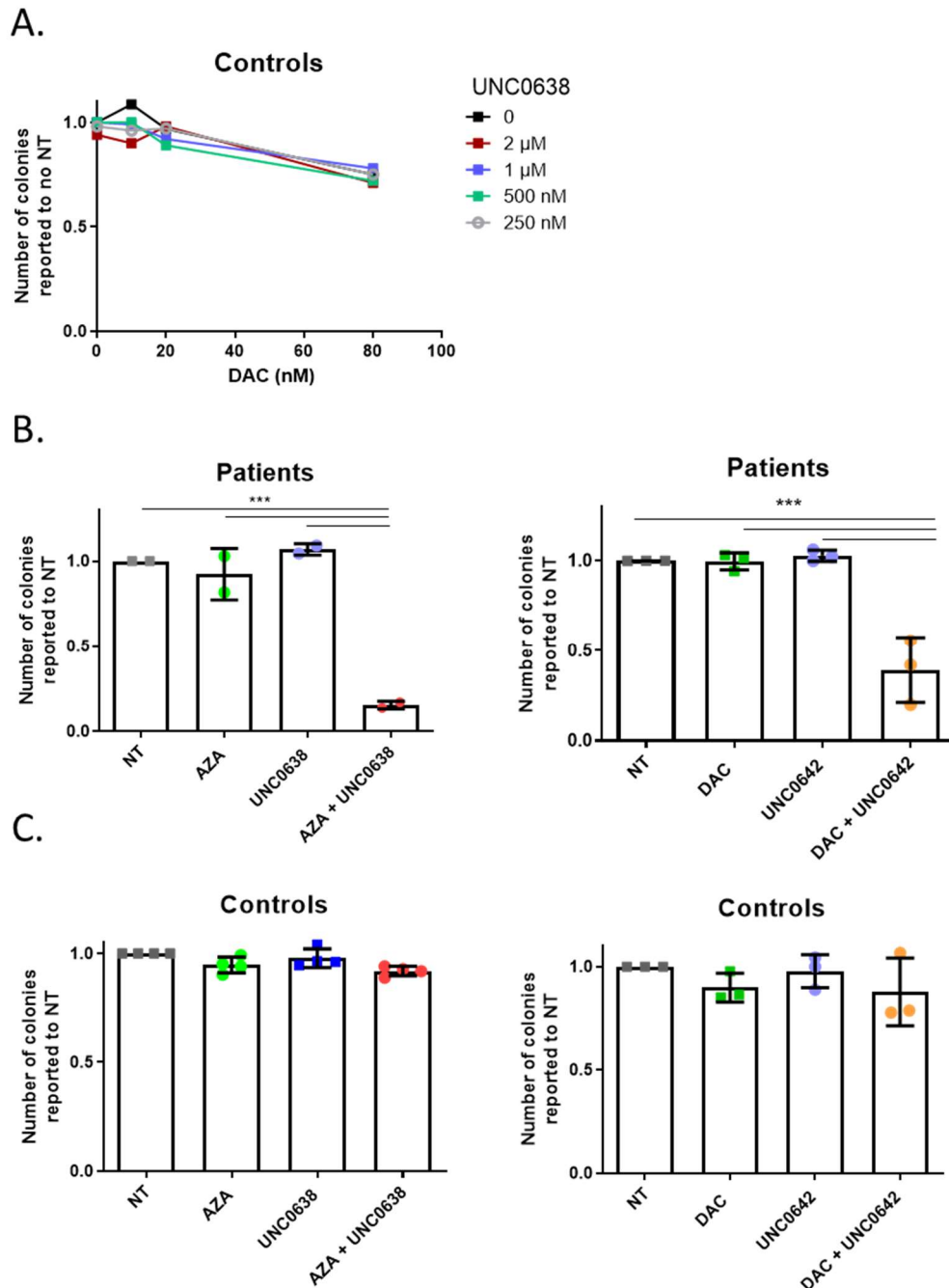


Figure S1.

(A) Etude de l'effet dose-réponse du DAC et de l'UNC0638 sur la formation de colonies formées en méthylcellulose à partir de cellules CD34⁺ d'un sujet âgé sain; (B-C) Effet des HMA (DAC, 10 nM; 5-AZA, 500nM) et des inhibiteurs de H3K9 di-méthyltransférase (UNC0638, 1 μ M; UNC0642, 2 nM) sur la formation des colonies en méthylcellulose issues de CD34⁺ de patients (B, n=2-3) et de sujets sains (C, n=3-4). Moyenne +/- SEM. One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison. ***p<0.001.

Figure S2. related to Figure 6

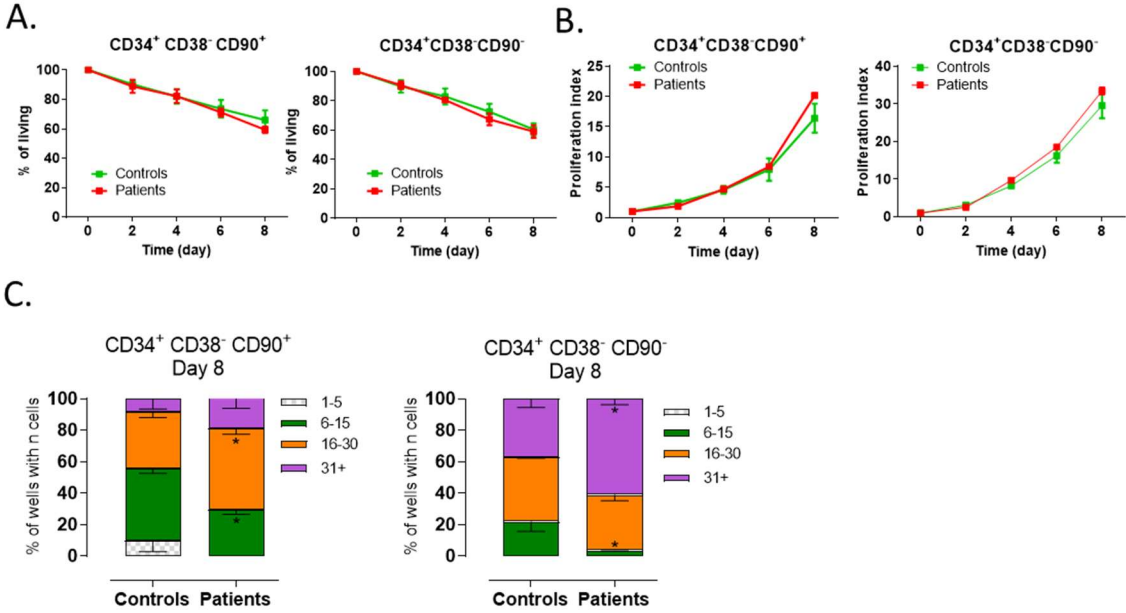


Figure S2.

(A) Etude du comportement des CD34⁺CD38⁻CD90⁺ et CD34⁺CD38⁻CD90⁻ de patients (n=3) et de contrôles (n=2) en culture liquide à l'échelle unicellulaire en absence de traitement : (A) viabilité ; (B) prolifération cellulaire ; (C) répartition du nombre de cellules formées dans chaque puits. Moyenne +/- SEM. One-way ANOVA & Two-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison. * p<0.05.

Figure S3. related to Figure 8

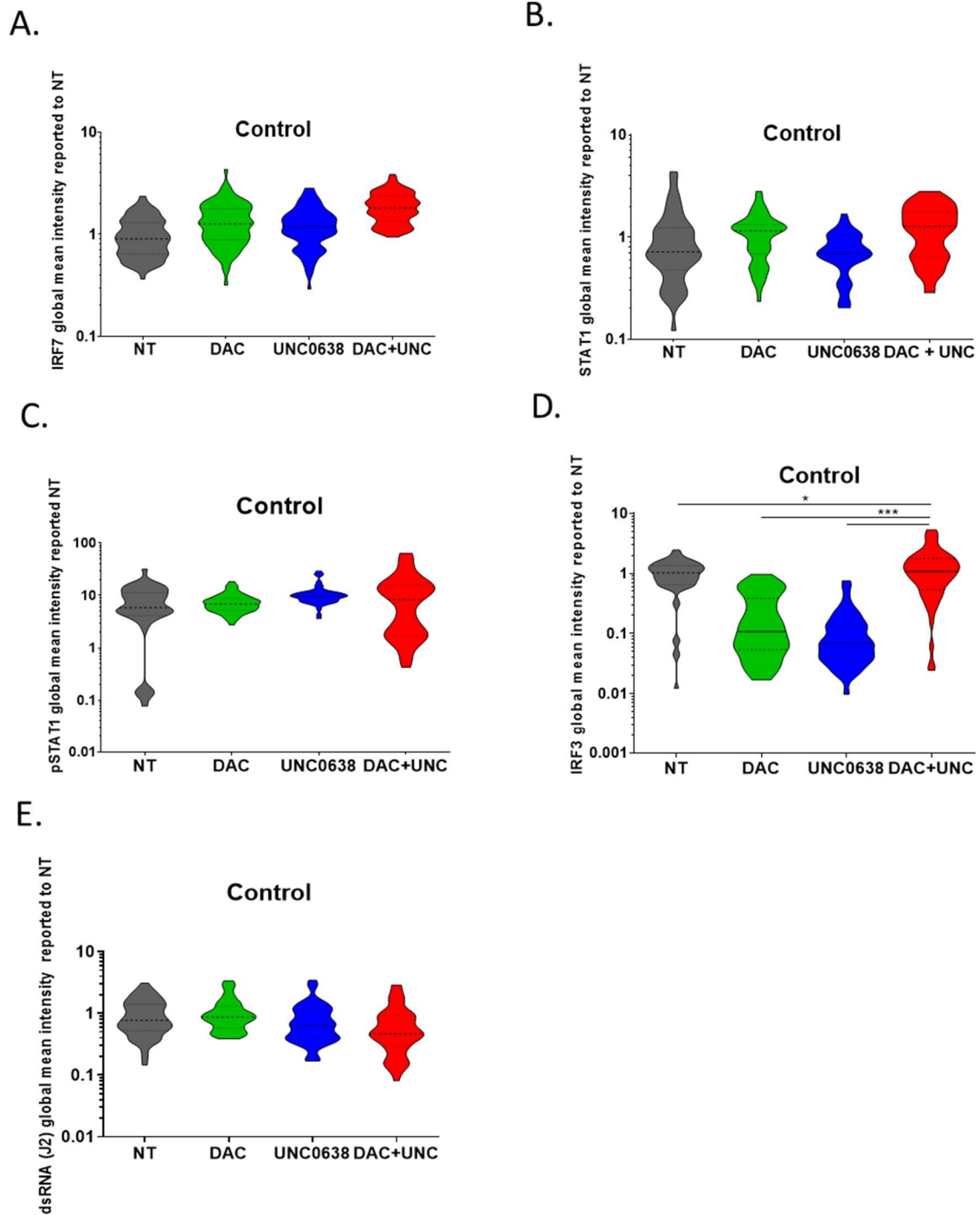


Figure S3.

Quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence (A) IRF7, (B) STAT1, (C) pSTAT1, (D) IRF3, (E) dsRNA avec l'anticorps J2 dans les CD34⁺ d'un sujet âgé (n=1) après 4 jours de culture. Les intensités ont été rapportées à la moyenne de celle obtenue dans la condition NT; La quantification est réalisée en utilisant le logiciel ImageJ. One-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison. * p<0.05;***p<0.001.

Figure S4. related to Figure 10

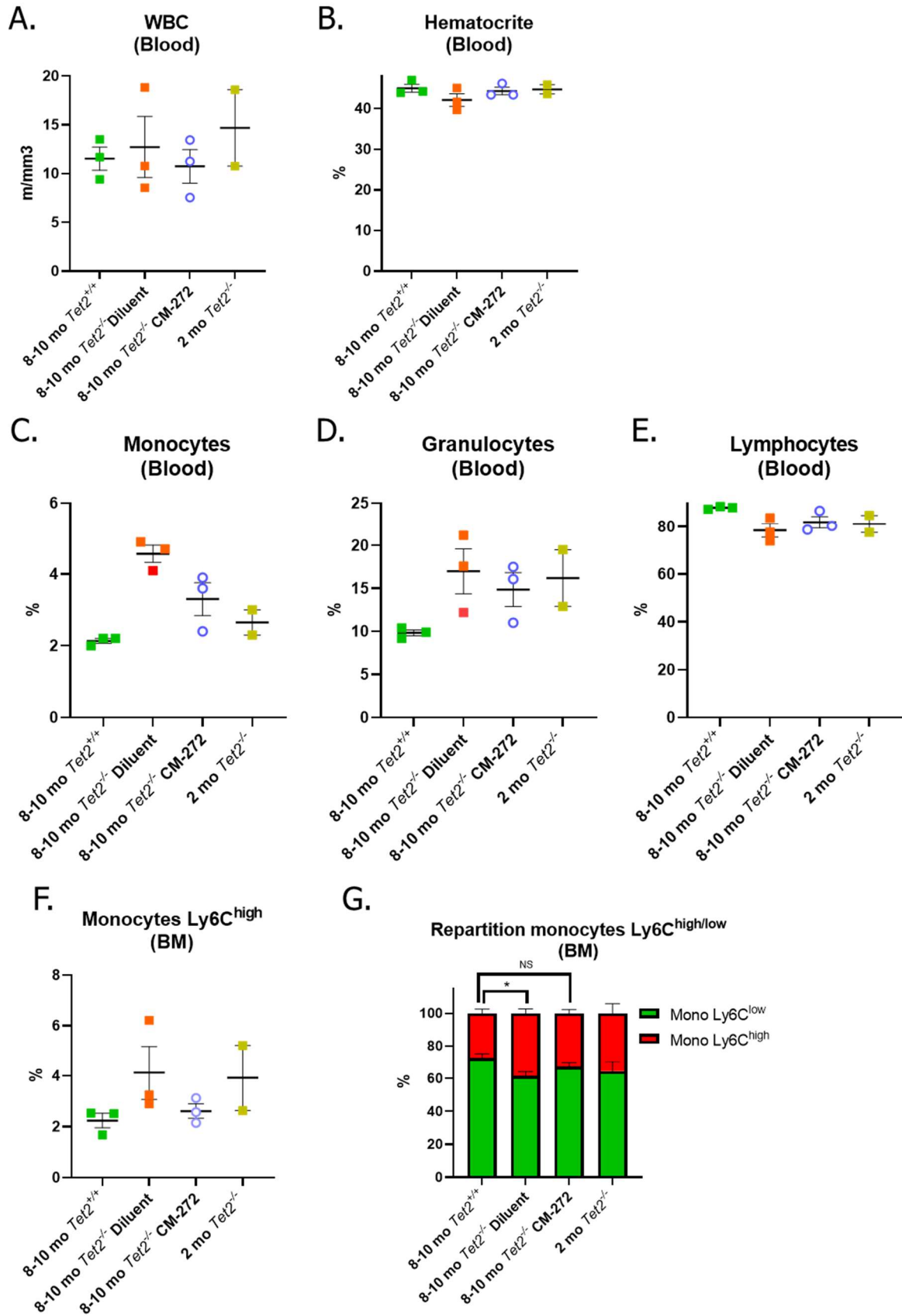


Figure S4. related to Figure 10

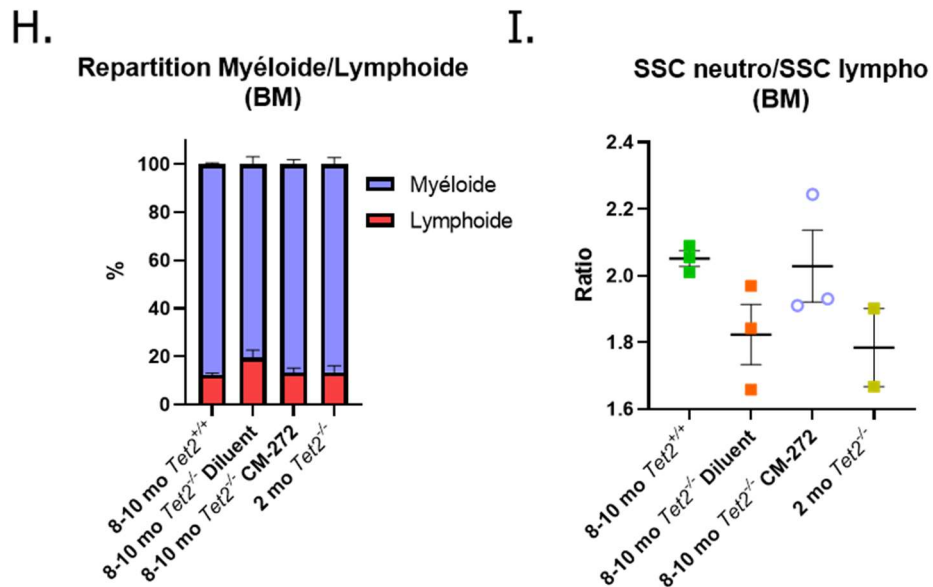
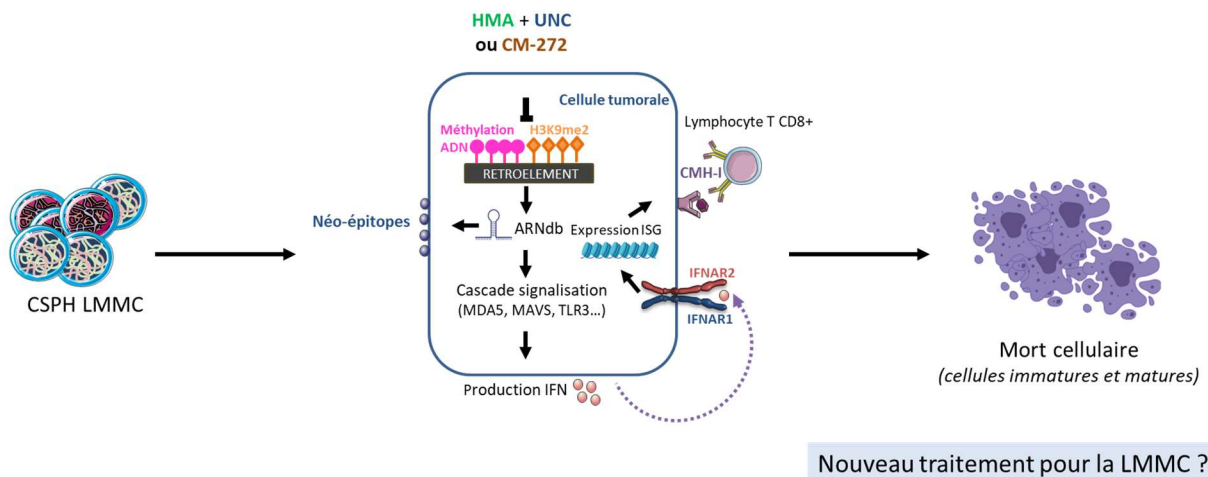


Figure S4.

(A-E) Etude des paramètres sanguins (A-E) et médullaires (F-L) des souris *Tet2*^{-/-} de 8-10 mois ayant reçu le diluant ou le traitement CM-272 en comparaison à des souris WT du même âge et des souris *Tet2*^{-/-} jeunes (2 mois) : (A-E) paramètre sanguins : (A) leucocytes (*WBC*, *white blood cell*), (B) hématocrite (%); (C) monocytes (%), (D) granulocytes (%), (E) lymphocytes (%); (F) monocytes *Ly6C*^{high} (%) dans le sang mesuré par cytométrie de flux. (G) répartition des monocytes *Ly6C*^{high} et *Ly6C*^{low} dans les monocytes ; (H) répartition des cellules myéloïdes et lymphoïdes ; (I) Rapport de la granularité des neutrophiles sur celles des lymphocytes ; SSC : *Side Scatter channel*, obtenu par cytométrie en flux. Moyenne +/- SEM. One-way & Two-way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison. * p<0.05; **p<0.01;***p<0.001.

Conclusion (partie 2)

Ce travail a permis de mettre en évidence un mécanisme de résistance aux HMA dans les CSPH de patients LMMC. En effet, nous avons montré que les CSPH présentaient des altérations de l'hétérochromatine, en particulier une hausse de la marque H3K9me2 qui limitait l'expression des ERV, leur donnant le moyen d'échapper au système immunitaire et entraînant une résistance aux HMA. Le traitement par la combinaison de HMA et des inhibiteurs de H3 K9 di-méthyltransférases a permis de réduire drastiquement voir d'éradiquer les clones mutés LMMC. La mort des cellules LMMC induite par le double traitement est causée au moins en partie par l'activation de la signalisation IFN et d'une réponse immune. La combinaison a permis également de ralentir le développement d'un phénotype proche de la LMMC dans des souris *Tet2*^{-/-} âgées de 8-10 mois. Ces résultats très encourageants ouvrent des perspectives thérapeutiques pour cette maladie quasi-incurable.



Discussion/Perspectives

1. Les altérations de l'hétérochromatine dans les CSH avec l'âge et dans une maladie liée au vieillissement, la LMMC

La perte progressive de l'hétérochromatine avec le vieillissement est une caractéristique partagée par plusieurs espèces : *Homo sapiens* (Djeghloul et al. 2016), *Mus musculus* (Djeghloul et al. 2016), *Drosophila melanogaster* (Brandt, Krohne, et Großhans 2008), *Caenorhabditis elegans* (Haithcock et al. 2005). Dans la littérature, très peu d'articles décrivent l'état de l'hétérochromatine dans les CSH. En 2016, Djeghloul et al. rapportent qu'avec l'âge les CSH murines et humaines présentent une diminution de H3K9me₃, une marque de l'hétérochromatine, qui est associée à une perte du potentiel de différenciation en lymphocytes B (Djeghloul et al. 2016). En collaboration avec l'équipe, ils mettent en évidence une augmentation de l'expression des éléments L1 récents dans les CSH âgées murines et une hausse des ERV et des séquences satellites dans les CSH âgées humaines. Cette étude ne décrit pas comment les RE impactent la différenciation des CSH. L'hétérochromatine dans les CSH n'a jamais également été examinée dans un contexte de stress tel que l'irradiation.

Nous rapportons que lors de l'irradiation mimant un état de vieillissement prématuré, les CSH murines expriment des forts niveaux d'ERV et des éléments L1 récents (L1Md) qui altèrent leur fonction (Barbieri et al. 2018; Pelinski et al. 2022). Nous montrons que l'irradiation induit la perte de H3K9me₃ dans les CSH (Pelinski et al. 2022). Il a été décrit que H3K9me₃ est enrichi dans les promoteurs de gènes n'ayant pas de lien avec l'hématopoïèse tel que *Fbp1* et *Fbp2* codant pour des enzymes impliquées dans la voie de la néoglucogenèse, générant une expression ectopique de ces gènes dans les CSPH déficients en SETDB1 (Koide et al. 2016). Étonnamment, nous révélons qu'une partie des changements transcriptomiques observés dans les CSH lors de l'irradiation, notamment la perte de nombreux gènes impliqués dans la fonction des CSH, n'est pas associée à la perte de H3K9me₃ au niveau des promoteurs mais est plutôt corrélée à la dérégulation des éléments L1 présent au sein des introns de ces gènes (Pelinski et al. 2022). Notre étude met en évidence pour la première fois l'implication de H3K9me₃ dans la répression des éléments L1 afin de préserver les gènes des CSH.

L'état de l'hétérochromatine dans les CSPH de patients atteints d'une maladie du vieillissement telle que la LMMC était jusqu'à notre étude inconnu. Nous observons que les CSPH de patients LMMC, présentent une réduction accentuée de H3K9me₃ par rapport aux sujets sains âgés. De plus, nous montrons une ouverture de la chromatine dans les éléments L1 et des séquences répétées telles que les séquences satellites qui pourrait être due à la baisse de H3K9me₃. En effet, une réduction de H3K9me₃ au

niveau des séquences répétées satellites est observée dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines en comparaison à des lignées cellulaires normales (Vojvoda Zeljko, Ugarković, et Pezer 2021). L'analyse des éléments transposables par RNA-seq et RT-qPCR dans les CD34⁺ de patients LMMC au diagnostic et des sujets sains âgés est en cours.

Dans les CSH âgées, la perte de H3K9me3 est due à une diminution de SUV39H1 dont l'expression est régulée par un miRNA appelé miR-125b (Djeghloul et al. 2016). Dans la LMMC, nous n'avons pas détecté de baisse significative d'expression de SUV39H1. La perte de H3K9me3 dans la LMMC pourrait être expliquée par la diminution d'autres H3K9 tri-méthyltransférases (H3K9 HMT) tel que SUV39H2, SETDB1, SETDB2 ou bien par l'augmentation de H3K9 déméthylases (KDM). Des expériences de RT-qPCR et des analyses des données de RNA-seq montrent des niveaux similaires des transcrits SUV39H2, SETDB1, SETDB2 et des KDM entre les patients atteints de LMMC et les sujets âgés sains. De plus, il est très peu probable que SUV39H2 soit impliqué car cet enzyme est fortement exprimé dans le cerveau, les testicules et le thymus et faiblement dans les autres tissus (Weirich, Khella, et Jeltsch 2021). La forme prédominante exprimée dans les CSH (CD34⁺) est SUV39H1 (Djeghloul et al. 2016). En ce qui concerne SETDB1, son niveau n'est pas altéré dans les CSH avec l'âge (Djeghloul et al. 2016). La perte des déméthylases *Kdm4* dans les souris entraîne une accumulation de H3K9me3 sur les sites d'initiation de la transcription et une diminution de l'expression de plusieurs gènes dont des gènes impliqués dans la préservation des CSH tel que *Taf1b* et *Nom1* (Agger et al. 2019). Les données de RNA-seq ne mettent pas non plus en évidence une hausse de l'expression de *KDM4* qui aurait pu expliquer la baisse de H3K9me3 dans les CD34⁺ de patients.

La protéine KAP1 est un corépresseur capable d'interagir avec plusieurs acteurs épigénétiques et notamment les H3K9 HMT tel que SUV39H1, SETDB1. Il induit la déposition de H3K9me3 aux ERV et gènes via l'association aux répresseurs KRAB-ZBP qui ont des sites de liaisons spécifiques sur ces séquences. Des expériences de RT-qPCR et d'immunofluorescence montrent une diminution de l'expression de KAP1 dans les CD34⁺ de patients atteints de LMMC en comparaison aux sujets âgés sains, suggérant l'implication de KAP1 au moins en partie dans la perte de H3K9me3 [Figure 1].

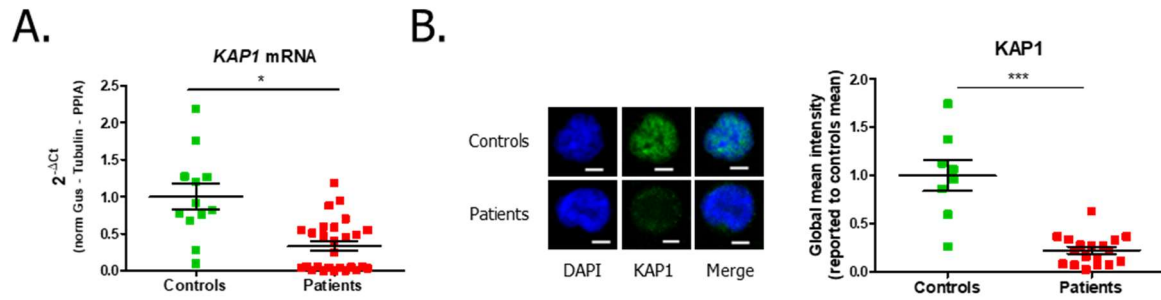


Figure 1. Diminution de l'ARNm et de la protéine KAP1 dans les CD34⁺ de patients atteints de LMMC.

(A) Niveau d'expression de l'ARNm mesuré par RT-qPCR de *KAP1* dans les cellules CD34⁺ (contrôles, n=12; patients, n=27) rapporté à la moyenne des contrôles. Les valeurs de Ct sont normalisées à la moyenne des gènes de ménages (Gus, Tubuline, PPIA). (B) Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence de la protéine KAP1 dans les cellules CD34⁺ (contrôles, n=8; patients, n=18) rapporté à la moyenne des sujets sains. Echelle : 3 μ m. Moyenne +/- SEM issues de 2 expériences indépendantes, *t* test. *, P<0.05 ; ***, P<0.001.

Nous rapportons grâce à des expériences d'immunofluorescence et de western blot une hausse de H3K9me2, une autre marque de l'hétérochromatine dans les CD34⁺ de patients LMMC. Les enzymes HMT G9A et GLP qui régulent l'expression de cette marque agissent en coopération et doivent ainsi être toutes les deux présentes pour déposer la marque H3K9me2 (Tachibana et al. 2005). Nous montrons que les protéines G9A et GLP sont augmentées dans les CD34⁺ de tous les patients contrairement aux transcrits *EHMT2* et *EHMT1* qui sont augmentés que chez certains patients. En 2021, Zhang *et al.* rapportent que la protéine SPOP interagit avec GLP pour favoriser sa dégradation par le protéasome dans le cancer de la prostate (J. Zhang et al. 2021). Bien que le gène *SPOP* ne soit pas muté dans la LMMC, son niveau d'expression pourrait être diminué et participer à la hausse de GLP et G9A. En accord avec cette hypothèse, nous avons mis en évidence une diminution des transcrits et de la protéine SPOP dans les CD34⁺ de patients, suggérant l'implication au moins partielle de SPOP dans la hausse de H3K9me2 [Figure 2]. Il serait intéressant de connaître comment le gène *SPOP* est régulé chez les patients LMMC en comparaison à des sujets sains âgés. Des expériences de bisulfite de sodium mesurant le niveau de méthylation du promoteur de *SPOP* pourraient permettre de répondre à cette question. Les expériences de RNA-seq sur des CD34⁺ de patients atteints de LMMC traités *in vitro* par l'agent hypométhylant, la décitabine (DAC) ne montrent pas d'augmentation de l'expression de *SPOP*, suggérant que le gène *SPOP* n'est pas réprimé par la méthylation.

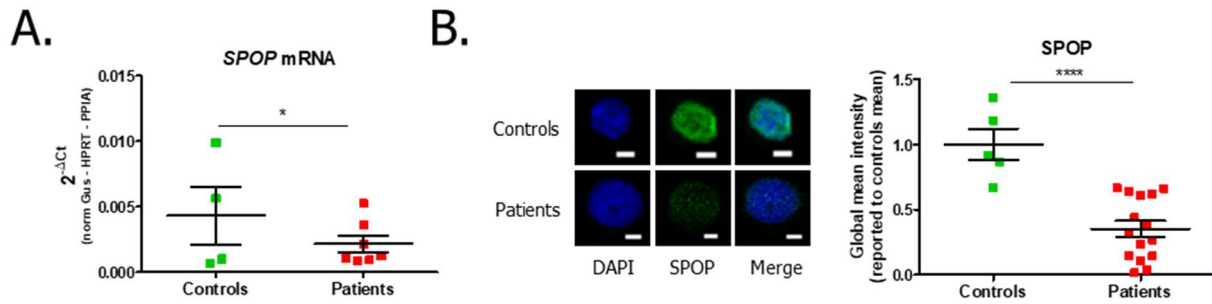


Figure 2. Diminution de l'ARNm et de la protéine SPOP dans les CD34⁺ de patients atteints de LMMC.

(A) Niveau d'expression de l'ARNm mesuré par RT-qPCR de *SPOP* dans les cellules CD34⁺ à l'état basal (contrôles, n=5; patients, n=7) rapporté à la moyenne des contrôles. Les valeurs de Ct sont normalisées à la moyenne des gènes de ménages (Gus, Tubuline, PPIA). (B) Représentation en images et quantification de l'intensité globale moyenne de l'immunofluorescence de la protéine SPOP dans les cellules CD34⁺ (contrôles, n=5; patients, n=15) rapporté à la moyenne des sujets sains. Echelle : 3 μ m. Moyenne +/- SEM. *t* test. *, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$.

Nous mettons en évidence une diminution de l'accessibilité de la chromatine au sein des introns, des régions intergéniques et des éléments répétés transposables (excepté au niveau des L1) dans les CD34⁺ de patients atteints de LMMC au diagnostic par rapport aux cellules des sujets sains âgés. Or les séquences répétées transposables sont réprimées par les marques H3K9me3 et H3K9me2. La perte de H3K9me3 ne suffit pas à ouvrir la chromatine des éléments transposables. Localisée dans les régions géniques (Tachibana et al. 2002; X. Chen et al. 2012), la hausse de H3K9me2 pourrait en partie compenser la perte de H3K9me3 au niveau des éléments transposables, notamment ceux situés dans les introns des gènes dans les CD34⁺ de patients. Des expériences de CHIP-seq / Cut&tag de H3K9me2 dans les CD34⁺ de patients et de sujets sains âgées sont en cours d'analyses et permettront de vérifier cette hypothèse.

2. Rôle des rétro-éléments dans l'hématopoïèse lors du vieillissement et dans les leucémies

La RE sont impliqués dans le vieillissement et aussi dans plusieurs pathologies incluant les cancers (H. S. Jang et al. 2019; Grundy, Diab, et Chiappinelli 2022; Pelinski et al. 2022).

Une des raisons du dysfonctionnement des cellules par les RE est la capacité de ces éléments à modifier le transcriptome. En effet, les RE sont capables d'agir en cis sur l'activité des gènes (Platt, Vandewege, et Ray 2018; Sundaram et Wang 2018; Hermant et Torres-Padilla 2021). Nous montrons que lors d'un vieillissement prématuré induit par l'irradiation, dans les CSH murines, la dérégulation des éléments L1 introniques provoquée par la perte de H3K9me3 bloque l'expression des gènes de CSH contenant ces éléments (Pelinski et al. 2022). La présence de H3K9me3, comme celle de la méthylation de l'ADN, dans le corps des gènes peut être une caractéristique de gènes transcriptionnellement actifs (Vakoc et al. 2005). En effet, H3K9me3 dans le corps des gènes conduit au ralentissement de l'ARN polymérase II et permet au complexe d'épissage, le spliceosome, de ne pas reconnaître uniquement les sites d'épissages canoniques, mais aussi les sites accessoires et ainsi de favoriser l'épissage alternatif (Saint-André et al. 2011). Le statut épigénétique des RE peut donc également réguler l'expression des gènes et avoir un rôle dans les altérations fonctionnelles du profil transcriptome des cellules.

Dans des lignées de LAM, il est observé une augmentation de l'accessibilité de la chromatine dans certains RE qui jouent le rôle d' « enhancer » pour les gènes adjacents et dont l'expression conduit au phénotype de la maladie (Deniz et al. 2020). Dans le lymphome de Hodgkin, la dérégulation de RE à LTR peut avoir un rôle de promoteur et favoriser notamment l'expression de proto-oncogène (Lamprecht et al. 2010; Babaian et al. 2016).

Au-delà de ce rôle transcriptomique, les RE peuvent également altérer la stabilité génomique. En effet, la réactivation de certains RE peut amener à la réintégration dans le génome créant des dommages à l'ADN dans la cellule hôte. L'équipe a démontré précédemment que la rétro-transposition des éléments L1 induite par l'irradiation est impliquée dans la persistance de dommages à l'ADN et de la perte de fonction des CSH (Barbieri et al. 2018). L'accessibilité de la chromatine des éléments L1 dans les CD34⁺ de patients LMMC pourrait favoriser des altérations de l'ADN. Nous observons une augmentation des foci γ -H2AX dans les CD34⁺ de patients en comparaison à des sujets âgés sains, suggérant une forte instabilité génomique dans les CSH de LMMC [Figure 3]. Ces anomalies de l'ADN pourraient également être expliquées par la dérégulation des éléments répétés non transposables qui sont aussi une source d'instabilité génomique.

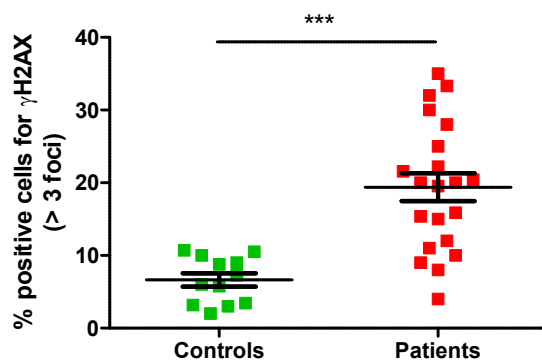


Figure 3. Présence de foci γ -H2AX à l'état basal dans les CD34⁺ de patients atteints de LMMC.

Quantification des images d'immunofluorescence de foci γ -H2AX dans les CD34⁺ (contrôles, n=12; patients, n=21) à l'état basal. Chaque point des graphiques représente le pourcentage moyen de cellules positives (ayant 3 foci ou plus) compté dans au moins 50 cellules par contrôle ou patient. Moyenne +/- SEM. T.test. ***, P<0.001.

Les RE déclenchent le développement d'une inflammation, pouvant perturber le

fonctionnement des cellules. Des souris *G3Terc*^{-/-} déficientes pour la télomérase ayant des caractéristiques similaires à des souris âgées ont une augmentation de l'expression des éléments L1, associée à une activation de la signalisation cGAS, de l'expression des gènes codant pour les IFN-I et des cytokines inflammatoires. Le traitement par un inhibiteur de la transcriptase inverse réduit la réponse IFN et l'inflammation et restaure la fréquence des CSH-LT, MPP dans les souris *G3Terc*^{-/-} (Ying Wang et al. 2020).

Les cytokines inflammatoires sont très élevées chez les patients LMMC (Niyongere et al. 2019). Pour créer un environnement inflammatoire, Wang *et al.* greffent de la moelle osseuse de souris *Nras*^{G12D} ayant un phénotype similaire à la LMMC dans des souris déficientes pour la télomérase *G3Terc*^{-/-}. Ils observent que le traitement par un inhibiteur de la transcriptase inverse chez les souris receveuses *G3Terc*^{-/-} réduit l'inflammation, atténue l'altération de l'hématopoïèse et prolonge leur survie (Ying Wang et al. 2020).

Ces résultats suggèrent l'implication des éléments L1 récents dans l'inflammation lors du vieillissement et aussi dans la LMMC.

Bien que ces différents rôles de RE (transcriptomique, instabilité génomique, inflammation) soient impliqués dans le développement des tumeurs, ils créent également de la dépendance et sont ainsi une source de vulnérabilité pour les cancers. Les observations cliniques indiquent qu'environ 50% des cancers exprimant des

éléments L1 actifs présentent des mutations de *TP53*, ce qui suggère qu'ils ont réussi à les désarmer (Rodić et Burns 2013; Kelsey 2021). Ces données mettent en lumière le rôle suppresseur de tumeur des éléments L1 à partir d'un certain niveau de dommages à l'ADN et d'inflammation.

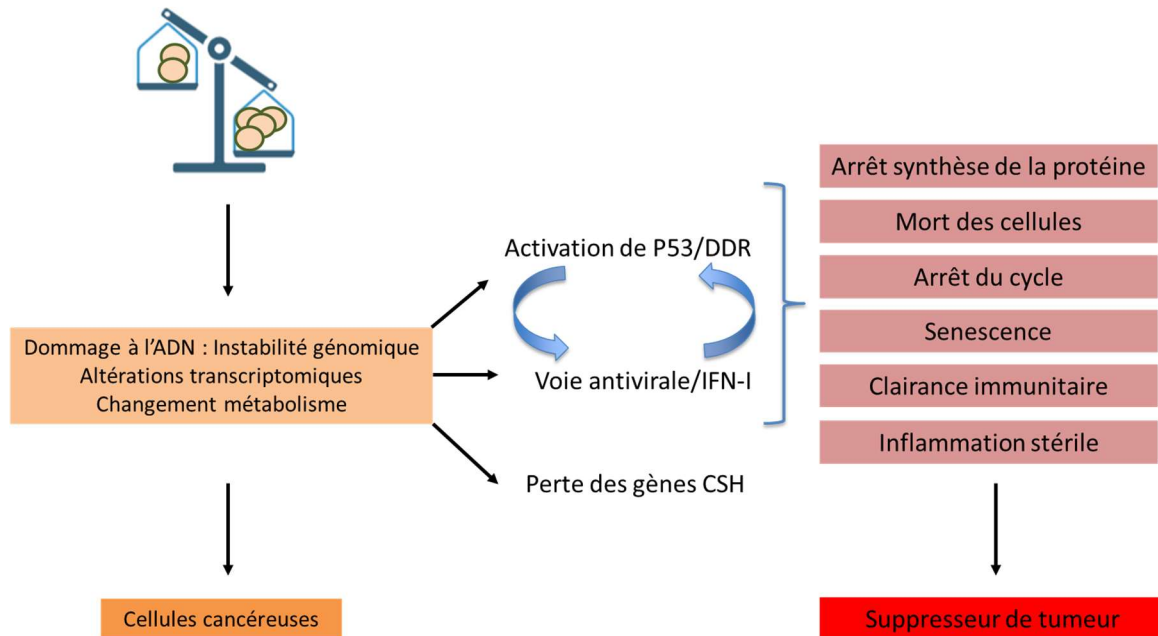


Figure 4. Les rétro-éléments, deux rôles antagonistes : oncogène et suppresseur de tumeurs.

Les RE en induisant des dommages à l'ADN, des altérations transcriptomiques et des changements métaboliques participent au développement de cancer. Ces altérations générées par les RE sont également capable d'activer des voies suppresseurs de tumeurs telles que l'activation de *TP53*, la réponse aux dommages à l'ADN (DDR, DNA Damage Response), l'induction d'une voie antivirale, qui conduisent suivant les cas à la mort des cellules, l'arrêt du cycle, la senescence, la clairance immunitaire, l'inflammation stérile.

3. La coévolution entre les RE et les gènes immunitaires

Des études récentes font resurgir la théorie selon laquelle les RE sont cooptés pour la régulation des gènes de l'hôte (Chuong, Elde, et Feschotte 2016). Au cours de l'évolution, la mobilisation des RE a entraîné la création d'un réseau de régulation qui a su s'adapter pour cohabiter avec les gènes de l'hôte. Non seulement les RE sont capables d'activer des facteurs de transcription des voies IFN et NF- κ B mais les gènes cibles de l'IFN et de NF- κ B sont aussi des acteurs antiviraux qui éliminent les parasites génomiques exogènes et endogènes (les RE) et participent au contrôle immunitaire (Schneider, Chevillotte, et Rice 2014; Gazquez-Gutierrez et al. 2021). Par exemple

MER41 est localisé à 220 pb en amont de l'ISG *AIM2* qui est impliqué dans la détection ADN-db cytosolique (Chuong, Elde, et Feschotte 2016). L'élément *MER41* fournissant un site de liaison au facteur de transcription STAT1 est activé en réponse à l'IFN.

A l'inverse, l'équipe a précédemment mis en évidence que la signalisation IFN-I dépendante de STAT1 et de STAT2 et induite par la TPO empêche l'expression des éléments L1 et leur rétro-transposition dans les CSH (Barbieri et al. 2018). Nous montrons que les éléments L1 récents dérégulés par l'irradiation et présents dans les introns des gènes ayant un rôle dans la fonction des CSH, abritent des sites de liaison NF- κ B. De plus, nous mettons en évidence qu'en plus des gènes de maintenance des CSH, de nombreux gènes ayant un rôle dans les voies immunes (IFN, NF- κ B, suppression des cellules T) tels que *Birc2*, *Tnfrsf9*, *CD274 (PD-L1)* font également partie des gènes présentant un élément L1Md intronique avec des sites NF- κ B et dont l'expression est diminuée par l'irradiation. Le TNF- α , une cytokine pro-inflammatoire, capable d'activer la voie NF- κ B, permet de restaurer le niveau de H3K9me3 au niveau des L1Md, favorisant l'expression des gènes de CSH. Ces résultats apportent un argument supplémentaire dans les relations causales entre les RE et les gènes immunitaires, ainsi que leur coévolution.

Il est décrit que les gènes immunitaires présentent un nombre élevé de RE, ce qui suggérerait une pression de sélection ayant conduit à la cooptation des RE et des gènes afin d'accélérer la création des réseaux de régulation immunitaire au cours de l'évolution (Ye et al. 2020). Il est également observé un enrichissement des jeunes RE dans les régions actives des cellules sanguines en comparaison à d'autres tissus (Trizzino, Kapusta, et Brown 2018). Nous montrons que le motif NF- κ B est spécifiquement enrichi dans les L1Md qui sont présents dans les gènes de la signature CSH et, dans les signatures « leucocytes » et « cellules myéloïdes » en comparaison aux gènes enrichis dans le placenta, les testicules, les glandes salivaires, les reins, le pancréas, le foie. Ces observations suggèreraient une sélection active des sites NF- κ B dans les L1Md présents au niveau des gènes essentiels des CSH afin de renforcer l'immunité en engageant beaucoup de gènes. De plus, ce réseau de régulation permettrait de préserver les CSH tout en favorisant l'expression de gènes immunitaires par exemple au cours de la régénération myéloïde induite par le TNF- α /NF- κ B (Yamashita et Passegué 2019).

Les RE sont une arme à double tranchant qui sont bénéfiques pour l'hôte dans certaines situations et également néfastes dans d'autres circonstances. La signalisation inflammatoire induite par les RE est nécessaire au développement des CSH durant l'embryogenèse (Lefkopoulos et al. 2020). Les CSH de patients atteints de LAM ont des

niveaux élevés de TNF- α (Sanchez-Correa et al. 2013). On peut imaginer qu'en augmentant l'expression des éléments L1Md par des traitements épigénétiques dans ces CSH malades, cela pourrait altérer leur fonction et aboutir à leur mort cellulaire. Cet équilibre entre l'expression des RE et des gènes de l'hôte peut être également perturbé au détriment de l'hôte. Une suractivation de la voie IFN a été décrite dans des maladies auto-immunes telles que le syndrome d'Aicardi-Goutières qui est causé par l'accumulation d'ADN-db n'ayant pas pu être éliminés par l'exonucléase TREX1 mutée dans cette pathologie (Y. J. Crow et al. 2006; Stetson et al. 2008).

Ces données mettent en lumière que la compréhension des relations complexes des RE avec l'hôte pourrait permettre de développer des approches thérapeutiques.

4. Mécanismes d'échappement à l'effet suppresseur de tumeurs RE

Les cellules cancéreuses développent des mécanismes de protection à l'effet suppresseurs de tumeur des RE. Les cellules souches leucémiques (CSL, CD34⁺CD38⁻CD99⁻TIM3⁻) de LAM présentent un faible niveau global de l'expression de RE (ALU, ERVK, ERVL, ERV3 etc...) en comparaison à des CSH pré-leucémiques (CD34⁺CD38⁻CD99⁺TIM3⁺) et des blastes leucémiques (CD99⁻TIM3⁻ CD45^{mid} SSC^{high}) (Colombo et al. 2017). De plus, les SMD de haut grade ont une plus forte restriction d'expression des RE par rapport à des SMD de faible grade (Colombo et al. 2017). Les CSL de LAM ont également une inactivation des voies de l'immunité incluant les signatures de l'IFN et de NF- κ b, qui pourraient être impliquées dans le mécanisme d'évasion immunitaire observé dans cette pathologie (Colombo et al. 2017). Dans la LAM, plusieurs acteurs épigénétiques sont identifiés comme des éléments majeurs dans l'échappement immunitaire à travers la répression des RE. Le développement et la maintenance de la LAM est dépendant de la répression des éléments L1 par MPP8, un composant du complexe épigénétique répresseur HUSH (Zhimin Gu et al. 2021). La hausse de SETDB1 dans la LAM est impliquée dans le blocage de l'expression des RE, entraînant une inhibition de la voie IFN et de la mort cellulaire (Cuellar et al. 2017; Hansen et al. 2022). En effet, SETDB1 en régulant le niveau de H3K9me3 au RE joue un rôle critique dans la survie des cellules LAM (Cuellar et al. 2017). La marque H3K9me2 a aussi un rôle dans la protection des cellules LAM de l'activation de la voie IFN-I (T. C. Fang et al. 2012; Hansen et al. 2022). La stabilisation des H3K9 di-méthyltransférase G9A/GLP, impliquée dans la répression des RE et de l'inhibition de la signalisation IFN, nécessite la présence

de SUV39H1, démontrant une coopération des marques H3K9me3 et H3K9me2. La perte de SUV39H1 dans la LAM entraîne un ralentissement de la prolifération des cellules cancéreuses (Hansen et al. 2022). Nous observons que la hausse de H3K9me2 dans les CD34⁺ de patients LMMC est corrélée à un faible niveau de transcrits de RE. L'analyse des gènes a révélé également une diminution des voies de signalisation TNF- α via NF- κ B et IFN dans les CD34⁺ de patients LMMC par rapport à des sujets sains de même âge (*non montré*). L'inhibition directe des RE et la répression des signalisations IFN et TNF- α /NF- κ B sont des mécanismes d'échappement à l'effet suppresseur de tumeurs qui sont étroitement liées et non exclusifs. En effet, H3K9me2 peut restreindre l'expression des RE et ainsi empêcher l'activation des voies IFN et TNF- α /NF- κ B et/ou directement inhiber les gènes ayant un rôle dans ces voies tel que des *interferon stimulated genes* (ISG). Les données d'ATAC-seq en condition UNC0638 seul sont en cours d'analyses. Pour compléter ces résultats, des expériences de Cut&Tag H3K9me2 effectuées dans les CD34⁺ de patients LMMC au diagnostic et de sujets âgés sains sont également en train d'être étudiés afin de déterminer les changements dans l'intensité, la couverture et la localisation de cette marque au niveau des RE, des ISG et des gènes suppresseurs de tumeurs (GST).

Dans les cancers solides, SETDB1 participe également à l'évasion immunitaire en réduisant le niveau d'antigènes rétroviraux codés par les RE (Griffin et al. 2021). KDM5B, une déméthylase de H3K4, impliquée dans le maintien du mélanome, recrute SETDB1, pour réprimer les RE et participe au blocage de l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale (S.-M. Zhang et al. 2021). PRMT7, une protéine arginine méthyltransférase, joue aussi un rôle dans l'échappement immunitaire en régulant négativement la voie IFN (RIG-I, MDA5) et la présentation d'antigénique (Srour et al. 2022)

En dehors des acteurs épigénétiques, des protéines de régulation de la signalisation IFN sont impliqués dans l'évasion immunitaire. Il est décrit que les cellules LAM sont dépendantes à IRF2BP2 (*Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2*), une protéine qui réprime la signalisation IL1- β /TNF- α via NF- κ B et ainsi empêche le déclenchement d'une signalisation inflammatoire intrinsèque à la cellule tumorale (Ellegast et al. 2022).

La dépendance des cellules cancéreuses à certains acteurs épigénétiques et de la signalisation IFN crée de la vulnérabilité, ce qui ouvre de nouvelles opportunités thérapeutiques.

5. Causes de la résistance aux traitements hypométhylants de l'ADN (HMA)

En 2015, deux équipes ont montré que l'efficacité antitumorale des agents hypométhylants de l'ADN (HMAs) pouvait être attribuée à l'induction d'un état mimant une infection virale, conséquence de la réactivation anormale de RE. En effet, les HMAs induisent la production d'ARN-db, causant une réponse IFN de type I et l'apoptose (Chiappinelli et al. 2015; Roulois et al. 2015). Bien que les HMA soient efficaces chez 40-50% des patients atteints de LMMC et restaurent l'hématopoïèse, ils ne permettent pas d'éliminer le clone muté (Merlevede et al. 2016; Liapis et Kotsianidis 2021). Les patients LMMC initialement répondeurs aux HMA après 3 cycles de traitements rechutent avec une médiane de survie de 29 mois (12-37 mois) (Itzykson et al. 2018; Kwon 2021; Liapis et Kotsianidis 2021)

Nos résultats mettent en évidence que le traitement individuel des HMA cible uniquement les progéniteurs des patients LMMC en culture liquide et en méthylcellulose, confirmant l'inefficacité de ces traitements sur les CSH. Une des raisons pouvant expliquer la résistance aux HMA est l'absence d'induction de RE (M. Walter et al. 2016; M. Liu et al. 2018; Hansen et al. 2022; Patel et al. 2022). Bien que les RE soient réprimés par la méthylation de l'ADN, d'autres marques répressives telles que H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3 peuvent être présentes et empêcher la dérégulation des RE. Il faudrait mesurer le niveau des marques d'histone de l'hétérochromatine par immunofluorescence dans les CSH (CD34⁺CD38⁻CD90⁺) et dans les progéniteurs (CD34⁺CD38⁻CD90⁻) de patients LMMC au diagnostic afin de déterminer si la différence de sensibilité entre ces deux types cellulaires est due à une variabilité de l'état de l'hétérochromatine. Il est également possible que les HMA en provoquant la perte de la méthylation de l'ADN induit un mécanisme de compensation par l'arrivée d'autres marques répressives qui peuvent elles-mêmes provoquer un retour de la méthylation de l'ADN aux RE [Figure 5].

La résistance aux traitements HMA pourrait aussi par exemple être due à l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des ARN hélicases, connus pour se lier et dégrader les transcrits de RE et des gènes de l'autophagie, ayant également un rôle dans l'élimination des RE.

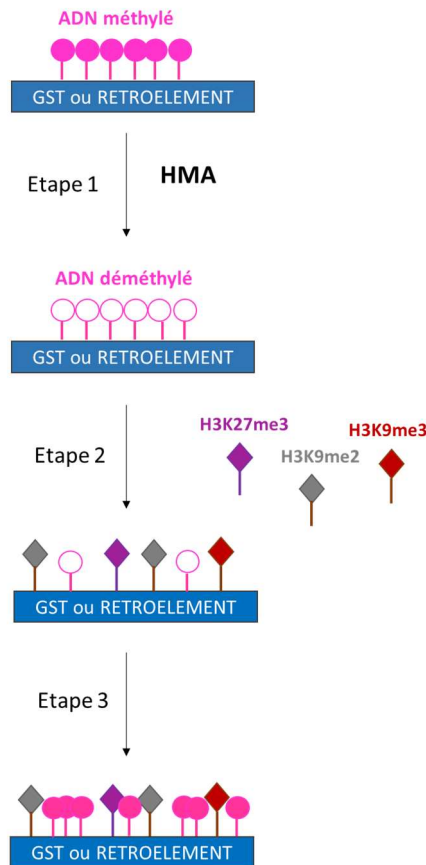


Figure 5. Le switch épigénétique, un mécanisme de résistance aux HMAs.

Etape 1 : Les gènes suppresseurs de tumeurs (GST) et les rétro-éléments sont déméthylés par les HMAs ; *Etape 2* : Les marques d’histone H3K27me3, H3K9me2, H3K9me3 sont déposées sur les GST et les rétro-éléments pour compenser la perte de la méthylation de l’ADN et ainsi réprimer l’expression ; *Etape 3* : La présence de ces marques d’histone peut favoriser le retour à la méthylation de l’ADN.

L’hyperméthylation de l’ADN responsable notamment de la répression des GST est un facteur impliqué dans l’augmentation de la sévérité des pathologies hématologiques en particulier dans la progression des SMD vers la LAM (Y. Jiang et al. 2009). L’échec des traitements HMA dans l’élimination des clones mutés en plus d’être observé dans la LMMC et également visible dans les SMD (Unnikrishnan et al. 2017; Ali et al. 2018). Les cellules CD34⁺ de patients atteints de SMD répondeurs aux HMA sont enrichis en cellules progénitrices contrairement à celles des non-répondeurs (Unnikrishnan et al. 2017). Les traitements HMA ciblent majoritairement des progéniteurs granulomonocytaires dans les SMD de haut grade et les LAM (Ali et al. 2018). Les patients LMMC répondeurs aux HMA présentent au diagnostic une forte expression des gènes associés au cycle cellulaire dans les CD34⁺ probablement contribuant à l’efficacité de l’incorporation des HMA (Meldi et al. 2015). Les CSH à la différence des progéniteurs

sont moins prolifératives que les progéniteurs, ce qui pourrait expliquer la résistance aux HMA des CSH.

L'inefficacité des HMA sur les CSH pourrait être due à la capacité intrinsèque de ces cellules à être résistantes aux infections virales. Les cellules souches y compris les CSH ont une réponse à l'IFN- α atténuée mais maintiennent de manière constitutive des niveaux élevés d'ISG ayant un rôle de protection antivirale (X. Wu et al. 2018; Barbieri et al. 2018). Tandis que les cellules différenciées ont une forte sensibilité à l'IFN, permettant d'induire des ISGs en cas d'infection et une résistance virale (X. Wu et al. 2018). Les cellules souches sont intrinsèquement protégées par la forte expression d'ISG car elles ont un microenvironnement souvent proche du sang qui augmente les risques d'exposition à des pathogènes (Doetsch et al. 1999; Kiel et al. 2005). De plus le potentiel antiviral est plus fort avec une expression constitutive des ISG, maintenant un état antiviral efficace qu'avec une stimulation par l'IFN (X. Wu et al. 2018). La faible sensibilité des cellules souches à l'IFN pourrait être expliquée par trois raisons. Premièrement, l'IFN pouvant stimuler la différenciation risquerait d'atténuer le pool de cellules souches (Hertzog, Hwang, et Kola 1994). Deuxièmement, selon le type de cellules souches, l'IFN- α peut avoir un effet anti-prolifératif qui est incompatible avec la fonction d'auto-renouvellement des cellules souches, de régénération tissulaire (Borden, Hogan, et Voelkel 1982). Dans le cas des CSH, l'IFN a un effet plutôt pro-prolifératif qui peut conduire à l'épuisement du pool de CSH quiescentes et également favoriser l'accumulation de dommages à l'ADN, ce qui peut altérer le potentiel des CSH (Barbieri et al. 2018). Troisièmement, l'IFN- α peut aussi sensibiliser les cellules à l'apoptose suite à une infection virale, ce qui peut être néfaste pour les cellules souches qui seraient amenées à exprimer des gènes apoptotiques (de Veer et al. 2001; X. Wu et al. 2018). Les cellules différenciées expriment des ISG de façon inductible et non intrinsèquement car la détection et la réponse face aux pathogènes dans ces cellules ne sont pas uniformes (X. Wu et al. 2018). Cela permet à l'hôte de libérer un spectre complet d'ISG afin d'atténuer l'infection locale et la propagation du virus (X. Wu et al. 2018). Ainsi les CSH de patients LMMC serait résistantes aux HMA car elles sont capables de supporter des forts niveaux de RE et ont une faible sensibilité à l'IFN, contrairement aux progéniteurs.

Les traitements HMA utilisés pour corriger les cytopénies chez les patients atteints de SMD peuvent accentuer la thrombocytopénie. Le traitement des patients SMD par Eltrombopag, un analogue de la thrombopoïétine (TPO) afin de remonter le taux de plaquettes en combinaison avec des HMA est contre-productif. En effet, il pourrait avoir un antagonisme pharmacodynamique entre l'AZA et l'Eltrombopag (Dickinson et

al. 2016). La TPO est une cytokine qui a un rôle important dans la prolifération des mégacaryocytes et la formation des plaquettes mais aussi dans le maintien et l'auto-renouvellement des CSH tout au long de la vie. De plus elle est capable d'induire une réponse antivirale de type IFN-I via STAT1 et STAT2 et de bloquer les RE dans les CSH murines ayant subi un stress tel que l'irradiation (Barbieri et al. 2018). Dans les CSH, la TPO est beaucoup plus efficace pour induire des ISG que l'IFN- α . L'inverse est observé dans les CSPH (données du laboratoire non publié), en accord avec les résultats de Wu et al. (X. Wu et al. 2018). La résistance aux HMA des patients LMMC pourrait ainsi être due à un défaut de la signalisation TPO dans les CSH, notamment une augmentation importante de la voie STAT1 par rapport aux voies de signalisation impliquées dans la mégacaryopoïèse telles que STAT5 et MAPK. Dans le but de vérifier cette hypothèse, l'étude du niveau d'expression des différents acteurs de la signalisation TPO tels que MPL, JAK2, TYK2 (dont l'activation est partagée par l'IFN- α , pSTAT1/5, MAPK) dans les CSH de patients répondeurs et non répondeurs aux HMA pourrait être effectuées par RT-qPCR. Il serait également intéressant de déterminer si la TPO est capable de moduler l'activité des enzymes G9A/GLP et l'apposition de la marque H3K9me2 aux RE dans les CSH de LMMC.

6. Autres stratégies thérapeutiques pour améliorer la réponse immune induite par les HMA

Les traitements HMA sont connus pour empêcher la prolifération cellulaire mais ils ne tuent pas nécessairement (Pappalardi et al. 2021). La hausse de H3K9me2 dans les CSPH des patients LMMC laisse penser que cette marque pourrait empêcher une augmentation importante des RE, ce qui permettrait aux cellules tumorales d'échapper à la mort après traitement avec les HMA. En effet, nous démontrons que la combinaison (DAC, un HMA et UNC0638, un inhibiteur de G9A/GLP) permet de déclencher non seulement une réponse antiproliférative et également une réponse de mort cellulaire, aboutissant *in fine* à la réduction, voire à l'élimination du clone muté. Nos résultats mettent en évidence que les CSPH (CD34⁺) de patients LMMC présentent une baisse de clonogénicité en méthylcellulose, de survie et de prolifération en culture liquide en présence de la combinaison (DAC et UNC0638) mais pas des traitements seuls. Après 4 jours de culture, nous montrons que le double traitement (DAC et UNC0638) dans les CD34⁺ de patients entraîne de façon synergique une augmentation importante de l'accessibilité de la chromatine au niveau des ERV, associée à une forte expression de leur ARN en comparaison aux traitements individuels. De façon intéressante, deux jours

après le retrait du DAC les CD34⁺ de patients LMMC présentent une hausse de H3K9me2 qui est empêchée par les inhibiteurs de G9A/GLP. De plus le retrait du DAC pendant les deux derniers jours de culture semble conduire à une reméthylation de l'ADN, du moins au niveau des LINE (dont la méthylation est mesurée dans le test utilisé). Le double traitement (DAC et UNC0638) semble empêcher cette reméthylation de l'ADN tandis que les traitements individuels n'altèrent pas le niveau de méthylation de l'ADN. Ces résultats suggèreraient que les CSH malignes développent des mécanismes de protection de la déméthylation de l'ADN, par un gain de la marque H3K9me2, qui permettrait de maintenir une répression des gènes suppresseurs de tumeurs (GST) et de RE et/ou qui favoriserait également la reméthylation de l'ADN. Ces résultats sont en accord avec les données de Schones et al. qui montrent que la marque H3K9me2 se trouve au niveau des régions géniques déméthylées dans les CD34⁺ (Schones et al. 2014). Des expériences de séquençage au bisulfite du génome entier et des CUT&Tag de H3K9me2 dans les différentes conditions de traitements pourront permettre d'étudier à l'échelle génomique ce mécanisme de compensation entre la méthylation de l'ADN et H3K9me2. Une attention particulière sera donnée aux régions contenant des GST, des RE et des ISG. Ce mécanisme de compensation a également été décrit dans d'autres cancers, majoritairement dans des lignées cellulaires et dans des modèles de souris (San José-Enériz et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Segovia et al. 2019; Hansen et al. 2022).

Nos résultats mettent en évidence que la combinaison a permis de cibler à la fois les CSH et les progéniteurs des patients LMMC. Les CSH de LMMC pourraient présenter un fort niveau de H3K9me2 en comparaison aux progéniteurs, ce qui les rendraient résistantes aux HMA seuls mais sensibles à la combinaison (HMA et inhibiteurs de G9A/GLP). Pour tester cette hypothèse, il est possible de mesurer par immunofluorescence le niveau de H3K9me2 dans les CSH et dans les progéniteurs de patients LMMC au diagnostic.

Dans la LMMC, tous les patients, à une exception près, présentent une augmentation très forte de la marque H3K9me2. Dans d'autres pathologies, d'autres marques répressives pourraient jouer le rôle bloqueur de RE. Notamment la perte de la méthylation de l'ADN peut être aussi associée à une augmentation de H3K27me3 (M. Walter et al. 2016; Ishak, Classon, et De Carvalho 2018; Patel et al. 2022). Il existe également une synergie entre le maintien de l'acétylation des histones et la déméthylation de l'ADN. Dans des lignées cancéreuses solides et leucémiques, la déméthylation de l'ADN par les HMA ou l'inhibition des HDAC (HDACi) est suffisante

pour déclencher une faible expression des RE LTR12C mais le double traitement (HMA et HDACi) est nécessaire pour une activation complète de ces RE (Brocks et al. 2017).

La hausse des transcrits des ERV dans les CD34⁺ de patients LMMC est corrélée par une forte production d'ARN-db suite au traitement par la combinaison (DAC et UNC0638) en comparaison à l'absence de traitement et aux traitements individuels. Le double traitement (DAC et UNC0638) entraîne un enrichissement de la voie IFN chez les patients, caractérisé par une forte expression d'ISG en particulier des protéines IRF3, IRF7, STAT1. Une activation de cette signalisation IFN est montrée par une augmentation de la forme phosphorylée de STAT1 (pSTAT1) par la combinaison (DAC et UNC0638). De plus, une hausse significative des transcrits du gène *IFN1B* codant pour l'IFN- β est induite par le double traitement (DAC et UNC0638) dans les CD34⁺ de patients LMMC. Le blocage du récepteur à IFN-I restaure la capacité clonogénique des CD34⁺ de patients en présence de la combinaison (DAC et UNC0638), suggérant l'implication de la voie IFN dans la mort des cellules de patients LMMC.

La voie RIG-I/MDA5 impliquée dans la détection d'ARN-db a un rôle important durant le développement pour la génération de CSH (Lefkopoulos et al. 2020). Il serait intéressant de déterminer si cette voie est conservée dans les CSH adultes et dérégulée dans les leucémies. Suivant le type de cancer, la déplétion de PKR, de TLR3 et de MAVS, des senseurs des ARN-db, ou la perte individuelle de MDA5, MAVS, ou IRF7, réduit significativement la réponse IFN induite par l'AZA, suggérant la nécessité de l'activation ces acteurs dans les effets anti-tumoraux des HMAs (Chiappinelli et al. 2015; Roulois et al. 2015; Patel et al. 2022). Dans le but de déterminer si la voie de détection et d'élimination des ARN-db est impliquée dans l'efficacité de la combinaison DAC+UNC0638 dans les CD34⁺ de patients LMMC, des expériences d'inactivations (siRNA, shRNA) de l'expression des senseurs des ARN-db, tels que que MDA5, MAVS, RIG-I pourraient être réalisées.

Le double traitement a maintenu l'accessibilité de la chromatine au niveau des éléments L1. Or la dérégulation des éléments L1 peut entraîner l'accumulation d'ADN-db cytosoliques (De Cecco et al. 2019; Simon et al. 2019). La mesure du niveau d'ADN-db peut être effectué par immunofluorescence et permettrait de déterminer si cette voie est impliquée dans l'induction de la voie IFN-I et de la mort cellulaire suite à la combinaison, HMA et inhibiteurs de G9A/GLP. Il est également possible de cibler des acteurs de la voie cGAs/STING pour confirmer ces résultats. Il serait intéressant de déterminer si au moins une de ces voies de détection des ARN-db ou ADN-db est dérégulée dans les leucémies.

Bien que les données ne soient pas encore très claires et que cela dépende des tissus, un certain nombre de publications rapportent que tous les RE ne sont pas égaux en termes de capacité à provoquer une réponse immune antivirale. Il a été montré que les éléments L1, notamment les éléments L1 actifs les plus récents induisent la voie IFN-I dans les cellules sénescentes et sont associés à l'augmentation de l'inflammation au cours du vieillissement (De Cecco et al. 2019)

Le mécanisme de répression des RE avec des LTR dépend de l'âge évolutif des LTR (Ohtani et al. 2018). Des analyses des données de l'épigénome et du transcriptome de quatre lignées cancéreuses mettent en évidence que les jeunes LTR tendent à être riche en CpG et ainsi à être principalement réprimés par la méthylation de l'ADN, tandis que les LTR avec un âge intermédiaire sont associés essentiellement avec des modifications d'histones dont la méthylation de H3K9 (Ohtani et al. 2018). Les jeunes LTR peuvent être réactivés par des HMA seuls, mais leur niveau d'expression est considérablement augmenté par la combinaison d'un HMA et d'une perte de l'une des enzymes KMT H3K9 ou de la KMT H3K27, EZH2 (Ohtani et al. 2018). Les LTR d'âges intermédiaires, présentant des densités CpG plus faibles, ne sont pas augmentés par les HMA mais elles sont sensibles à la déplétion des KMT H3K9. Il serait intéressant d'étudier l'âge des LTR et LINE-1 ouverts (ATAC-seq) et exprimés (RNA-seq) dans les CSPH des patients LMMC par rapport aux sujets sains ainsi que par les traitements seuls ou en combinaison.

La stratégie de combinaison de drogues générant un état mimant une infection virale telles que les HMA ou HDACi avec des inhibiteurs des points de contrôles immunitaires est à l'heure actuelle étudiée dans plusieurs essais cliniques et pourraient améliorer le pronostic des patients (Attermann et al. 2018; Loo Yau, Ettayebi, et De Carvalho 2019). Des résultats des essais cliniques de phase II combinant les HMA avec des inhibiteurs de PD-1/PD-L1 donnent des résultats mitigés sur des patients LAM et SMD en rechute après avoir reçu des HMA (Daver et al. 2019; Chien et al. 2021). Des effets plus prometteurs ont été observés chez des patients n'ayant jamais été traité aux HMA. Une possibilité serait que les cellules de patients traitées au préalable par les HMA apposent la marque H3K9me2 sur PD-L1 conduisant à un switch épigénétique qui fermerait de façon définitive la chromatine à ce gène et donc sont moins susceptibles de répondre à des inhibiteurs de PD-L1.

L'expression aberrante de RE entraîne la production accrue d'isoformes de protéines tronquées créant des néo-épitopes. Ils peuvent dériver de plusieurs classes de RE : les ERV, LINE, SINE, SVA (Kong et al. 2019; Bonté et al. 2022). Les néo-épitopes sont présentés à la surface de la cellule et reconnus par les lymphocytes T, entraînant la

mort de la cellule (C. C. Smith et al. 2019; Jones et al. 2019). Dans les cellules souches et les blastes leucémiques, la présentation d'un fort niveau d'antigènes spécifiques de la LAM, issus principalement des modifications épigénétiques et d'épissage anormal (rétention d'introns) est corrélée avec une meilleure survie du patient (Ehx et al. 2021). Elle est associée à une abondance de lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ activés. En collaboration avec S. Depil, nous allons identifier des antigènes spécifiques de la LMMC (après les traitements DAC et UNC0638) capables de générer une réponse T. Ces travaux pourront ouvrir des perspectives thérapeutiques notamment grâce au développement de vaccins et thérapies cellulaires ciblant ces antigènes tumoraux (Bonaventura et al. 2022; Alcazer et al. 2022).

Une autre stratégie pour éviter l'échappement à l'immunité est de cibler FTO, une déméthylase de l'ARN qui enlève la marque m6A. Fortement surexprimée dans les LAM, elle joue un rôle oncogène notamment en maintenant l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses (Zejuan Li et al. 2017). L'inhibition de FTO retarde le développement d'une LAM dans des souris greffées avec des cellules leucémiques et prolonge leur survie (R. Su et al. 2020). La perte de FTO sensibilise les cellules leucémiques à la cytotoxicité des cellules T et empêche l'évasion à l'immunité induite par les HMA, en réduisant l'expression d'inhibiteurs de points de contrôles immunitaires en particulier LILRB4 (R. Su et al. 2020).

La radiothérapie crée des dommages à l'ADN qui peuvent générer de l'ADN-db et activent la voie cGAS-STING, aboutissant à une réponse IFN (T. Li et Chen 2018). La LMMC est une pathologie à faible taux de mutations. Il pourrait être intéressant sans nécessairement traiter les patients par radiothérapie, de combiner des médicaments créant des dommages à l'ADN et des HMA afin d'amplifier la réponse IFN.

Fabriquer de meilleurs HMA, moins toxiques, est également une stratégie pour améliorer la réponse thérapeutique. Les HMA tels que la DAC et l'AZA sont connus pour être toxiques sur les cellules sanguines saines, ce qui limite les doses administrables aux patients (Derissen, Beijnen, et Schellens 2013). En effet, la DAC et l'AZA, s'incorporent dans l'ADN et piègent les DNMT1, DNMT3a et DNMT3b de façon covalente à l'ADN, créant des dommages à l'ADN. Un inhibiteur sélectif de l'ADN méthyltransférase de maintenance DNMT1 appelé GSK3685032, pouvant être pris par voie orale, s'est révélé efficace pour réduire les tumeurs et améliorer la survie des modèles de souris LAM, sans induire de toxicité hématologique (Pappalardi et al. 2021). GSK3685032 est une petite molécule qui entre en compétition avec le site actif de DNMT1 pour se loger dans l'ADN hémi-méthylé. Elle permet de déméthylé l'ADN et augmenter l'expression des gènes sans induire de dommages à l'ADN.

7. Prédiction de la réponse aux traitements épigénétiques

L'étude du niveau de H3K9me2 par des expériences d'immunofluorescence ou par cytométrie en flux dans les CD34⁺ de patients LMMC au diagnostic et après avoir reçu un traitement par des HMA pourrait permettre de déterminer si cette marque épigénétique est capable de prédire la réponse clinique aux HMA. On pourrait supposer qu'un patient non répondeur au HMA avec un fort niveau de H3K9me2 serait plus susceptible à répondre à la combinaison HMA et inhibiteurs de G9A/GLP. Il faudrait également voir si dans d'autres pathologies proches telles que les NMP, les SMD ou la LAM si les marques d'hétérochromatine (H3K9me3, H3K9me2, H3K27me3) peuvent être un facteur pronostic à la réponse au HMA et à la combinaison (HMA et inhibiteurs de G9A/GLP). Ces résultats permettront aussi de déterminer si la hausse de H3K9me2 dans les CSPH de patients LMMC est spécifique de cette maladie.

Bien que les données transcriptomiques mettent en évidence un enrichissement négatif de la voie IFN dans les CD34⁺ de patients LMMC au diagnostic en comparaison à des sujets sains, nous avons observé au sein des patients, deux groupes, un groupe présentant un enrichissement positif de la signature IFN et l'autre négatif (7/16 patients IFN^{high} vs 9/16 patients IFN^{low}). Ces deux groupes de patients ont un profil métabolique très différent. En effet, les patients IFN^{high} ont un enrichissement positif de la voie de la phosphorylation oxydative, de la voie de synthèse protéique contrairement aux patients IFN^{low}. On peut imaginer que des CSPH de patients IFN^{high} seront plus aptes à répondre à des traitements épigénétiques induisant une réponse immune antivirale.

Les patients atteints de LAM, porteurs de la mutation DNMT3A^{R822H}, traité par l'AZA suivi d'une chimiothérapie standard ont une survie prolongée (Scheller et al. 2021). La mutation DNMT3A^{R822H} induit une hypométhylation des RE, corrélée à une augmentation de la formation d'ARN-db. Cet état de mimétisme viral préexistant contribue à la sensibilité des cellules DNMT3A^{R822H} LAM à l'AZA (Scheller et al. 2021). Dans la LMMC, les mutations affectant DNMT3A représentent seulement 5% des patients, ce qui ne permettra pas de prédire la réponse aux traitements chez tous les patients. De plus, nous n'avons pas identifié de corrélation entre la sensibilité aux traitements (DAC+UNC0638) et les mutations somatiques dans les CD34⁺ de patients LMMC.

8. Etudes pré-cliniques effectuées sur des modèles de souris LMMC

Le gène *TET2* est retrouvé fréquemment muté avec l'âge et également dans la LMMC. Nous avons mis en évidence que les CSH *Tet2*^{-/-} murines ont une hausse rapide de la marque H3K9me2 (8-10 mois) avec l'âge avant même le développement de signes cliniques. A cet âge, même s'il n'y a pas de signes cliniques évidents, les paramètres hématologiques et la clonogénicité des CSPH sont déjà modifiés par rapport à des souris WT du même âge et par rapport aux souris *Tet2*^{-/-} jeunes. L'augmentation de H3K9me2 s'accompagne d'une sensibilité sélective à la combinaison HMA et inhibiteurs de G9A/GLP *in vitro*. Afin de tester l'effet du CM-272 sur la capacité de reconstitution et d'auto-renouvellement des CSH mutées par rapport aux CSH sauvages et donc de déterminer si ce traitement pouvait éradiquer les CSH mutées de façon sélective comme nous l'avons observé chez les patients, nous avons réalisé des greffes compétitives (20% *Tet2*^{-/-} et 80% *Tet2*^{+/+}) et traité les animaux 1 mois après reconstitution. Toutes les souris greffées ont développé une inflammation au niveau de l'abdomen et ont dû être euthanasiées. En parallèle, nous avons traité des souris contrôles n'ayant pas été greffées et donc qui n'avaient pas au préalable subi d'irradiation létale afin d'étudier la toxicité du CM-272. Il s'est avéré que ces souris contrôles n'ont pas eu d'inflammation. Ce résultat suggère que l'irradiation pourrait créer des lésions intestinales qui amèneraient à une mauvaise assimilation du traitement et à sa toxicité, ce qui rendait inutilisable cette drogue dans ces expériences.

Nous nous sommes donc tournés vers des essais du traitement CM-272 sur des souris *Tet2*^{-/-} natives âgées de 8-10 mois qui présentent déjà certains défauts hématologiques et ont une augmentation de H3K9me2. Nos résultats préliminaires montrent que l'injection de CM-272 dans ces souris *Tet2*^{-/-} âgées de 8-10 mois restaure les paramètres hématologiques notamment la monocytose, l'augmentation de la proportion de monocytes MO1 caractéristique de la LMMC et la dysplasie des neutrophiles, au niveau observé dans les souris WT du même âge et à des souris *Tet2*^{-/-} jeunes. De plus, le traitement *in vivo* a aussi permis d'inhiber l'augmentation de la prolifération et la clonogénicité des Lin⁻ observées chez les souris *Tet2*^{-/-} âgées. Ces données suggèrent que la combinaison HMA et inhibiteurs de G9A/GLP pourrait ralentir le développement d'un phénotype LMMC. Des expériences de reconstitutions compétitives avec les moelles de ces souris sont en cours pour déterminer si le traitement a aussi eu un impact sur l'avantage compétitif et l'auto-renouvellement des CSH *Tet2*^{-/-}.

Les inconvénients du modèle de souris *Tet2*^{-/-} sont la longue période de latence et la pénétrance variable du développement de la maladie. Notre laboratoire a développé un modèle de souris *Tet2*^{-/-} *Srsf2*^{wt/P95H} présentant les deux mutations les plus fréquentes de la pathologie. Après la transplantation, ces souris développent un phénotype proche de la LMMC, caractérisé par un biais vers la lignée myéloïde aux dépens de la lignée lymphoïde, un enrichissement des monocytes de type MO1 (Ly6C^{high}), une anémie et une thrombopénie. L'utilisation d'une nouvelle combinaison BIX-01294 (un inhibiteur de G9A/GLP tolérable *in vivo*) et de l'AZA sont en cours sur des souris *Tet2*^{-/-} et *Tet2*^{-/-} *Srsf2*^{wt/P95H}. Nous étudierons également l'effet du double traitement BIX-01294 et de l'inhibiteur spécifique de DNMT1, GSK3685032, sur ces souris.

Nous verrons si ces combinaisons permettent de corriger le phénotype LMMC (dysplasie, monocytose) de ces souris en effectuant des greffes non compétitives. Nous étudierons l'effet des traitements sur les cellules mutées et sauvages en réalisant des greffes compétitives. Enfin, nous nous pencherons aussi sur le microenvironnement afin d'observer si les traitements ont permis de créer un environnement favorable à l'infiltration des cellules immunitaires dans la moelle (les lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes T régulateur FOXP3⁺, les cellules *natural killer* CD56⁺) et de produire de l'IFN.

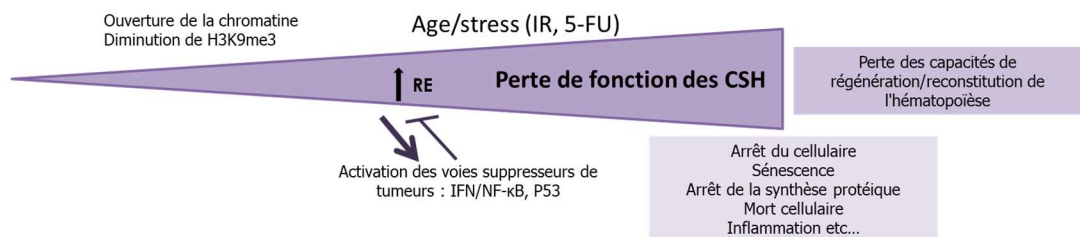
Des modèles de souris PDX (*patient-derived xenograft*) greffées avec des cellules de la moelle osseuse de patients LMMC ont également été traité par le CM-272 mais les résultats sont avérés décevants, soit à cause de la toxicité de cette drogue et/ou à cause de problèmes immunologiques. En effet, les souris PDX ne sont pas de bons modèles dans notre étude puisque si notre combinaison nécessite l'induction d'une réponse immune, elle ne pourra pas être visible dans des souris immunocompétentes.

Conclusions

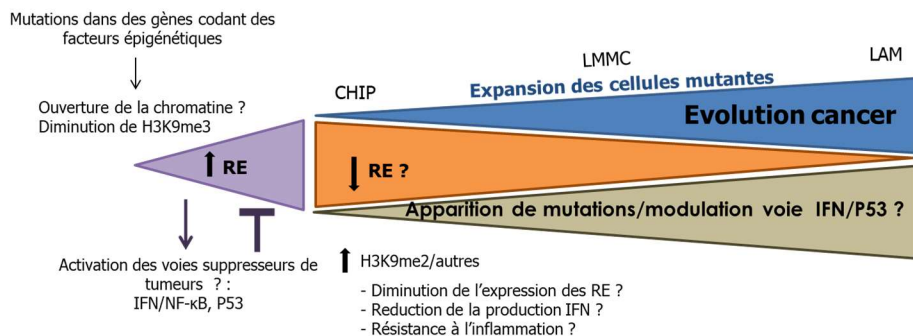
L'hétérochromatine est le « gardien » des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en les protégeant d'une instabilité génomique et d'une dérégulation du transcriptome incluant les rétro-éléments (RE). Elle garde en mémoire toutes les anomalies que les CSH ont pu subir. Dans les cancers, les RE sont le plus souvent réprimés pour éviter l'induction de voies suppresseurs de tumeurs (Kelsey 2021).

Les RE sont des « armes double tranchant », ayant un rôle à la fois bénéfique dans la fonction des CSH et également nocif dans certains contextes.

Scénario 1 : Situation de stress ou vieillissement



Scénario 2 : Développement d'un cancer ?



Dans un modèle de vieillissement prématurée induit par l'irradiation, la perte d'une marque de l'hétérochromatine H3K9me3 dans les CSH est responsable de la dérégulation d'un ensemble particulier de RE LINE-1 récents introniques abritant des sites NF-κB qui participent aux altérations fonctionnelles. Dans les CSH, les éléments L1 récents actif suite à un stress ou avec l'âge, induisent l'activation des voies suppresseurs de tumeurs tel que la réponse interféron (IFN), la voie P53... qui permettent en retour d'empêcher la prolifération des cellules ayant accumulées des RE en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, ou même la mort cellulaire [Scénario 1].

Bien que la majorité des cellules sans doute meurent du fait de cette lutte incessante entre les rétro-éléments et les voies suppresseurs de tumeurs, des cellules

subsisteraient en petit nombre et pourraient subir une pression de sélection. Ces cellules anormales restantes développeraient des mécanismes de résistances à l'effet suppresseurs de tumeurs des RE comme l'augmentation des marques de l'hétérochromatine (ex. H3K9me2) et/ou la modulation des voies IFN et P53 pour persister [Scénario 2].

Les CSH de patients LMMC présentent un remodelage de l'hétérochromatine accentué par rapport à des sujets sains d'âges similaires, caractérisée par une perte de H3K9me3 et un gain de H3K9me2. De plus, une hausse de H3K9me2 est observée dans les CSH *Tet2*^{-/-} murines avec l'âge avant même le développement d'une LMMC. Une possibilité serait que les cellules *Tet2*^{-/-} ont développé un mécanisme de résistance avec l'âge or lors des stress par rapport à des cellules WT, et sont ainsi mieux équipées dans un environnement âgé. Les cellules mutées deviennent dépendantes à la hausse de H3K9me2, ce qui crée des vulnérabilités.

Nous démontrons que la combinaison d'un traitement ciblant deux acteurs de l'hétérochromatine, H3K9me2 et la méthylation de l'ADN, permet d'induire l'expression des RE, de l'IFN et la mort des CSH LMMC et également de freiner le développement de la LMMC dans les souris *Tet2*^{-/-} murines.

Ainsi retourner « l'arme », les RE contre les cellules cancéreuses en agissant sur leur « gardien » l'hétérochromatine pourrait être une stratégie pour vaincre ces cellules malignes.

Bibliographie

- Abascal, Federico, Luke M. R. Harvey, Emily Mitchell, Andrew R. J. Lawson, Stefanie V. Lensing, Peter Ellis, Andrew J. C. Russell, et al. 2021. « Somatic Mutation Landscapes at Single-Molecule Resolution ». *Nature* 593 (7859): 405-10. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03477-4>.
- Abdel-Wahab, Omar, Jie Gao, Mazhar Adli, Anwasha Dey, Thomas Trimarchi, Young Rock Chung, Cem Kuscu, et al. 2013. « Deletion of Asxl1 Results in Myelodysplasia and Severe Developmental Defects in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (12): 2641-59. <https://doi.org/10.1084/jem.20131141>.
- Abdel-Wahab, Omar, Ann Mullally, Cyrus Hedvat, Guillermo Garcia-Manero, Jay Patel, Martha Wadleigh, Sebastien Malinge, et al. 2009. « Genetic Characterization of TET1, TET2, and TET3 Alterations in Myeloid Malignancies ». *Blood* 114 (1): 144-47. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-210039>.
- Adelman, Jason S., Jo R. Applebaum, Clyde B. Schechter, Matthew A. Berger, Stan H. Reissman, Raja Thota, Andrew D. Racine, et al. 2019. « Effect of Restriction of the Number of Concurrently Open Records in an Electronic Health Record on Wrong-Patient Order Errors: A Randomized Clinical Trial ». *JAMA* 321 (18): 1780-87. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.3698>.
- Adolfsson, Jörgen, Robert Månsson, Natalija Buza-Vidas, Anne Hultquist, Karina Liuba, Christina T. Jensen, David Bryder, et al. 2005. « Identification of Flt3+ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential a Revised Road Map for Adult Blood Lineage Commitment ». *Cell* 121 (2): 295-306. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.013>.
- Aggarwal, Ruchi, Meenakshi Jha, Anju Shrivastava, et Abhimanyu Kumar Jha. 2015. « Natural Compounds: Role in Reversal of Epigenetic Changes ». *Biochemistry. Biokhimiia* 80 (8): 972-89. <https://doi.org/10.1134/S0006297915080027>.
- Agger, Karl, Koutarou Nishimura, Satoru Miyagi, Jan-Erik Messling, Kasper Dindler Rasmussen, et Kristian Helin. 2019. « The KDM4/JMJD2 histone demethylases are required for hematopoietic stem cell maintenance ». *Blood* 134 (14): 1154-58. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000855>.
- Ågren, J. Arvid, et Andrew G. Clark. 2018. « Selfish Genetic Elements ». *PLOS Genetics* 14 (11): e1007700. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007700>.
- Aicardi, J., et F. Goutières. 1984. « A Progressive Familial Encephalopathy in Infancy with Calcifications of the Basal Ganglia and Chronic Cerebrospinal Fluid Lymphocytosis ». *Annals of Neurology* 15 (1): 49-54. <https://doi.org/10.1002/ana.410150109>.
- Alcazer, Vincent, Paola Bonaventura, Laurie Tonon, Emilie Michel, Virginie Mutez, Clémentine Fabres, Nicolas Chuvin, et al. 2022a. « HERVs Characterize Normal and Leukemia Stem Cells and Represent a Source of Shared Epitopes for Cancer Immunotherapy ». *American Journal of Hematology* 97 (9): 1200-1214. <https://doi.org/10.1002/ajh.26647>.
- Alexandrov, Ludmil B., Philip H. Jones, David C. Wedge, Julian E. Sale, Peter J. Campbell, Serena Nik-Zainal, et Michael R. Stratton. 2015. « Clock-like Mutational Processes in Human Somatic Cells ». *Nature Genetics* 47 (12): 1402-7. <https://doi.org/10.1038/ng.3441>.
- Ali, Ashfaq, Justine Penneroux, Reinaldo Dal Bello, Aline Massé, Samuel Quentin, Ashwin Unnikrishnan, Lucie Hernandez, et al. 2018. « Granulomonocytic Progenitors Are Key Target Cells of Azacytidine in Higher Risk Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 32 (8): 1856-60. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0076-2>.
- Aliper, Alexander M., Antonei Benjamin Csoka, Anton Buzdin, Tomasz Jetka, Sergey Roumiantsev, Alexy Moskalev, et Alex Zhavoronkov. 2015. « Signaling Pathway Activation Drift during Aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Fibroblasts Are Comparable to Normal Middle-Age and Old-Age Cells ». *Aging* 7 (1): 26-37. <https://doi.org/10.18632/aging.100717>.

- Allan, Rhys S., Elina Zueva, Florence Cammas, Heidi A. Schreiber, Vanessa Masson, Gabrielle T. Belz, Danièle Roche, et al. 2012. « An Epigenetic Silencing Pathway Controlling T Helper 2 Cell Lineage Commitment ». *Nature* 487 (7406): 249-53. <https://doi.org/10.1038/nature11173>.
- Allis, C. David, et Thomas Jenuwein. 2016. « The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control ». *Nature Reviews. Genetics* 17 (8): 487-500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>.
- Allsopp, Richard C., Gregg B. Morin, Ronald DePinho, Calvin B. Harley, et Irving L. Weissman. 2003. « Telomerase Is Required to Slow Telomere Shortening and Extend Replicative Lifespan of HSCs during Serial Transplantation ». *Blood* 102 (2): 517-20. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2334>.
- Allsopp, Richard C., Gregg B. Morin, James W. Horner, Ronald DePinho, Calvin B. Harley, et Irving L. Weissman. 2003. « Effect of TERT Over-Expression on the Long-Term Transplantation Capacity of Hematopoietic Stem Cells ». *Nature Medicine* 9 (4): 369-71. <https://doi.org/10.1038/nm0403-369>.
- An, Jungeun, Edahí González-Avalos, Ashu Chawla, Mira Jeong, Isaac F. López-Moyado, Wei Li, Margaret A. Goodell, Lukas Chavez, Myunggon Ko, et Anjana Rao. 2015. « Acute Loss of TET Function Results in Aggressive Myeloid Cancer in Mice ». *Nature Communications* 6 (novembre): 10071. <https://doi.org/10.1038/ncomms10071>.
- Anders, Simon, Paul Theodor Pyl, et Wolfgang Huber. 2015. « HTSeq--a Python Framework to Work with High-Throughput Sequencing Data ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 31 (2): 166-69. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
- Andrenacci, Davide, Valeria Cavaliere, et Giovanna Lattanzi. 2020. « The Role of Transposable Elements Activity in Aging and Their Possible Involvement in Laminopathic Diseases ». *Ageing Research Reviews* 57 (janvier): 100995. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100995>.
- Anzai, Atsushi, Jennifer L. Choi, Shun He, Ashley M. Fenn, Manfred Nairz, Sara Rattik, Cameron S. McAlpine, et al. 2017. « The infarcted myocardium solicits GM-CSF for the detrimental oversupply of inflammatory leukocytes ». *Journal of Experimental Medicine* 214 (11): 3293-3310. <https://doi.org/10.1084/jem.20170689>.
- Aravin, Alexei A., Ravi Sachidanandam, Deborah Bourc'his, Christopher Schaefer, Dubravka Pezic, Katalin Fejes Toth, Timothy Bestor, et Gregory J. Hannon. 2008. « A PIRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to de Novo DNA Methylation in Mice ». *Molecular Cell* 31 (6): 785-99. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.003>.
- 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>.
- Asati, Vivek, Debarshi Kar Mahapatra, et Sanjay Kumar Bharti. 2017. « K-Ras and Its Inhibitors towards Personalized Cancer Treatment: Pharmacological and Structural Perspectives ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 125 (janvier): 299-314. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.049>.
- Aschacher, T., B. Wolf, F. Enzmann, P. Kienzl, B. Messner, S. Sampl, M. Svoboda, D. Mechtcheriakova, K. Holzmann, et M. Bergmann. 2016. « LINE-1 Induces HTERT and Ensures Telomere Maintenance in Tumour Cell Lines ». *Oncogene* 35 (1): 94-104. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.65>.
- Attermann, A. S., A -M Bjerregaard, S. K. Saini, K. Grønbaek, et S. R. Hadrup. 2018. « Human Endogenous Retroviruses and Their Implication for Immunotherapeutics of Cancer ». *Annals of Oncology, Endogenous retroviruses and their implications for immunotherapy*, 29 (11): 2183-91. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy413>.
- Ayarpadikannan, Selvam, Hee-Eun Lee, Kyudong Han, et Heui-Soo Kim. 2015. « Transposable Element-Driven Transcript Diversification and Its Relevance to Genetic Disorders ». *Gene* 558 (2): 187-94. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.01.039>.

- Babaian, A., M. T. Romanish, L. Gagnier, L. Y. Kuo, M. M. Karimi, C. Steidl, et D. L. Mager. 2016. « Onco-Exaptation of an Endogenous Retroviral LTR Drives IRF5 Expression in Hodgkin Lymphoma ». *Oncogene* 35 (19): 2542-46. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.308>.
- Babushok, Daria V., et Haig H. Kazazian. 2007. « Progress in Understanding the Biology of the Human Mutagen LINE-1 ». *Human Mutation* 28 (6): 527-39. <https://doi.org/10.1002/humu.20486>.
- Baer, Constance, Verena Muehlbacher, Wolfgang Kern, Claudia Haferlach, et Torsten Haferlach. 2018. « Molecular genetic characterization of myeloid/lymphoid neoplasms associated with eosinophilia and rearrangement of PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 or PCM1-JAK2 ». *Haematologica* 103 (8): e348-50. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.187302>.
- Balazs, Alejandro B., Attila J. Fabian, Charles T. Esmon, et Richard C. Mulligan. 2006. « Endothelial Protein C Receptor (CD201) Explicitly Identifies Hematopoietic Stem Cells in Murine Bone Marrow ». *Blood* 107 (6): 2317-21. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2249>.
- Ball, Markus, Alan F. List, et Eric Padron. 2016. « When Clinical Heterogeneity Exceeds Genetic Heterogeneity: Thinking Outside the Genomic Box in Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Blood* 128 (20): 2381-87. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-692988>.
- Bannert, Norbert, et Reinhard Kurth. 2004. « Retroelements and the Human Genome: New Perspectives on an Old Relation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 Suppl 2 (octobre): 14572-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404838101>.
- Barbieri, Daniela, Emilie Elvira-Matelot, Yanis Pelinski, Laetitia Genève, Bérengère de Laval, Gayathri Yogarajah, Christian Pecquet, Stefan N. Constantinescu, et Françoise Porteu. 2018. « Thrombopoietin Protects Hematopoietic Stem Cells from Retrotransposon-Mediated Damage by Promoting an Antiviral Response ». *The Journal of Experimental Medicine* 215 (5): 1463-80. <https://doi.org/10.1084/jem.20170997>.
- Barde, Isabelle, Benjamin Rauwel, Ray Marcel Marin-Florez, Andrea Corsinotti, Elisa Laurenti, Sonia Verp, Sandra Offner, et al. 2013. « A KRAB/KAP1-MiRNA Cascade Regulates Erythropoiesis through Stage-Specific Control of Mitophagy ». *Science (New York, N.Y.)* 340 (6130): 350-53. <https://doi.org/10.1126/science.1232398>.
- Barton, Michael B., Susannah Jacob, Jesmin Shafiq, Karen Wong, Stephen R. Thompson, Timothy P. Hanna, et Geoff P. Delaney. 2014. « Estimating the Demand for Radiotherapy from the Evidence: A Review of Changes from 2003 to 2012 ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 112 (1): 140-44. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.03.024>.
- Baum, C M, I L Weissman, A S Tsukamoto, A M Buckle, et B Peault. 1992. « Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (7): 2804-8.
- Becerra, Edgardo, et Guadalupe García-Alcocer. 2020. « MicroRNAs and Their Role in Acute Lymphoblastic Leukemia ». In . <https://doi.org/10.5772/intechopen.94960>.
- Beck, Christine R., Pamela Collier, Catriona Macfarlane, Maika Malig, Jeffrey M. Kidd, Evan E. Eichler, Richard M. Badge, et John V. Moran. 2010. « LINE-1 Retrotransposition Activity in Human Genomes ». *Cell* 141 (7): 1159-70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.021>.
- Beerman, Isabel, Deepta Bhattacharya, Sasan Zandi, Mikael Sigvardsson, Irving L. Weissman, David Bryder, et Derrick J. Rossi. 2010. « Functionally Distinct Hematopoietic Stem Cells Modulate Hematopoietic Lineage Potential during Aging by a Mechanism of Clonal Expansion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (12): 5465-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000834107>.
- Bejar, Rafael, Kristen Stevenson, Omar Abdel-Wahab, Naomi Galili, Björn Nilsson, Guillermo Garcia-Manero, Hagop Kantarjian, et al. 2011. « Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes ». *The New England Journal of Medicine* 364 (26): 2496-2506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1013343>.

- Beke, Allan, Lucie Laplane, Julie Riviere, Qin Yang, Miguel Torres-Martin, Thibault Dayris, Philippe Rameau, et al. 2020. « Multilayer Intraclonal Heterogeneity in Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Haematologica* 105 (1): 112-23. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.208488>.
- Belancio, Victoria P., Astrid M. Roy-Engel, Radhika R. Pochampally, et Prescott Deininger. 2010. « Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues ». *Nucleic Acids Research* 38 (12): 3909-22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq132>.
- Belshaw, Robert, Anna L. A. Dawson, John Woolven-Allen, Joanna Redding, Austin Burt, et Michael Tristem. 2005. « Genomewide Screening Reveals High Levels of Insertional Polymorphism in the Human Endogenous Retrovirus Family HERV-K(HML2): Implications for Present-Day Activity ». *Journal of Virology* 79 (19): 12507-14. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12507-12514.2005>.
- Bendall, Matthew L., Miguel de Mulder, Luis Pedro Iñiguez, Aarón Lecanda-Sánchez, Marcos Pérez-Losada, Mario A. Ostrowski, R. Brad Jones, et al. 2019. « Telescope: Characterization of the Retrotranscriptome by Accurate Estimation of Transposable Element Expression ». *PLoS Computational Biology* 15 (9): e1006453. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006453>.
- Bernitz, Jeffrey M., Huen Suk Kim, Ben MacArthur, Hans Sieburg, et Kateri Moore. 2016. « Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions ». *Cell* 167 (5): 1296-1309.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.022>.
- Bestor, T. H. 1998. « The Host Defence Function of Genomic Methylation Patterns ». *Novartis Foundation Symposium* 214: 187-95; discussion 195-199, 228-32. <https://doi.org/10.1002/9780470515501.ch11>.
- Bingham, P. M., M. G. Kidwell, et G. M. Rubin. 1982. « The Molecular Basis of P-M Hybrid Dysgenesis: The Role of the P Element, a P-Strain-Specific Transposon Family ». *Cell* 29 (3): 995-1004. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90463-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90463-9).
- Birrer, Angelika, Florije Jusufi, Michael Bernimoulin, André Tichelli, Alois Gratwohl, Catherine Nissen-Druey, Stephan Dirnhofer, Sandrine Meyer-Monard, et Martin Stern. 2008. « Hematopoietic Progenitor Cell Colony Growth Differentiates Chronic Myelomonocytic Leukemia from Reactive Monocytosis ». *European Journal of Haematology* 81 (4): 267-72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2008.01115.x>.
- Bonaventura, Paola, Vincent Alcazer, Virginie Mutez, Laurie Tonon, Juliette Martin, Nicolas Chuvin, Emilie Michel, et al. 2022. « Identification of shared tumor epitopes from endogenous retroviruses inducing high-avidity cytotoxic T cells for cancer immunotherapy ». *Science Advances* 8 (4). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj3671>.
- Bonté, Pierre-Emmanuel, Yago A. Arribas, Antonela Merlotti, Montserrat Carrascal, Jiasi Vicky Zhang, Elina Zueva, Zev A. Binder, Cécile Alanio, Christel Goudot, et Sebastian Amigorena. 2022. « Single-Cell RNA-Seq-Based Proteogenomics Identifies Glioblastoma-Specific Transposable Elements Encoding HLA-I-Presented Peptides ». *Cell Reports* 39 (10): 110916. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110916>.
- Borden, E. C., T. F. Hogan, et J. G. Voelkel. 1982. « Comparative Antiproliferative Activity in Vitro of Natural Interferons Alpha and Beta for Diploid and Transformed Human Cells ». *Cancer Research* 42 (12): 4948-53.
- Borthakur, Gautam, Leslie Popplewell, Michael Boyiadzis, James Foran, Uwe Platzbecker, Norbert Vey, Roland B. Walter, et al. 2016. « Activity of the Oral Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Inhibitor Trametinib in RAS-Mutant Relapsed or Refractory Myeloid Malignancies ». *Cancer* 122 (12): 1871-79. <https://doi.org/10.1002/cncr.29986>.
- Bourque, Guillaume, Kathleen H. Burns, Mary Gehring, Vera Gorbunova, Andrei Seluanov, Molly Hammell, Michaël Imbeault, et al. 2018. « Ten things you should know about transposable elements ». *Genome Biology* 19 (1): 199. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1577-z>.

- Bradley, T. R., et D. Metcalf. 1966. « The Growth of Mouse Bone Marrow Cells in Vitro ». *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 44 (3): 287-99. <https://doi.org/10.1038/icb.1966.28>.
- Brady, H. J., J. C. Sowden, M. Edwards, N. Lowe, et P. H. Butterworth. 1989. « Multiple GF-1 Binding Sites Flank the Erythroid Specific Transcription Unit of the Human Carbonic Anhydrase I Gene ». *FEBS Letters* 257 (2): 451-56. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81594-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81594-7).
- Brandt, Annely, Georg Krohne, et Jörg Großhans. 2008. « The Farnesylated Nuclear Proteins KUGELKERN and LAMIN B Promote Aging-like Phenotypes in Drosophila Flies ». *Aging Cell* 7 (4): 541-51. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00406.x>.
- Brattås, Per Ludvik, Marie E. Jönsson, Liana Fasching, Jenny Nelander Wahlestedt, Mansoureh Shahsavani, Ronny Falk, Anna Falk, Patric Jern, Malin Parmar, et Johan Jakobsson. 2017. « TRIM28 Controls a Gene Regulatory Network Based on Endogenous Retroviruses in Human Neural Progenitor Cells ». *Cell Reports* 18 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.010>.
- Braun, Thorsten, Raphael Itzykson, Aline Renneville, Benoit de Renzis, François Dreyfus, Kamel Laribi, Krime Bouabdallah, et al. 2011. « Molecular Predictors of Response to Decitabine in Advanced Chronic Myelomonocytic Leukemia: A Phase 2 Trial ». *Blood* 118 (14): 3824-31. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-352039>.
- Brennecke, Julius, Alexei A. Aravin, Alexander Stark, Monica Dus, Manolis Kellis, Ravi Sachidanandam, et Gregory J. Hannon. 2007. « Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in Drosophila ». *Cell* 128 (6): 1089-1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>.
- Brocks, David, Christopher R. Schmidt, Michael Daskalakis, Hyo Sik Jang, Nakul M. Shah, Daofeng Li, Jing Li, et al. 2017. « DNMT and HDAC Inhibitors Induce Cryptic Transcription Start Sites Encoded in Long Terminal Repeats ». *Nature Genetics* 49 (7): 1052-60. <https://doi.org/10.1038/ng.3889>.
- Bröske, Ann-Marie, Lena Vockentanz, Shabnam Kharazi, Matthew R. Huska, Elena Mancini, Marina Scheller, Christiane Kuhl, et al. 2009. « DNA Methylation Protects Hematopoietic Stem Cell Multipotency from Myeloerythroid Restriction ». *Nature Genetics* 41 (11): 1207-15. <https://doi.org/10.1038/ng.463>.
- Brouha, Brook, Joshua Schustak, Richard M. Badge, Sheila Lutz-Prigge, Alexander H. Farley, John V. Moran, et Haig H. Kazazian. 2003. « Hot L1s Account for the Bulk of Retrotransposition in the Human Population ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9): 5280-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.0831042100>.
- Brummelkamp, Thijn R., et Bas van Steensel. 2015. « GENE REGULATION. A HUSH for Transgene Expression ». *Science (New York, N.Y.)* 348 (6242): 1433-34. <https://doi.org/10.1126/science.aac6529>.
- Buenrostro, Jason D., M. Ryan Corces, Caleb A. Lareau, Beijing Wu, Alicia N. Schep, Martin J. Aryee, Ravindra Majeti, Howard Y. Chang, et William J. Greenleaf. 2018. « Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation ». *Cell* 173 (6): 1535-1548.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.074>.
- Bulut-Karslioglu, Aydan, Inti A. De La Rosa-Velázquez, Fidel Ramirez, Maxim Barenboim, Megumi Onishi-Seebacher, Julia Arand, Carmen Galán, et al. 2014. « Suv39h-Dependent H3K9me3 Marks Intact Retrotransposons and Silences LINE Elements in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Molecular Cell* 55 (2): 277-90. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.029>.
- Burnette, Byron C., Hua Liang, Youjin Lee, Lukasz Chlewicki, Nikolai N. Khodarev, Ralph R. Weichselbaum, Yang-Xin Fu, et Sogyong L. Auh. 2011. « The Efficacy of Radiotherapy Relies upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity ». *Cancer Research* 71 (7): 2488-96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2820>.
- Busque, Lambert, Jay P. Patel, Maria E. Figueroa, Aparna Vasanthakumar, Sylvie Provost, Zineb Hamilou, Luigina Mollica, et al. 2012. « Recurrent Somatic TET2 Mutations in Normal Elderly

- Individuals with Clonal Hematopoiesis ». *Nature Genetics* 44 (11): 1179-81.
<https://doi.org/10.1038/ng.2413>.
- Buzdin, Anton, Elena Gogvadze, Elena Kovalskaya, Pavel Volchkov, Svetlana Ustyugova, Anna Illarionova, Alexey Fushan, Tatiana Vinogradova, et Eugene Sverdlov. 2003. « The Human Genome Contains Many Types of Chimeric Retrogenes Generated through in Vivo RNA Recombination ». *Nucleic Acids Research* 31 (15): 4385-90.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg496>.
- Cabezas-Wallscheid, Nina, Daniel Klimmeck, Jenny Hansson, Daniel B. Lipka, Alejandro Reyes, Qi Wang, Dieter Weichenhan, et al. 2014. « Identification of Regulatory Networks in HSCs and Their Immediate Progeny via Integrated Proteome, Transcriptome, and DNA Methylation Analysis ». *Cell Stem Cell* 15 (4): 507-22. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.07.005>.
- Calvo, Xavier, Nieves Garcia-Gisbert, Ivonne Parraga, Joan Gibert, Lourdes Florensa, Marcio Andrade-Campos, Brayan Merchan, et al. 2020. « Oligomonocytic and Overt Chronic Myelomonocytic Leukemia Show Similar Clinical, Genomic, and Immunophenotypic Features ». *Blood Advances* 4 (20): 5285-96. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002206>.
- Cambier, N., E. Wattel, M. L. Menot, A. Guerci, C. Chomienne, et P. Fenaux. 1996. « All-Trans Retinoic Acid in Adult Chronic Myelomonocytic Leukemia: Results of a Pilot Study ». *Leukemia* 10 (7): 1164-67.
- Cañadas, Israel, Rohit Thummalapalli, Jong Wook Kim, Shunsuke Kitajima, Russell William Jenkins, Camilla Laulund Christensen, Marco Campisi, et al. 2018. « Tumor Innate Immunity Primed by Specific Interferon-Stimulated Endogenous Retroviruses ». *Nature Medicine* 24 (8): 1143-50. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0116-5>.
- Cao, Wei, Laura Bover, Minkwon Cho, Xiaoxia Wen, Shino Hanabuchi, Musheng Bao, David B. Rosen, et al. 2009. « Regulation of TLR7/9 Responses in Plasmacytoid Dendritic Cells by BST2 and ILT7 Receptor Interaction ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (7): 1603-14.
<https://doi.org/10.1084/jem.20090547>.
- Capobianchi, Maria Rosaria, Elena Uleri, Claudia Caglioti, et Antonina Dolei. 2015. « Type I IFN Family Members: Similarity, Differences and Interaction ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26 (2): 103-11. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.10.011>.
- Caraffini, Veronica, Olivia Geiger, Angelika Rosenberger, Stefan Hatzl, Bianca Perfler, Johannes L. Berg, Clarice Lim, et al. 2020. « Loss of RAF kinase inhibitor protein is involved in myelomonocytic differentiation and aggravates RAS-driven myeloid leukemogenesis ». *Haematologica* 105 (2): 375-86. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.209650>.
- Catalano, L., I. Majolino, P. Musto, A. Frangaso, S. Molica, S. Cirincione, C. Selleri, L. Luciano, A. De Renzo, et R. Vecchione. 1989. « Alpha Interferon in the Treatment of Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Haematologica* 74 (6): 577-81.
- Cenni, Vittoria, Maria Rosaria D'Apice, Paolo Garagnani, Marta Columbaro, Giuseppe Novelli, Claudio Franceschi, et Giovanna Lattanzi. 2018. « Mandibuloacral Dysplasia: A Premature Ageing Disease with Aspects of Physiological Ageing ». *Ageing Research Reviews* 42 (mars): 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.001>.
- Cervantes-Ayalá, Andrea, Ruth Ruiz Esparza-Garrido, et Miguel Ángel Velázquez-Flores. 2020. « Long Interspersed Nuclear Elements 1 (LINE1): The Chimeric Transcript L1-MET and Its Involvement in Cancer ». *Cancer Genetics* 241 (février): 1-11.
<https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2019.11.004>.
- Challen, Grant A., Nathan Boles, Karen Kuan-Yin Lin, et Margaret A. Goodell. 2009. « Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification and Analysis ». *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 75 (1): 14-24.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20674>.
- Challen, Grant A., Deqiang Sun, Allison Mayle, Mira Jeong, Min Luo, Benjamin Rodriguez, Cates Mallaney, et al. 2014. « Dnmt3a and Dnmt3b Have Overlapping and Distinct Functions in

- Hematopoietic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 15 (3): 350-64.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.018>.
- Chambers, Stuart M., Chad A. Shaw, Catherine Gatz, C. Joseph Fisk, Lawrence A. Donehower, et Margaret A. Goodell. 2007. « Aging Hematopoietic Stem Cells Decline in Function and Exhibit Epigenetic Dysregulation ». *PLoS Biology* 5 (8): e201.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050201>.
- Chan, Wai-In, Rebecca L. Hannah, Mark A. Dawson, Clare Pridans, Donna Foster, Anagha Joshi, Berthold Göttgens, Jan M. Van Deursen, et Brian J. P. Huntly. 2011. « The Transcriptional Coactivator Cbp Regulates Self-Renewal and Differentiation in Adult Hematopoietic Stem Cells ▽ ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (24): 5046-60.
<https://doi.org/10.1128/MCB.05830-11>.
- Chang, Jianhui, Yingying Wang, Lijian Shao, Remi-Martin Laberge, Marco Demaria, Judith Campisi, Krishnamurthy Janakiraman, et al. 2016. « Clearance of Senescent Cells by ABT263 Rejuvenates Aged Hematopoietic Stem Cells in Mice ». *Nature Medicine* 22 (1): 78-83.
<https://doi.org/10.1038/nm.4010>.
- Charbonnier, Françoise, Stephanie Baert-Desurmont, Ping Liang, Frederic Di Fiore, Cosette Martin, Stephanie Frerot, Sylviane Olschwang, et al. 2005. « The 5' Region of the MSH2 Gene Involved in Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer Contains a High Density of Recombinogenic Sequences ». *Human Mutation* 26 (3): 255-61.
<https://doi.org/10.1002/humu.20216>.
- Chelmicki, Tomasz, Emeline Roger, Aurélie Teissandier, Sofia Rucli, François Dossin, Mathilde Dura, Camille Fouassier, Sonia Lameiras, et Deborah Bourc'his. 2020. « M6A RNA Methylation Regulates the Fate of Endogenous Retroviruses ». bioRxiv.
<https://doi.org/10.1101/2020.03.24.005488>.
- Chen, Haiyang, Xiaobin Zheng, Danqing Xiao, et Yixian Zheng. 2016. « Age-Associated de-Repression of Retrotransposons in the Drosophila Fat Body, Its Potential Cause and Consequence ». *Aging Cell* 15 (3): 542-52. <https://doi.org/10.1111/accel.12465>.
- Chen, Haiyang, Xiaobin Zheng, et Yixian Zheng. 2014. « Age-Associated Loss of Lamin-B Leads to Systemic Inflammation and Gut Hyperplasia ». *Cell* 159 (4): 829-43.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.028>.
- Chen, Qingfeng, Maroun Houry, et Jianzhu Chen. 2009. « Expression of Human Cytokines Dramatically Improves Reconstitution of Specific Human-Blood Lineage Cells in Humanized Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (51): 21783-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912274106>.
- Chen, Xiaoji, Kyobi Skutt-Kakaria, Jerry Davison, Yang-Li Ou, Edward Choi, Punam Malik, Keith Loeb, et al. 2012. « G9a/GLP-dependent histone H3K9me2 patterning during human hematopoietic stem cell lineage commitment ». *Genes & Development* 26 (22): 2499-2511.
<https://doi.org/10.1101/gad.200329.112>.
- Cheng, Yuanming, Hanzhi Luo, Franco Izzo, Brian F. Pickering, Diu Nguyen, Robert Myers, Alexandra Schurer, et al. 2019. « M6A RNA Methylation Maintains Hematopoietic Stem Cell Identity and Symmetric Commitment ». *Cell Reports* 28 (7): 1703-1716.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.032>.
- Cheung, Peggie, Francesco Vallania, Hayley C. Warsinske, Michele Donato, Steven Schaffert, Sarah E. Chang, Mai Dvorak, et al. 2018. « Single-Cell Chromatin Modification Profiling Reveals Increased Epigenetic Variations with Aging ». *Cell* 173 (6): 1385-1397.e14.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.079>.
- Chiappinelli, Katherine B., Pamela L. Strissel, Alexis Desrichard, Huili Li, Christine Henke, Benjamin Akman, Alexander Hein, et al. 2015. « Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via DsRNA Including Endogenous Retroviruses ». *Cell* 162 (5): 974-86.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.011>.

- Chien, Kelly S., Kunhwa Kim, Graciela M. Nogueras-Gonzalez, Gautam Borthakur, Kiran Naqvi, Naval G. Daver, Guillermo Montalban-Bravo, et al. 2021. « Phase II Study of Azacitidine with Pembrolizumab in Patients with Intermediate-1 or Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome ». *British Journal of Haematology* 195 (3): 378-87. <https://doi.org/10.1111/bjh.17689>.
- Cho, N.-Y., B.-H. Kim, M. Choi, E. J. Yoo, K. C. Moon, Y.-M. Cho, D. Kim, et G. H. Kang. 2007. « Hypermethylation of CpG Island Loci and Hypomethylation of LINE-1 and Alu Repeats in Prostate Adenocarcinoma and Their Relationship to Clinicopathological Features ». *The Journal of Pathology* 211 (3): 269-77. <https://doi.org/10.1002/path.2106>.
- Chou, Ting-Chao. 2006. « Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies ». *Pharmacological Reviews* 58 (3): 621-81. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>.
- Christensen, J. L., et I. L. Weissman. 2001. « Flk-2 Is a Marker in Hematopoietic Stem Cell Differentiation: A Simple Method to Isolate Long-Term Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (25): 14541-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.261562798>.
- Chu, Yajing, Yangpeng Chen, Huidong Guo, Mengke Li, Bichen Wang, Deyang Shi, Xuelian Cheng, et al. 2020. « SUV39H1 Regulates the Progression of MLL-AF9-Induced Acute Myeloid Leukemia ». *Oncogene* 39 (50): 7239-52. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01495-6>.
- Chuong, Edward B., Nels C. Elde, et Cédric Feschotte. 2016. « Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses ». *Science* 351 (6277): 1083-87. <https://doi.org/10.1126/science.aad5497>.
- Ciaudo, Constance, Florence Jay, Ikuhiro Okamoto, Chong-Jian Chen, Alexis Sarazin, Nicolas Servant, Emmanuel Barillot, Edith Heard, et Olivier Voinnet. 2013. « RNAi-Dependent and Independent Control of LINE1 Accumulation and Mobility in Mouse Embryonic Stem Cells ». *PLoS Genetics* 9 (11): e1003791. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003791>.
- Cimmino, Luisa, Meelad M. Dawlaty, Delphine Ndiaye-Lobry, Yoon Sing Yap, Sofia Bakogianni, Yiting Yu, Sanchari Bhattacharyya, et al. 2015. « Tet1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy ». *Nature immunology* 16 (6): 653-62. <https://doi.org/10.1038/ni.3148>.
- Clapes, Thomas, Aikaterini Polyzou, Pia Prater, Sagar, Antonio Morales-Hernández, Mariana Galvao Ferrarini, Natalie Kehrer, et al. 2021. « Chemotherapy-Induced Transposable Elements Activate MDA5 to Enhance Haematopoietic Regeneration ». *Nature Cell Biology* 23 (7): 704-17. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00707-9>.
- Collins, Patrick L., Katherine E. Kyle, Takeshi Egawa, Yoichi Shinkai, et Eugene M. Oltz. 2015. « The Histone Methyltransferase SETDB1 Represses Endogenous and Exogenous Retroviruses in B Lymphocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (27): 8367-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422187112>.
- Collins, Robert, et Xiaodong Cheng. 2010. « A Case Study in Cross-Talk: The Histone Lysine Methyltransferases G9a and GLP ». *Nucleic Acids Research* 38 (11): 3503-11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq081>.
- Colombo, Anthony R., Asif Zubair, Devi Thiagarajan, Sergey Nuzhdin, Timothy J. Triche, et Giridharan Ramsingh. 2017. « Suppression of Transposable Elements in Leukemic Stem Cells ». *Scientific Reports* 7 (1): 7029. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07356-9>.
- Comoglio, Paolo M., Livio Trusolino, et Carla Boccaccio. 2018. « Known and Novel Roles of the MET Oncogene in Cancer: A Coherent Approach to Targeted Therapy ». *Nature Reviews Cancer* 18 (6): 341-58. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0002-y>.
- Contreras-Galindo, Rafael, Mark H. Kaplan, Derek Dube, Marta J. Gonzalez-Hernandez, Susana Chan, Fan Meng, Manhong Dai, Gilbert S. Omenn, Scott D. Gitlin, et David M. Markovitz. 2015. « Human Endogenous Retrovirus Type K (HERV-K) Particles Package and Transmit HERV-K-Related Sequences ». *Journal of Virology* 89 (14): 7187-7201. <https://doi.org/10.1128/JVI.00544-15>.

- Corvelo, André, et Eduardo Eyra. 2008. « Exon Creation and Establishment in Human Genes ». *Genome Biology* 9 (9): R141. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r141>.
- Crichton, James H., Donncha S. Dunican, Marie MacLennan, Richard R. Meehan, et Ian R. Adams. 2014. « Defending the Genome from the Enemy within: Mechanisms of Retrotransposon Suppression in the Mouse Germline ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (9): 1581-1605. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1468-0>.
- Crow, Mary K., Mikhail Olfieriev, et Kyriakos A. Kirou. 2019. « Type I Interferons in Autoimmune Disease ». *Annual Review of Pathology* 14 (janvier): 369-93. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043952>.
- Crow, Yanick J., Bruce E. Hayward, Rekha Parmar, Peter Robins, Andrea Leitch, Manir Ali, Deborah N. Black, et al. 2006. « Mutations in the Gene Encoding the 3'-5' DNA Exonuclease TREX1 Cause Aicardi-Goutières Syndrome at the AGS1 Locus ». *Nature Genetics* 38 (8): 917-20. <https://doi.org/10.1038/ng1845>.
- Cuellar, Trinna L., Anna-Maria Herzner, Xiaotian Zhang, Yogesh Goyal, Colin Watanabe, Brad A. Friedman, Vasantharajan Janakiraman, et al. 2017. « Silencing of Retrotransposons by SETDB1 Inhibits the Interferon Response in Acute Myeloid Leukemia ». *The Journal of Cell Biology* 216 (11): 3535-49. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612160>.
- Czvitkovich, S., S. Sauer, A. H. Peters, E. Deiner, A. Wolf, G. Laible, S. Opravil, H. Beug, et T. Jenuwein. 2001. « Over-Expression of the SUV39H1 Histone Methyltransferase Induces Altered Proliferation and Differentiation in Transgenic Mice ». *Mechanisms of Development* 107 (1-2): 141-53. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(01\)00464-6](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(01)00464-6).
- Dalskov, Louise, Ryo Narita, Line L. Andersen, Nanna Jensen, Sonia Assil, Kenneth H. Kristensen, Jacob G. Mikkelsen, et al. 2020. « Characterization of Distinct Molecular Interactions Responsible for IRF3 and IRF7 Phosphorylation and Subsequent Dimerization ». *Nucleic Acids Research* 48 (20): 11421-33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa873>.
- Damert, Annette, Julija Raiz, Axel V. Horn, Johannes Löwer, Hui Wang, Jinchuan Xing, Mark A. Batzer, Roswitha Löwer, et Gerald G. Schumann. 2009. « 5'-Transducing SVA Retrotransposon Groups Spread Efficiently throughout the Human Genome ». *Genome Research* 19 (11): 1992-2008. <https://doi.org/10.1101/gr.093435.109>.
- 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>.
- De Cecco, Marco, Steven W. Criscione, Edward J. Peckham, Sara Hillenmeyer, Eliza A. Hamm, Jayameenakshi Manivannan, Abigail L. Peterson, Jill A. Kreiling, Nicola Neretti, et John M. Sedivy. 2013. « Genomes of Replicatively Senescent Cells Undergo Global Epigenetic Changes Leading to Gene Silencing and Activation of Transposable Elements ». *Aging Cell* 12 (2): 247-56. <https://doi.org/10.1111/acer.12047>.
- De Cecco, Marco, Steven W. Criscione, Abigail L. Peterson, Nicola Neretti, John M. Sedivy, et Jill A. Kreiling. 2013. « Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues ». *Aging (Albany NY)* 5 (12): 867-83.
- De Cecco, Marco, Takahiro Ito, Anna P. Petrashen, Amy E. Elias, Nicholas J. Skvir, Steven W. Criscione, Alberto Caligiana, et al. 2019. « L1 Drives IFN in Senescent Cells and Promotes Age-Associated Inflammation ». *Nature* 566 (7742): 73-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>.
- Deininger, Michael W. N., Jeffrey W. Tyner, et Eric Solary. 2017. « Turning the Tide in Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms ». *Nature Reviews Cancer* 17 (7): 425-40. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.40>.

- Deininger, Prescott L., John V. Moran, Mark A. Batzer, et Haig H. Kazazian. 2003. « Mobile Elements and Mammalian Genome Evolution ». *Current Opinion in Genetics & Development* 13 (6): 651-58. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.10.013>.
- Delhommeau, François, Sabrina Dupont, Véronique Della Valle, Chloé James, Severine Trannoy, Aline Massé, Olivier Kosmider, et al. 2009. « Mutation in TET2 in Myeloid Cancers ». *The New England Journal of Medicine* 360 (22): 2289-2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069>.
- Demaria, Sandra, Noriko Kawashima, Anne Marie Yang, Mary Louise Devitt, James S. Babb, James P. Allison, et Silvia C. Formenti. 2005. « Immune-Mediated Inhibition of Metastases after Treatment with Local Radiation and CTLA-4 Blockade in a Mouse Model of Breast Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (2 Pt 1): 728-34.
- Deniz, Özgen, Mamataz Ahmed, Christopher D. Todd, Ana Rio-Machin, Mark A. Dawson, et Miguel R. Branco. 2020. « Endogenous Retroviruses Are a Source of Enhancers with Oncogenic Potential in Acute Myeloid Leukaemia ». *Nature Communications* 11 (1): 3506. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17206-4>.
- Denli, Ahmet M., Iñigo Narvaiza, Bilal E. Kerman, Monique Pena, Christopher Benner, Maria C. N. Marchetto, Jolene K. Diedrich, et al. 2015. « Primate-Specific ORF0 Contributes to Retrotransposon-Mediated Diversity ». *Cell* 163 (3): 583-93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.025>.
- Derissen, Ellen J.B., Jos H. Beijnen, et Jan H.M. Schellens. 2013. « Concise Drug Review: Azacitidine and Decitabine ». *The Oncologist* 18 (5): 619-24. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0465>.
- Dickinson, Michael J., Honor Cherif, Pierre Fenaux, Moshe Mittleman, Amit Verma, Maria Socorro O Portella, Paul Burgess, et Uwe Platzbecker. 2016. « Thrombopoietin (TPO) Receptor Agonist Eltrombopag in Combination with Azacitidine (AZA) for Primary Treatment of Myelodysplastic Syndromes (MDS) Patients with Thrombocytopenia: Outcomes from the Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Support Study ». *Blood* 128 (22): 163. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.163.163>.
- Dieter, Cristine, Eloir Dutra Lourenco, et Natália Emerim Lemos. 2020. « Association of Long Non-Coding RNA and Leukemia: A Systematic Review ». *Gene* 735 (avril): 144405. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144405>.
- Djeghloul, Dounia, Klaudia Kuranda, Isabelle Kuzniak, Daniela Barbieri, Irina Naguibneva, Caroline Choisy, Jean-Christophe Bories, et al. 2016. « Age-Associated Decrease of the Histone Methyltransferase SUV39H1 in HSC Perturbs Heterochromatin and B Lymphoid Differentiation ». *Stem Cell Reports* 6 (6): 970-84. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.007>.
- Doetsch, Fiona, Isabelle Caillé, Daniel A. Lim, Jose Manuel García-Verdugo, et Arturo Alvarez-Buylla. 1999. « Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain ». *Cell* 97 (6): 703-16. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80783-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80783-7).
- Domen, J., et I. L. Weissman. 1999. « Self-Renewal, Differentiation or Death: Regulation and Manipulation of Hematopoietic Stem Cell Fate ». *Molecular Medicine Today* 5 (5): 201-8. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01464-1](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01464-1).
- Dong, Kevin B., Irina A. Maksakova, Fabio Mohn, Danny Leung, Ruth Appanah, Sandra Lee, Hao W. Yang, et al. 2008. « DNA Methylation in ES Cells Requires the Lysine Methyltransferase G9a but Not Its Catalytic Activity ». *The EMBO Journal* 27 (20): 2691-2701. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.193>.
- Doulatov, Sergei, Faiyaz Notta, Elisa Laurenti, et John E. Dick. 2012. « Hematopoiesis: A Human Perspective ». *Cell Stem Cell* 10 (2): 120-36. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>.
- Dreesen, Oliver, Alexandre Chojnowski, Peh Fern Ong, Tian Yun Zhao, John E. Common, Declan Lunny, E. Birgitte Lane, et al. 2013. « Lamin B1 Fluctuations Have Differential Effects on

- Cellular Proliferation and Senescence ». *The Journal of Cell Biology* 200 (5): 605-17. <https://doi.org/10.1083/jcb.201206121>.
- Driver, C. J., et S. W. McKechnie. 1992. « Transposable Elements as a Factor in the Aging of *Drosophila Melanogaster* ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 673 (décembre): 83-91. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb27439.x>.
- Ecco, Gabriela, Helen M. Rowe, et Didier Trono. 2016. « A Large-Scale Functional Screen to Identify Epigenetic Repressors of Retrotransposon Expression ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1400: 403-17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3372-3_25.
- Edginton-White, Benjamin, Pierre Cauchy, Salam A. Assi, Sylvia Hartmann, Arthur G. Riggs, Stephan Mathas, Peter N. Cockerill, et Constanze Bonifer. 2019. « Global Long Terminal Repeat Activation Participates in Establishing the Unique Gene Expression Programme of Classical Hodgkin Lymphoma ». *Leukemia* 33 (6): 1463-74. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0311-x>.
- Ehx, Grégory, Jean-David Larouche, Chantal Durette, Jean-Philippe Laverdure, Leslie Hesnard, Krystel Vincent, Marie-Pierre Hardy, et al. 2021. « Atypical Acute Myeloid Leukemia-Specific Transcripts Generate Shared and Immunogenic MHC Class-I-Associated Epitopes ». *Immunity* 54 (4): 737-752.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.001>.
- Eickbush, Thomas, et Harmit Malik. 2002. « Origins and Evolution of Retrotransposons ». In *Mobile DNA II*, 1111-44. <https://doi.org/10.1128/9781555817954.ch49>.
- Eissa, Hesham, Ted A. Gooley, Mohamed L. Sorrow, Franchesca Nguyen, Bart L. Scott, Kristine Doney, Keith R. Loeb, et al. 2011. « Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Chronic Myelomonocytic Leukemia: Relapse-Free Survival Is Determined by Karyotype and Comorbidities ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 17 (6): 908-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.09.018>.
- Elbarbary, Reyad A., Bronwyn A. Lucas, et Lynne E. Maquat. 2016. « Retrotransposons as Regulators of Gene Expression ». *Science (New York, N.Y.)* 351 (6274): aac7247. <https://doi.org/10.1126/science.aac7247>.
- Elizalde, Carina, Jon Fernández-Rueda, Juan Manuel Salcedo, Akaitz Dorronsoro, Izaskun Ferrin, Emma Jakobsson, et César Trigueros. 2012. « Histone Deacetylase 3 Modulates the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells ». *Stem Cells and Development* 21 (14): 2581-91. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0698>.
- Ellegast, Jana M., Gabriela Alexe, Amanda Hamze, Shan Lin, Hannah J. Uckelmann, Philipp J. Rauch, Maxim Pimkin, et al. 2022. « Unleashing Cell-Intrinsic Inflammation as a Strategy to Kill AML Blasts ». *Cancer Discovery* 12 (7): 1760-81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0956>.
- Eriksson, Maria, W. Ted Brown, Leslie B. Gordon, Michael W. Glynn, Joel Singer, Laura Scott, Michael R. Erdos, et al. 2003. « Recurrent de Novo Point Mutations in Lamin A Cause Hutchinsonson-Gilford Progeria Syndrome ». *Nature* 423 (6937): 293-98. <https://doi.org/10.1038/nature01629>.
- Ewels, Philip, Måns Magnusson, Sverker Lundin, et Max Käller. 2016. « MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report ». *Bioinformatics* 32 (19): 3047-48. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>.
- Fali, Tinhinane, Véronique Fabre-Mersseman, Takuya Yamamoto, Charles Bayard, Laura Papagno, Solène Fastenackels, Rima Zoorab, et al. 2018. « Elderly Human Hematopoietic Progenitor Cells Express Cellular Senescence Markers and Are More Susceptible to Pyroptosis ». *JCI Insight* 3 (13). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95319>.
- Fang, Run, Qifei Jiang, Xiang Zhou, Chenguang Wang, Yukun Guan, Jianli Tao, Jianzhong Xi, Ji-Ming Feng, et Zhengfan Jiang. 2017. « MAVS Activates TBK1 and IKKε through TRAFs in NEMO Dependent and Independent Manner ». *PLoS Pathogens* 13 (11): e1006720. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006720>.

- Fang, Terry C., Uwe Schaefer, Ingrid Mecklenbrauker, Astrid Stienen, Scott Dewell, Marie S. Chen, Inmaculada Rioja, et al. 2012. « Histone H3 Lysine 9 Di-Methylation as an Epigenetic Signature of the Interferon Response ». *The Journal of Experimental Medicine* 209 (4): 661-69. <https://doi.org/10.1084/jem.20112343>.
- Fares, Joanna, Linda Wolff, et Juraj Bies. 2011. *P15INK4b, a Tumor Suppressor in Acute Myeloid Leukemia. Myeloid Leukemia - Basic Mechanisms of Leukemogenesis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/27758>.
- Fasching, Liana, Adamandia Kapopoulou, Rohit Sachdeva, Rebecca Petri, Marie E. Jönsson, Christian Männe, Priscilla Turelli, et al. 2015. « TRIM28 Represses Transcription of Endogenous Retroviruses in Neural Progenitor Cells ». *Cell Reports* 10 (1): 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.004>.
- Faulkner, Geoffrey J., Yasumasa Kimura, Carsten O. Daub, Shivangi Wani, Charles Plessy, Katharine M. Irvine, Kate Schroder, et al. 2009. « The Regulated Retrotransposon Transcriptome of Mammalian Cells ». *Nature Genetics* 41 (5): 563-71. <https://doi.org/10.1038/ng.368>.
- Feinberg, Andrew P., et Benjamin Tycko. 2004. « The History of Cancer Epigenetics ». *Nature Reviews. Cancer* 4 (2): 143-53. <https://doi.org/10.1038/nrc1279>.
- Feldman, E. J., J. Cortes, D. J. DeAngelo, T. Holyoake, B. Simonsson, S. G. O'Brien, J. Reiffers, et al. 2008. « On the Use of Lonafarnib in Myelodysplastic Syndrome and Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Leukemia* 22 (9): 1707-11. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.156>.
- Fernando, Thilini R., Jorge R. Contreras, Matteo Zampini, Norma I. Rodriguez-Malave, Michael O. Alberti, Jaime Anguiano, Tiffany M. Tran, et al. 2017. « The LncRNA CASC15 Regulates SOX4 Expression in RUNX1-Rearranged Acute Leukemia ». *Molecular Cancer* 16 (1): 126. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0692-x>.
- Feschotte, Cédric, Ning Jiang, et Susan R. Wessler. 2002. « Plant Transposable Elements: Where Genetics Meets Genomics ». *Nature Reviews. Genetics* 3 (5): 329-41. <https://doi.org/10.1038/nrg793>.
- Feschotte, Cédric, et Ellen J. Pritham. 2007. « DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes ». *Annual Review of Genetics* 41: 331-68. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090448>.
- Fincham, J. R. S. 1997. « Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Edited by V. E. A. Russo, R. A. Martienssen and A. D. Riggs. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. 693+xii Pages. Price \$125. ISBN 0 87969 490 4. » *Genetics Research* 69 (2): 159-62. <https://doi.org/10.1017/S0016672397229320>.
- Finnegan, D. J. 1989. « Eukaryotic Transposable Elements and Genome Evolution ». *Trends in Genetics: TIG* 5 (4): 103-7. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90039-5).
- Florian, Maria Carolina, Karin Dörr, Anja Niebel, Deidre Daria, Hubert Schrezenmeier, Markus Rojewski, Marie-Dominique Filippi, et al. 2012. « CDC42 ACTIVITY REGULATES HEMATOPOIETIC STEM CELL AGING AND REJUVENATION ». *Cell Stem Cell* 10 (5): 520-30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.007>.
- Florian, Maria Carolina, et Hartmut Geiger. 2010. « Concise Review: Polarity in Stem Cells, Disease, and Aging ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (9): 1623-29. <https://doi.org/10.1002/stem.481>.
- Franceschi, Claudio, et Judith Campisi. 2014. « Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases ». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 69 Suppl 1 (juin): S4-9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>.
- Franke, Gerlind, Birke Bausch, Michael M. Hoffmann, Markus Cybulla, Christian Wilhelm, Jürgen Kohlhase, Gerd Scherer, et Hartmut P. H. Neumann. 2009. « Alu-Alu Recombination Underlies the Vast Majority of Large VHL Germline Deletions: Molecular Characterization and Genotype-Phenotype Correlations in VHL Patients ». *Human Mutation* 30 (5): 776-86. <https://doi.org/10.1002/humu.20948>.

- Friedli, Marc, et Didier Trono. 2015. « The Developmental Control of Transposable Elements and the Evolution of Higher Species ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31: 429-51. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125514>.
- Friedman, J. R., W. J. Fredericks, D. E. Jensen, D. W. Speicher, X. P. Huang, E. G. Neilson, et F. J. Rauscher. 1996. « KAP-1, a Novel Corepressor for the Highly Conserved KRAB Repression Domain ». *Genes & Development* 10 (16): 2067-78. <https://doi.org/10.1101/gad.10.16.2067>.
- Fujita, S., D. Honma, N. Adachi, K. Araki, E. Takamatsu, T. Katsumoto, K. Yamagata, et al. 2018. « Dual Inhibition of EZH1/2 Breaks the Quiescence of Leukemia Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 32 (4): 855-64. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.300>.
- Fuks, François, Paul J. Hurd, Rachel Deplus, et Tony Kouzarides. 2003. « The DNA Methyltransferases Associate with HP1 and the SUV39H1 Histone Methyltransferase ». *Nucleic Acids Research* 31 (9): 2305-12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg332>.
- Fukuda, Kei, et Yoichi Shinkai. 2020. « SETDB1-Mediated Silencing of Retroelements ». *Viruses* 12 (6): 596. <https://doi.org/10.3390/v12060596>.
- Fütterer, Agnes, Miguel R. Campanero, Esther Leonardo, Luis M. Criado, Juana M. Flores, Jesús M. Hernández, Jesús F. San Miguel, et Carlos Martínez-A. 2005. « Dido Gene Expression Alterations Are Implicated in the Induction of Hematological Myeloid Neoplasms ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (9): 2351-62. <https://doi.org/10.1172/JCI24177>.
- Gagelmann, Nico, Anita Badbaran, Dietrich W. Beelen, Rachel B. Salit, Friedrich Stölzel, Christina Rautenberg, Heiko Becker, et al. 2021. « A Prognostic Score Including Mutation Profile and Clinical Features for Patients with CMML Undergoing Stem Cell Transplantation ». *Blood Advances* 5 (6): 1760-69. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003600>.
- Gargiuli, Chiara, Elisa Schena, Elisabetta Mattioli, Marta Columbaro, Maria Rosaria D'Apice, Giuseppe Novelli, Tiziana Greggi, et Giovanna Lattanzi. 2018. « Lamins and Bone Disorders: Current Understanding and Perspectives ». *Oncotarget* 9 (32): 22817-31. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25071>.
- Gazquez-Gutierrez, Ana, Jeroen Witteveldt, Sara R Heras, et Sara Macias. 2021. « Sensing of Transposable Elements by the Antiviral Innate Immune System ». *RNA (New York, N.Y.)*, avril, rna.078721.121. <https://doi.org/10.1261/rna.078721.121>.
- Geiger, Hartmut, Gerald de Haan, et M. Carolina Florian. 2013. « The Ageing Haematopoietic Stem Cell Compartment ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (5): 376-89. <https://doi.org/10.1038/nri3433>.
- Geissler, K., E. Jäger, A. Barna, T. Alendar, E. Ljubuncic, T. Sliwa, et P. Valent. 2016. « Chronic Myelomonocytic Leukemia Patients with RAS Pathway Mutations Show High in Vitro Myeloid Colony Formation in the Absence of Exogenous Growth Factors ». *Leukemia* 30 (11): 2280-81. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.235>.
- Gekas, Christos, et Thomas Graf. 2013. « CD41 Expression Marks Myeloid-Biased Adult Hematopoietic Stem Cells and Increases with Age ». *Blood* 121 (22): 4463-72. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457929>.
- 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 ». *The New England Journal of Medicine* 371 (26): 2477-87. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405>.
- Gogvadze, Elena, et Anton Buzdin. 2009. « Retroelements and Their Impact on Genome Evolution and Functioning ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66 (23): 3727-42. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0107-2>.
- Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner, et R. C. Mulligan. 1996. « Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells That Are Replicating in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 183 (4): 1797-1806. <https://doi.org/10.1084/jem.183.4.1797>.
- Goodier, J.L., E.M. Ostertag, et H.H. Kazazian. 2000. « Transduction of 3'-flanking sequences is common in L1 retrotransposition ». *Human molecular genetics* 9 (avril): 653-57.

- Goodwin, Charles B, Xing Jun Li, Raghuvier S. Mali, Gordon Chan, Michelle Kang, Ziyue Liu, Bart Vanhaesebroeck, et al. 2014. « PI3K p110 δ uniquely promotes gain-of-function Shp2-induced GM-CSF hypersensitivity in a model of JMML ». *Blood* 123 (18): 2838-42. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535104>.
- Gore, Aniket V., et Brant M. Weinstein. 2016. « DNA Methylation in Hematopoietic Development and Disease ». *Experimental Hematology* 44 (9): 783-90. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.04.013>.
- Gotea, Valer, et Wojciech Makalowski. 2006. « Do Transposable Elements Really Contribute to Proteomes? ». *Trends in Genetics: TIG* 22 (5): 260-67. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.006>.
- Goubau, Delphine, Martin Schlee, Safia Deddouche, Andrea J. Pruijssers, Thomas Zillinger, Marion Goldeck, Christine Schuberth, et al. 2014. « Antiviral Immunity via RIG-I-Mediated Recognition of RNA Bearing 5'-Diphosphates ». *Nature* 514 (7522): 372-75. <https://doi.org/10.1038/nature13590>.
- Grage-Griebenow, E., R. Zawatzky, H. Kahlert, L. Brade, H. Flad, et M. Ernst. 2001. « Identification of a Novel Dendritic Cell-like Subset of CD64(+) / CD16(+) Blood Monocytes ». *European Journal of Immunology* 31 (1): 48-56. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200101\)31:1<48::aid-immu48>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200101)31:1<48::aid-immu48>3.0.co;2-5).
- Grandi, Fiorella C., James M. Rosser, Simon J. Newkirk, Jun Yin, Xiaoling Jiang, Zhuo Xing, Leanne Whitmore, et al. 2015. « Retrotransposition Creates Sloping Shores: A Graded Influence of Hypomethylated CpG Islands on Flanking CpG Sites ». *Genome Research* 25 (8): 1135-46. <https://doi.org/10.1101/gr.185132.114>.
- Graur, D., Y. Shuali, et W. H. Li. 1989. « Deletions in Processed Pseudogenes Accumulate Faster in Rodents than in Humans ». *Journal of Molecular Evolution* 28 (4): 279-85. <https://doi.org/10.1007/BF02103423>.
- Griffin, Gabriel K., Jingyi Wu, Arvin Iracheta-Vellve, James C. Patti, Jeffrey Hsu, Thomas Davis, Deborah Dele-Oni, et al. 2021. « Epigenetic Silencing by SETDB1 Suppresses Tumour Intrinsic Immunogenicity ». *Nature* 595 (7866): 309-14. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03520-4>.
- Grigoryan, Ani, Novella Guidi, Katharina Senger, Thomas Liehr, Karin Soller, Gina Marka, Angelika Vollmer, et al. 2018. « LaminA/C regulates epigenetic and chromatin architecture changes upon aging of hematopoietic stem cells ». *Genome Biology* 19 (1): 189. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1557-3>.
- Groarke, Emma M., et Neal S. Young. 2019. « Aging and Hematopoiesis ». *Clinics in geriatric medicine* 35 (3): 285-93. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.03.001>.
- Groner, Anna C., Sylvain Meylan, Angela Ciuffi, Nadine Zangger, Giovanna Ambrosini, Nicolas Dénervaud, Philipp Bucher, et Didier Trono. 2010. « KRAB-Zinc Finger Proteins and KAP1 Can Mediate Long-Range Transcriptional Repression through Heterochromatin Spreading ». *PLoS Genetics* 6 (3): e1000869. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000869>.
- Grover, Amit, Alejandra Sanjuan-Pla, Supat Thongjuea, Joana Carrelha, Alice Giustacchini, Adriana Gambardella, Iain Macaulay, et al. 2016. « Single-Cell RNA Sequencing Reveals Molecular and Functional Platelet Bias of Aged Haematopoietic Stem Cells ». *Nature Communications* 7 (1): 11075. <https://doi.org/10.1038/ncomms11075>.
- Grundy, Erin E., Noor Diab, et Katherine B. Chiappinelli. 2022. « Transposable Element Regulation and Expression in Cancer ». *The FEBS Journal* 289 (5): 1160-79. <https://doi.org/10.1111/febs.15722>.
- Gu, Zhimin, Yuxuan Liu, Yuannyu Zhang, Hui Cao, Junhua Lyu, Xun Wang, Annika Wylie, et al. 2021. « Silencing of LINE-1 Retrotransposons Is a Selective Dependency of Myeloid Leukemia ». *Nature Genetics* 53 (5): 672-82. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00829-8>.
- Gu, Zuguang, Roland Eils, et Matthias Schlesner. 2016. « Complex Heatmaps Reveal Patterns and Correlations in Multidimensional Genomic Data ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 32 (18): 2847-49. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>.

- Guerra, Veronia, Jorge M. Ramos Perez, Danielle Hammond, Kelly S. Chien, Rashmi Kanagal-Shamanna, Kiran Naqvi, Koji Sasaki, et al. 2020. « Outcomes of Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) after Hypomethylating Agent (HMA) Failure ». *Blood* 136 (Supplement 1): 22-23. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-139901>.
- Gujar, Hemant, Daniel J. Weisenberger, et Gangning Liang. 2019. « The Roles of Human DNA Methyltransferases and Their Isoforms in Shaping the Epigenome ». *Genes* 10 (2): E172. <https://doi.org/10.3390/genes10020172>.
- Gunsilius, E., G. Gastl, et A. L. Petzer. 2001. « Hematopoietic Stem Cells ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 55 (4): 186-94. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(01\)00051-8](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(01)00051-8).
- Guo, Shangqin, Jun Lu, Rita Schlanger, Hao Zhang, Judy Y. Wang, Michelle C. Fox, Louise E. Purton, et al. 2010. « MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (32): 14229-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913574107>.
- Guo, Wei, Ping Lv, Shengnan Liu, Fenglou Xu, Yanli Guo, Supeng Shen, Jia Liang, Gang Kuang, et Zhiming Dong. 2018. « Aberrant Methylation-Mediated Downregulation of Long Noncoding RNA C5orf66-AS1 Promotes the Development of Gastric Cardia Adenocarcinoma ». *Molecular Carcinogenesis* 57 (7): 854-65. <https://doi.org/10.1002/mc.22806>.
- Haan, G. de, et G. Van Zant. 1999. « Dynamic Changes in Mouse Hematopoietic Stem Cell Numbers during Aging ». *Blood* 93 (10): 3294-3301.
- Haan, Gerald de, et Seka Simone Lazare. 2018. « Aging of Hematopoietic Stem Cells ». *Blood* 131 (5): 479-87. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-746412>.
- Haitcock, Erin, Yaron Dayani, Ester Neufeld, Adam J. Zahand, Naomi Feinstein, Anna Mattout, Yosef Gruenbaum, et Jun Liu. 2005. « Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (46): 16690-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506955102>.
- Han, Jeffrey S., Suzanne T. Szak, et Jef D. Boeke. 2004. « Transcriptional Disruption by the L1 Retrotransposon and Implications for Mammalian Transcriptomes ». *Nature* 429 (6989): 268-74. <https://doi.org/10.1038/nature02536>.
- Hansen, Anne Meldgaard, Ying Ge, Mikkel Bruhn Schuster, Sachin Punthir, Janus Schou Jakobsen, Adrija Kalvisa, Marta Cecylia Tapia, et al. 2022. « H3K9 dimethylation safeguards cancer cells against activation of the interferon pathway ». *Science Advances* 8 (11): eabf8627. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf8627>.
- Hänzelmann, Sonja, Robert Castelo, et Justin Guinney. 2013. « GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data ». *BMC Bioinformatics* 14 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7>.
- Hardy, Matthew P., Catherine M. Owczarek, Lars S. Jermiin, Mikael Ejdebäck, et Paul J. Hertzog. 2004. « Characterization of the Type I Interferon Locus and Identification of Novel Genes ». *Genomics* 84 (2): 331-45. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.03.003>.
- Hashimoto, Kosuke, Eeva-Mari Jouhilahti, Virpi Töhönen, Piero Carninci, Juha Kere, et Shintaro Katayama. 2021. « Embryonic LTR Retrotransposons Supply Promoter Modules to Somatic Tissues ». *Genome Research* 31 (11): 1983-93. <https://doi.org/10.1101/gr.275354.121>.
- Hata, Kenichiro, Masaki Okano, Hong Lei, et En Li. 2002. « Dnmt3L Cooperates with the Dnmt3 Family of de Novo DNA Methyltransferases to Establish Maternal Imprints in Mice ». *Development (Cambridge, England)* 129 (8): 1983-93. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1983>.
- He, Lin, J. Michael Thomson, Michael T. Hemann, Eva Hernando-Monge, David Mu, Summer Goodson, Scott Powers, et al. 2005. « A MicroRNA Polycistron as a Potential Human Oncogene ». *Nature* 435 (7043): 828-33. <https://doi.org/10.1038/nature03552>.
- Heideman, Marinus R., Cesare Lancini, Natalie Proost, Eva Yanover, Heinz Jacobs, et Jan-Hermen Dannenberg. 2014. « Sin3a-Associated Hdac1 and Hdac2 Are Essential for Hematopoietic

- Stem Cell Homeostasis and Contribute Differentially to Hematopoiesis ». *Haematologica* 99 (8): 1292-1303. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.092643>.
- Heras, Sara R., Sara Macias, Mireya Plass, Noemí Fernandez, David Cano, Eduardo Eyra, José L. Garcia-Perez, et Javier F. Cáceres. 2013. « The Microprocessor Controls the Activity of Mammalian Retrotransposons ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (10): 1173-81. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2658>.
- Hérault, Léonard, Mathilde Poplineau, Adrien Mazuel, Nadine Platet, Élisabeth Remy, et Estelle Duprez. 2021. « Single-Cell RNA-Seq Reveals a Concomitant Delay in Differentiation and Cell Cycle of Aged Hematopoietic Stem Cells ». *BMC Biology* 19 (1): 19. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00955-z>.
- Herman, James G., et Stephen B. Baylin. 2003. « Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation ». *New England Journal of Medicine* 349 (21): 2042-54. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>.
- Hermant, Clara, et Maria-Elena Torres-Padilla. 2021. « TFs for TEs: The Transcription Factor Repertoire of Mammalian Transposable Elements ». *Genes & Development* 35 (1-2): 22-39. <https://doi.org/10.1101/gad.344473.120>.
- Hertzog, P. J., S. Y. Hwang, et I. Kola. 1994. « Role of Interferons in the Regulation of Cell Proliferation, Differentiation, and Development ». *Molecular Reproduction and Development* 39 (2): 226-32. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080390216>.
- Hidalgo, Isabel, Antonio Herrera-Merchan, Jose Manuel Ligos, Laura Carramolino, Javier Nuñez, Fernando Martinez, Orlando Dominguez, Miguel Torres, et Susana Gonzalez. 2012. « Ezh1 Is Required for Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Prevents Senescence-like Cell Cycle Arrest ». *Cell Stem Cell* 11 (5): 649-62. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.08.001>.
- Higa, Kelly C., Andrew Goodspeed, James S. Chavez, Marco De Dominicis, Etienne Danis, Vadym Zaberezhnyy, Jennifer L. Rabe, Daniel G. Tenen, Eric M. Pietras, et James DeGregori. 2021. « Chronic interleukin-1 exposure triggers selection for Cebpa-knockout multipotent hematopoietic progenitors ». *Journal of Experimental Medicine* 218 (6): e20200560. <https://doi.org/10.1084/jem.20200560>.
- Hirakata, Shigeki, et Mikiko C. Siomi. 2016. « PiRNA Biogenesis in the Germline: From Transcription of PiRNA Genomic Sources to PiRNA Maturation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1859 (1): 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.09.002>.
- Hoesel, Richard J. M. van. 2012. « Contrasting Benefits from Contralateral Implants and Hearing Aids in Cochlear Implant Users ». *Hearing Research* 288 (1-2): 100-113. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.11.014>.
- Hollander, A. I. den, J. B. ten Brink, Y. J. de Kok, S. van Soest, L. I. van den Born, M. A. van Driel, D. J. van de Pol, et al. 1999. « Mutations in a Human Homologue of Drosophila Crumbs Cause Retinitis Pigmentosa (RP12) ». *Nature Genetics* 23 (2): 217-21. <https://doi.org/10.1038/13848>.
- Houck, Catherine M., Frank P. Rinehart, et Carl W. Schmid. 1979. « A Ubiquitous Family of Repeated DNA Sequences in the Human Genome ». *Journal of Molecular Biology* 132 (3): 289-306. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90261-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90261-4).
- Hsieh, Sen-Yung, Wai-Ying Chen, Ta-Sen Yeh, I.-Shyan Sheen, et Shiu-Feng Huang. 2005. « High-Frequency Alu-Mediated Genomic Recombination/Deletion within the Caspase-Activated DNase Gene in Human Hepatoma ». *Oncogene* 24 (43): 6584-89. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208803>.
- Huang, S., et L. W. Terstappen. 1994. « Lymphoid and Myeloid Differentiation of Single Human CD34+, HLA-DR+, CD38- Hematopoietic Stem Cells ». *Blood* 83 (6): 1515-26.
- Huda, Ahsan, et Pierre R. Bushel. 2013. « Widespread Exonization of Transposable Elements in Human Coding Sequences Is Associated with Epigenetic Regulation of Transcription ». *Transcriptomics: Open Access* 1 (1): 1000101. <https://doi.org/10.4172/2329-8936.1000101>.

- Hughes, D. C. 2001. « Alternative Splicing of the Human VEGFR-3/FLT4 Gene as a Consequence of an Integrated Human Endogenous Retrovirus ». *Journal of Molecular Evolution* 53 (2): 77-79. <https://doi.org/10.1007/s002390010195>.
- Huntley, Stuart, Daniel M. Baggott, Aaron T. Hamilton, Mary Tran-Gyamfi, Shan Yang, Joomyeong Kim, Laurie Gordon, Elbert Branscomb, et Lisa Stubbs. 2006. « A Comprehensive Catalog of Human KRAB-Associated Zinc Finger Genes: Insights into the Evolutionary History of a Large Family of Transcriptional Repressors ». *Genome Research* 16 (5): 669-77. <https://doi.org/10.1101/gr.4842106>.
- Hur, Keun, Paloma Cejas, Jaime Feliu, Juan Moreno-Rubio, Emilio Burgos, C. Richard Boland, et Ajay Goel. 2014. « Hypomethylation of Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1) Leads to Activation of Proto-Oncogenes in Human Colorectal Cancer Metastasis ». *Gut* 63 (4): 635-46. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304219>.
- Imbeault, Michaël, Pierre-Yves Helleboid, et Didier Trono. 2017. « KRAB Zinc-Finger Proteins Contribute to the Evolution of Gene Regulatory Networks ». *Nature* 543 (7646): 550-54. <https://doi.org/10.1038/nature21683>.
- Ishak, Charles A., Marie Classon, et Daniel D. De Carvalho. 2018. « Deregulation of Retroelements as an Emerging Therapeutic Opportunity in Cancer ». *Trends in Cancer* 4 (8): 583-97. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.05.008>.
- Iskow, Rebecca C., Michael T. McCabe, Ryan E. Mills, Spencer Torene, W. Stephen Pittard, Andrew F. Neuwald, Erwin G. Van Meir, Paula M. Vertino, et Scott E. Devine. 2010. « Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons ». *Cell* 141 (7): 1253-61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.020>.
- Itzykson, R., et E. Solary. 2013. « An Evolutionary Perspective on Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Leukemia* 27 (7): 1441-50. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.100>.
- Itzykson, Raphael, Matthieu Duchmann, Nolwenn Lucas, et Eric Solary. 2017. « CMML: Clinical and Molecular Aspects ». *International Journal of Hematology* 105 (6): 711-19. <https://doi.org/10.1007/s12185-017-2243-z>.
- Itzykson, Raphael, Pierre Fenaux, David Bowen, Nicholas C. P. Cross, Jorge Cortes, Theo De Witte, Ulrich Germing, et al. 2018. « Diagnosis and Treatment of Chronic Myelomonocytic Leukemias in Adults: Recommendations From the European Hematology Association and the European LeukemiaNet ». *HemaSphere* 2 (6): e150. <https://doi.org/10.1097/HS9.000000000000150>.
- Itzykson, Raphaël, Olivier Kosmider, Aline Renneville, Véronique Gelsi-Boyer, Manja Meggendorfer, Margot Morabito, Céline Berthon, et al. 2013. « Prognostic Score Including Gene Mutations in Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (19): 2428-36. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.3314>.
- Itzykson, Raphaël, Olivier Kosmider, Aline Renneville, Margot Morabito, Claude Preudhomme, Céline Berthon, Lionel Adès, et al. 2013. « Clonal Architecture of Chronic Myelomonocytic Leukemias ». *Blood* 121 (12): 2186-98. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-440347>.
- Jacobs, Frank M. J., David Greenberg, Ngan Nguyen, Maximilian Haeussler, Adam D. Ewing, Sol Katzman, Benedict Paten, Sofie R. Salama, et David Haussler. 2014. « An Evolutionary Arms Race between KRAB Zinc-Finger Genes ZNF91/93 and SVA/L1 Retrotransposons ». *Nature* 516 (7530): 242-45. <https://doi.org/10.1038/nature13760>.
- Jacobson, L. O., E. L. Simmons, E. K. Marks, M. J. Robson, W. F. Bethard, et E. O. Gaston. 1950. « The Role of the Spleen in Radiation Injury and Recovery ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 35 (5): 746-70.
- Jaiswal, Siddhartha, et Benjamin L. Ebert. 2019. « Clonal hematopoiesis in human aging and disease ». *Science (New York, N.Y.)* 366 (6465): eaan4673. <https://doi.org/10.1126/science.aan4673>.

- Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. 2014. « Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes ». *New England Journal of Medicine* 371 (26): 2488-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>.
- Jaiswal, Siddhartha, Pradeep Natarajan, Alexander J. Silver, Christopher J. Gibson, Alexander G. Bick, Eugenia Shvartz, Marie McConkey, et al. 2017. « Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease ». *The New England Journal of Medicine* 377 (2): 111-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701719>.
- Jang, Hyo Sik, Nakul M. Shah, Alan Y. Du, Zea Z. Dailey, Erica C. Pehrsson, Paula M. Godoy, David Zhang, et al. 2019a. « Transposable Elements Drive Widespread Expression of Oncogenes in Human Cancers ». *Nature Genetics* 51 (4): 611-17. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0373-3>.
- Jang, Yoon-Young, et Saul J. Sharkis. 2007. « A Low Level of Reactive Oxygen Species Selects for Primitive Hematopoietic Stem Cells That May Reside in the Low-Oxygenic Niche ». *Blood* 110 (8): 3056-63. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-087759>.
- Jian, J., Y. Qiao, Y. Li, Y. Guo, H. Ma, et B. Liu. 2021. « Mutations in chronic myelomonocytic leukemia and their prognostic relevance ». *Clinical & Translational Oncology* 23 (9): 1731-42. <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02585-x>.
- Jiang, Qinghong, Julie Y. J. Ang, Ah Young Lee, Qin Cao, Kelly Y. Li, Kevin Y. Yip, et Danny C. Y. Leung. 2020. « G9a Plays Distinct Roles in Maintaining DNA Methylation, Retrotransposon Silencing, and Chromatin Looping ». *Cell Reports* 33 (4): 108315. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108315>.
- Jiang, Xiulin, Baiyang Liu, Zhi Nie, Lincan Duan, Qiuxia Xiong, Zhixian Jin, Cuiping Yang, et Yongbin Chen. 2021. « The Role of M6A Modification in the Biological Functions and Diseases ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00450-x>.
- Jiang, Ying, Andrew Dunbar, Lukasz P. Gondek, Sanjay Mohan, Manjot Rataul, Christine O'Keefe, Mikkael Sekeres, Yogen Saunthararajah, et Jaroslaw P. Maciejewski. 2009. « Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML ». *Blood* 113 (6): 1315-25. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-163246>.
- Jones, Peter A., Hitoshi Ohtani, Ankur Chakravarthy, et Daniel D. De Carvalho. 2019. « Epigenetic Therapy in Immune-Oncology ». *Nature Reviews. Cancer* 19 (3): 151-61. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0109-9>.
- Jönsson, Marie E., Per Ludvik Brattås, Charlotte Gustafsson, Rebecca Petri, David Yudovich, Karolina Piracs, Shana Verschuere, et al. 2019. « Activation of Neuronal Genes via LINE-1 Elements upon Global DNA Demethylation in Human Neural Progenitors ». *Nature Communications* 10 (1): 3182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11150-8>.
- Kabi, Manisha, et Guillaume J. Filion. 2021. « Heterochromatin: did H3K9 methylation evolve to tame transposons? ». *Genome Biology* 22 (1): 325. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02550-5>.
- Kaer, Kristel, et Mart Speek. 2012. « Intronic Retroelements: Not Just "Speed Bumps" for RNA Polymerase II ». *Mobile Genetic Elements* 2 (3): 154-57. <https://doi.org/10.4161/mge.20774>.
- Kajikawa, Masaki, et Norihiro Okada. 2002. « LINEs Mobilize SINEs in the Eel through a Shared 3' Sequence ». *Cell* 111 (3): 433-44. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01041-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01041-3).
- Kamminga, Leonie M., Ronald van Os, Albertina Ausema, Estelle J. K. Noach, Ellen Weersing, Bert Dontje, Edo Vellenga, et Gerald de Haan. 2005. « Impaired Hematopoietic Stem Cell Functioning after Serial Transplantation and during Normal Aging ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23 (1): 82-92. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0066>.
- Kamp, C., P. Hirschmann, H. Voss, K. Huellen, et P. H. Vogt. 2000. « Two Long Homologous Retroviral Sequence Blocks in Proximal Yq11 Cause AZFa Microdeletions as a Result of Intrachromosomal Recombination Events ». *Human Molecular Genetics* 9 (17): 2563-72. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.17.2563>.

- Kaneko, Hiroki, Sami Dridi, Valeria Tarallo, Bradley D. Gelfand, Benjamin J. Fowler, Won Gil Cho, Mark E. Kleinman, et al. 2011. « DICER1 Deficit Induces Alu RNA Toxicity in Age-Related Macular Degeneration ». *Nature* 471 (7338): 325-30. <https://doi.org/10.1038/nature09830>.
- Karimi, Mohammad M., Preeti Goyal, Irina A. Maksakova, Misha Bilenky, Danny Leung, Jie Xin Tang, Yoichi Shinkai, et al. 2011. « DNA Methylation and SETDB1/H3K9me3 Regulate Predominantly Distinct Sets of Genes, Retroelements, and Chimeric Transcripts in MESENTERIC Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 8 (6): 676-87. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.004>.
- Kassiotis, George. 2014. « Endogenous Retroviruses and the Development of Cancer ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (4): 1343-49. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302972>.
- Kassiotis, George, et Jonathan P. Stoye. 2016. « Immune Responses to Endogenous Retroelements: Taking the Bad with the Good ». *Nature Reviews. Immunology* 16 (4): 207-19. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.27>.
- Kato, Hiroki, Osamu Takeuchi, Eriko Mikamo-Satoh, Reiko Hirai, Tomoji Kawai, Kazufumi Matsushita, Akane Hiiragi, Terence S. Dermody, Takashi Fujita, et Shizuo Akira. 2008. « Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5 ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (7): 1601-10. <https://doi.org/10.1084/jem.20080091>.
- Kawai, Taro, Ken Takahashi, Shintaro Sato, Cevayir Coban, Himanshu Kumar, Hiroki Kato, Ken J. Ishii, Osamu Takeuchi, et Shizuo Akira. 2005. « IPS-1, an Adaptor Triggering RIG-I- and Mda5-Mediated Type I Interferon Induction ». *Nature Immunology* 6 (10): 981-88. <https://doi.org/10.1038/ni1243>.
- Keenan, Christine R., Nadia Iannarella, Gaetano Naselli, Naiara G. Bediaga, Timothy M. Johanson, Leonard C. Harrison, et Rhys S. Allan. 2020. « Extreme disruption of heterochromatin is required for accelerated hematopoietic aging ». *Blood* 135 (23): 2049-58. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002990>.
- Kelsey, Maxfield M G. 2021. « Reconsidering LINE-1's role in cancer: does LINE-1 function as a reporter detecting early cancer-associated epigenetic signatures? ». *Evolution, Medicine, and Public Health* 9 (1): 78-82. <https://doi.org/10.1093/emph/eoab004>.
- Kent, David G., Michael R. Copley, Claudia Benz, Stefan Wöhrer, Brad J. Dykstra, Elaine Ma, John Cheyne, et al. 2009. « Prospective Isolation and Molecular Characterization of Hematopoietic Stem Cells with Durable Self-Renewal Potential ». *Blood* 113 (25): 6342-50. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-192054>.
- Khan, Hameed, Arian Smit, et Stéphane Boissinot. 2006. « Molecular evolution and tempo of amplification of human LINE-1 retrotransposons since the origin of primates ». *Genome Research* 16 (1): 78-87. <https://doi.org/10.1101/gr.4001406>.
- Khoury, Joseph D., Eric Solary, Oussama Abla, Yasmine Akkari, Rita Alaggio, Jane F. Apperley, Rafael Bejar, et al. 2022. « The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms ». *Leukemia* 36 (7): 1703-19. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.
- Kidwell, Margaret G., et Damon R. Lisch. 2001. « Perspective: Transposable Elements, Parasitic Dna, and Genome Evolution ». *Evolution* 55 (1): 1-24. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01268.x>.
- Kiel, Mark J., Omer H. Yilmaz, Toshihide Iwashita, Osman H. Yilmaz, Cox Terhorst, et Sean J. Morrison. 2005. « SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells ». *Cell* 121 (7): 1109-21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.026>.
- Kim, Ji-Young, Kee-Beom Kim, Gwang Hyeon Eom, Nakwon Choe, Hae Jin Kee, Hye-Ju Son, Si-Taek Oh, et al. 2012. « KDM3B Is the H3K9 Demethylase Involved in Transcriptional Activation of Irf2 in Leukemia ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (14): 2917-33. <https://doi.org/10.1128/MCB.00133-12>.

- Kim, Mijung, Donna D. Cooper, Stanley F. Hayes, et Gerald J. Spangrude. 1998. « Rhodamine-123 Staining in Hematopoietic Stem Cells of Young Mice Indicates Mitochondrial Activation Rather Than Dye Efflux ». *Blood* 91 (11): 4106-17. <https://doi.org/10.1182/blood.V91.11.4106>.
- Kim, Songmi, Chun-Sung Cho, Kyudong Han, et Jungnam Lee. 2016. « Structural Variation of Alu Element and Human Disease ». *Genomics & Informatics* 14 (3): 70-77. <https://doi.org/10.5808/GI.2016.14.3.70>.
- Klein, Savannah J., et Rachel J. O'Neill. 2018. « Transposable elements: genome innovation, chromosome diversity, and centromere conflict ». *Chromosome Research* 26 (1): 5-23. <https://doi.org/10.1007/s10577-017-9569-5>.
- Klift, Heleen van der, Juul Wijnen, Anja Wagner, Paul Verkuilen, Carli Tops, Robyn Otway, Maija Kohonen-Corish, et al. 2005. « Molecular Characterization of the Spectrum of Genomic Deletions in the Mismatch Repair Genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 Responsible for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC) ». *Genes, Chromosomes & Cancer* 44 (2): 123-38. <https://doi.org/10.1002/gcc.20219>.
- Klinakis, Apostolos, Camille Lobry, Omar Abdel-Wahab, Philmo Oh, Hiroshi Haeno, Silvia Buonamici, Inge van De Walle, et al. 2011. « A Novel Tumour-Suppressor Function for the Notch Pathway in Myeloid Leukaemia ». *Nature* 473 (7346): 230-33. <https://doi.org/10.1038/nature09999>.
- Kobayashi, K., Y. Nakahori, M. Miyake, K. Matsumura, E. Kondo-Iida, Y. Nomura, M. Segawa, et al. 1998. « An Ancient Retrotransposal Insertion Causes Fukuyama-Type Congenital Muscular Dystrophy ». *Nature* 394 (6691): 388-92. <https://doi.org/10.1038/28653>.
- Köhler, Anja, Vince Schmithorst, Marie-Dominique Filippi, Marnie A. Ryan, Deidre Daria, Matthias Gunzer, et Hartmut Geiger. 2009. « Altered Cellular Dynamics and Endosteal Location of Aged Early Hematopoietic Progenitor Cells Revealed by Time-Lapse Intravital Imaging in Long Bones ». *Blood* 114 (2): 290-98. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195644>.
- Koide, Shuhei, Motohiko Oshima, Keiyo Takubo, Satoshi Yamazaki, Eriko Nitta, Atsunori Saraya, Kazumasa Aoyama, et al. 2016. « Setdb1 Maintains Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by Restricting the Ectopic Activation of Nonhematopoietic Genes ». *Blood* 128 (5): 638-49. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-694810>.
- Kon, Ayana, Satoshi Yamazaki, Yasuhito Nannya, Keisuke Kataoka, Yasunori Ota, Masahiro Marshall Nakagawa, Kenichi Yoshida, et al. 2018. « Physiological Srsf2 P95H Expression Causes Impaired Hematopoietic Stem Cell Functions and Aberrant RNA Splicing in Mice ». *Blood* 131 (6): 621-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-762393>.
- Kong, Yu, Christopher M. Rose, Ashley A. Cass, Alexander G. Williams, Martine Darwish, Steve Lianoglou, Peter M. Haverty, et al. 2019. « Transposable Element Expression in Tumors Is Associated with Immune Infiltration and Increased Antigenicity ». *Nature Communications* 10 (1): 5228. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13035-2>.
- Konturek-Ciesla, Anna, et David Bryder. 2022. « Stem Cells, Hematopoiesis and Lineage Tracing: Transplantation-Centric Views and Beyond ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.903528>.
- Kotecha, Nimesh, Nikki J. Flores, Jonathan M. Irish, Erin F. Simonds, Debbie S. Sakai, Sophie Archambeault, Ernesto Diaz-Flores, et al. 2008. « Single-Cell Profiling Identifies Aberrant STAT5 Activation in Myeloid Malignancies with Specific Clinical and Biologic Correlates ». *Cancer Cell* 14 (4): 335-43. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.08.014>.
- Kotini, Andriana G., Chan-Jung Chang, Ibrahim Boussaad, Jeffrey J. Delrow, Emily K. Dolezal, Abhinav B. Nagulapally, Fabiana Perna, et al. 2015. « Functional Analysis of a Chromosomal Deletion Associated with Myelodysplastic Syndromes Using Isogenic Human Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 33 (6): 646-55. <https://doi.org/10.1038/nbt.3178>.
- Kotini, Andriana G., Chan-Jung Chang, Arthur Chow, Han Yuan, Tzu-Chieh Ho, Tiansu Wang, Shailee Vora, et al. 2017. « Stage-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cells Map the

- Progression of Myeloid Transformation to Transplantable Leukemia ». *Cell Stem Cell* 20 (3): 315-328.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.01.009>.
- Kovalskaya, Elena, Anton Buzdin, Elena Gogvadze, Tatyana Vinogradova, et Eugene Sverdlov. 2006. « Functional Human Endogenous Retroviral LTR Transcription Start Sites Are Located between the R and U5 Regions ». *Virology* 346 (2): 373-78. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.007>.
- Kramer, Ashley, et Grant A. Challen. 2017. « The Epigenetic Basis of Hematopoietic Stem Cell Aging ». *Seminars in Hematology* 54 (1): 19-24. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2016.10.006>.
- Kramerov, Dimitri A., et Nikita S. Vassetzky. 2005. « Short Retroposons in Eukaryotic Genomes ». *International Review of Cytology* 247: 165-221. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)47004-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)47004-7).
- Kuranda, Klaudia, Jacques Vargaftig, Philippe de la Rochere, Christine Dosquet, Dominique Charron, Florence Bardin, Cecile Tonnelle, Dominique Bonnet, et Michele Goodhardt. 2011. « Age-Related Changes in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells ». *Aging Cell* 10 (3): 542-46. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00675.x>.
- Kwon, Jihyun. 2021. « Diagnosis and treatment of chronic myelomonocytic leukemia ». *Blood research* 56 (Suppl 1): 5-16. <https://doi.org/10.5045/br.2021.2020321>.
- Lagemaat, Louie N. van de, Josette-Renée Landry, Dixie L. Mager, et Patrik Medstrand. 2003. « Transposable Elements in Mammals Promote Regulatory Variation and Diversification of Genes with Specialized Functions ». *Trends in Genetics: TIG* 19 (10): 530-36. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.08.004>.
- Lagemaat, Louie N. van de, Patrik Medstrand, et Dixie L. Mager. 2006. « Multiple Effects Govern Endogenous Retrovirus Survival Patterns in Human Gene Introns ». *Genome Biology* 7 (9): R86. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-r86>.
- Lagneaux, Laurence, Nicolas Gillet, Basile Stamatopoulos, Alain Delforge, Marielle Dejeneffe, Martine Massy, Nathalie Meuleman, et al. 2007. « Valproic Acid Induces Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells through Activation of the Death Receptor Pathway and Potentiates TRAIL Response ». *Experimental Hematology* 35 (10): 1527-37. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.06.014>.
- Lamprecht, Björn, Korden Walter, Stephan Kreher, Raman Kumar, Michael Hummel, Dido Lenze, Karl Köchert, et al. 2010. « Derepression of an Endogenous Long Terminal Repeat Activates the CSF1R Proto-Oncogene in Human Lymphoma ». *Nature Medicine* 16 (5): 571-79, 1p following 579. <https://doi.org/10.1038/nm.2129>.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, et al. 2001. « Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome ». *Nature* 409 (6822): 860-921. <https://doi.org/10.1038/35057062>.
- Langemeijer, Saskia M. C., Roland P. Kuiper, Marieke Berends, Ruth Knops, Mariam G. Aslanyan, Marion Massop, Ellen Stevens-Linders, et al. 2009. « Acquired Mutations in TET2 Are Common in Myelodysplastic Syndromes ». *Nature Genetics* 41 (7): 838-42. <https://doi.org/10.1038/ng.391>.
- Langmead, Ben, et Steven L. Salzberg. 2012. « Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2 ». *Nature Methods* 9 (4): 357-59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Lapidot, T., Yfat Fajerman, et Orit Kollet. 1997. « Immune-Deficient SCID and NOD/SCID Mice Models as Functional Assays for Studying Normal and Malignant Human Hematopoiesis ». *Journal of Molecular Medicine* 75 (9): 664-73. <https://doi.org/10.1007/s001090050150>.
- Larouche, Jean-David, Assya Trofimov, Leslie Hesnard, Gregory Ehx, Qingchuan Zhao, Krystal Vincent, Chantal Durette, et al. 2020. « Widespread and tissue-specific expression of endogenous retroelements in human somatic tissues ». *Genome Medicine* 12 (1): 40. <https://doi.org/10.1186/s13073-020-00740-7>.

- Latchney, Sarah E., et Laura M. Calvi. 2017. « The Aging Hematopoietic Stem Cell Niche: Phenotypic and Functional Changes and Mechanisms That Contribute to Hematopoietic Aging ». *Seminars in Hematology* 54 (1): 25-32. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2016.10.001>.
- Lau, Chi-Chiu, Tingting Sun, Arthur K. K. Ching, Mian He, Jing-Woei Li, Alissa M. Wong, Ngai Na Co, et al. 2014. « Viral-Human Chimeric Transcript Predisposes Risk to Liver Cancer Development and Progression ». *Cancer Cell* 25 (3): 335-49. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.030>.
- Laurenti, Elisa, et Berthold Göttgens. 2018. « From Haematopoietic Stem Cells to Complex Differentiation Landscapes ». *Nature* 553 (7689): 418-26. <https://doi.org/10.1038/nature25022>.
- Laval, Bérengère de, Patrycja Pawlikowska, Daniela Barbieri, Corinne Besnard-Guerin, Alba Cico, Rajiv Kumar, Murielle Gaudry, Véronique Baud, et Françoise Porteu. 2014. « Thrombopoietin Promotes NHEJ DNA Repair in Hematopoietic Stem Cells through Specific Activation of Erk and NF-KB Pathways and Their Target, IEX-1 ». *Blood* 123 (4): 509-19. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-515874>.
- Laval, Bérengère de, Patrycja Pawlikowska, Laurence Petit-Cocault, Chrystèle Bilhou-Nabera, Geneviève Aubin-Houzelstein, Michèle Souyri, Frédéric Pouzoulet, Murielle Gaudry, et Françoise Porteu. 2013. « Thrombopoietin-Increased DNA-PK-Dependent DNA Repair Limits Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Mutagenesis in Response to DNA Damage ». *Cell Stem Cell* 12 (1): 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.012>.
- LeBien, Tucker W., et Thomas F. Tedder. 2008. « B Lymphocytes: How They Develop and Function ». *Blood* 112 (5): 1570-80. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>.
- Lebon, Pierre, Jean Badoual, Gérard Ponsot, Françoise Goutières, Françoise Hèmeury-Cukier, et Jean Aicardi. 1988. « Intrathecal Synthesis of Interferon-Alpha in Infants with Progressive Familial Encephalopathy ». *Journal of the Neurological Sciences* 84 (2): 201-8. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(88\)90125-6](https://doi.org/10.1016/0022-510X(88)90125-6).
- Lee, Andrew K, Dong Pan, Xuhui Bao, Mengjie Hu, Fang Li, et Chuan-Yuan Li. 2020. « Endogenous retrovirus activation as a key mechanism of anti-tumor immune response in radiotherapy ». *Radiation research* 193 (4): 305-17. <https://doi.org/10.1667/RADE-20-00013>.
- Lee, Benjamin H., Zuzana Tothova, Ross L. Levine, Kristina Anderson, Natalija Buza-Vidas, Dana E. Cullen, Elizabeth P. McDowell, et al. 2007. « FLT3 Mutations Confer Enhanced Proliferation and Survival Properties to Multipotent Progenitors in a Murine Model of Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Cancer Cell* 12 (4): 367-80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.031>.
- Lee, Eunjung, Rebecca Iskow, Lixing Yang, Omer Gokcumen, Psalm Haseley, Lovelace J. Luquette, Jens G. Lohr, et al. 2012. « Landscape of Somatic Retrotransposition in Human Cancers ». *Science (New York, N.Y.)* 337 (6097): 967-71. <https://doi.org/10.1126/science.1222077>.
- Lee, Ju Youn, Zhe Ji, et Bin Tian. 2008. « Phylogenetic analysis of mRNA polyadenylation sites reveals a role of transposable elements in evolution of the 3'-end of genes ». *Nucleic Acids Research* 36 (17): 5581-90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn540>.
- Lee, Jungwoon, Suk Ran Yoon, Inpyo Choi, et Haiyoung Jung. 2019. « Causes and Mechanisms of Hematopoietic Stem Cell Aging ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (6): E1272. <https://doi.org/10.3390/ijms20061272>.
- Lee, Yuh Chwen G. 2015. « The Role of PiRNA-Mediated Epigenetic Silencing in the Population Dynamics of Transposable Elements in *Drosophila Melanogaster* ». *PLOS Genetics* 11 (6): e1005269. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005269>.
- Lee-Six, Henry, Nina Friesgaard Øbro, Mairi S. Shepherd, Sebastian Grossmann, Kevin Dawson, Miriam Belmonte, Robert J. Osborne, et al. 2018. « Population Dynamics of Normal Human Blood Inferred from Somatic Mutations ». *Nature* 561 (7724): 473-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0497-0>.
- Lefkopoulos, Stylianos, Aikaterini Polyzou, Marta Derecka, Veronica Bergo, Thomas Clapes, Pierre Cauchy, Carolina Jerez-Longres, et al. 2020. « Repetitive Elements Trigger RIG-I-like Receptor

- Signaling That Regulates the Emergence of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells ». *Immunity* 53 (5): 934-951.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.007>.
- Lehnertz, Bernhard, Caroline Pabst, Le Su, Michelle Miller, Feng Liu, Lin Yi, Regan Zhang, et al. 2014. « The methyltransferase G9a regulates HoxA9-dependent transcription in AML ». *Genes & Development* 28 (4): 317-27. <https://doi.org/10.1101/gad.236794.113>.
- Leib-Mösch, C., et W. Seifarth. 1995. « Evolution and Biological Significance of Human Retroelements ». *Virus Genes* 11 (2-3): 133-45. <https://doi.org/10.1007/BF01728654>.
- Levin, D., et I. M. London. 1978. « Regulation of Protein Synthesis: Activation by Double-Stranded RNA of a Protein Kinase That Phosphorylates Eukaryotic Initiation Factor 2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (3): 1121-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.3.1121>.
- Li, Heng, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, Richard Durbin, et 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. « The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (16): 2078-79. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- Li, Sihui, Shafat Ali, Xiaotao Duan, Songbai Liu, Juan Du, Changwei Liu, Huifang Dai, et al. 2018. « JMJD1B Demethylates H4R3me2s and H3K9me2 to Facilitate Gene Expression for Development of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells ». *Cell reports* 23 (2): 389-403. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.051>.
- Li, Tuo, et Zhijian J. Chen. 2018. « The CGAS-CGAMP-STING Pathway Connects DNA Damage to Inflammation, Senescence, and Cancer ». *The Journal of Experimental Medicine* 215 (5): 1287-99. <https://doi.org/10.1084/jem.20180139>.
- Li, W., L. Prazak, N. Chatterjee, S Grüninger, L. Krug, D. Theodorou, et J. Dubnau. 2013. « Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila* ». *Nature neuroscience* 16 (5): 529-31. <https://doi.org/10.1038/nn.3368>.
- Li, Zejuan, Hengyou Weng, Rui Su, Xiaocheng Weng, Zhixiang Zuo, Chenying Li, Huilin Huang, et al. 2017. « FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N6-methyladenosine RNA demethylase ». *Cancer cell* 31 (1): 127-41. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.017>.
- Li, Zhe, Xiaoqiang Cai, Chen-Leng Cai, Jiapeng Wang, Wenyong Zhang, Bruce E. Petersen, Feng-Chun Yang, et Mingjiang Xu. 2011a. « Deletion of Tet2 in Mice Leads to Dysregulated Hematopoietic Stem Cells and Subsequent Development of Myeloid Malignancies ». *Blood* 118 (17): 4509-18. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-325241>.
- Liang, Ying, Gary Van Zant, et Stephen J. Szilvassy. 2005. « Effects of Aging on the Homing and Engraftment of Murine Hematopoietic Stem and Progenitor Cells ». *Blood* 106 (4): 1479-87. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4282>.
- Liapis, Konstantinos, et Ioannis Kotsianidis. 2021. « Approaching First-Line Treatment in Patients With Advanced CMML: Hypomethylating Agents or Cytotoxic Treatment? » *Frontiers in Oncology* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.801524>.
- Liberzon, Arthur, Chet Birger, Helga Thorvaldsdóttir, Mahmoud Ghandi, Jill P. Mesirov, et Pablo Tamayo. 2015. « The Molecular Signatures Database (MSigDB) Hallmark Gene Set Collection ». *Cell Systems* 1 (6): 417-25. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>.
- Lin, Lan, Shihao Shen, Anne Tye, James J. Cai, Peng Jiang, Beverly L. Davidson, et Yi Xing. 2008. « Diverse Splicing Patterns of Exonized Alu Elements in Human Tissues ». *PLOS Genetics* 4 (10): e1000225. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000225>.
- Liu, Feng, Dalia Barsyte-Lovejoy, Fengling Li, Yan Xiong, Victoria Korboukh, Xi-Ping Huang, Abdellah Allali-Hassani, et al. 2013. « Discovery of an in Vivo Chemical Probe of the Lysine Methyltransferases G9a and GLP ». *Journal of Medicinal Chemistry* 56 (21): 8931-42. <https://doi.org/10.1021/jm401480r>.
- Liu, Hien Duong, Kwang Woo Ahn, Zhen-Huan Hu, Mehdi Hamadani, Taiga Nishihori, Baldeep Wirk, Amer Beitinjaneh, et al. 2017. « Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Adult Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal*

- of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 23 (5): 767-75.
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.01.078>.
- Liu, Minmin, Stacey L. Thomas, Ashley K. DeWitt, Wanding Zhou, Zachary B. Madaj, Hitoshi Ohtani, Stephen B. Baylin, Gangning Liang, et Peter A. Jones. 2018. « Dual Inhibition of DNA and Histone Methyltransferases Increases Viral Mimicry in Ovarian Cancer Cells ». *Cancer Research* 78 (20): 5754-66. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3953>.
- Liu, Nian, Cameron H. Lee, Tomek Swigut, Edward Grow, Bo Gu, Michael C. Bassik, et Joanna Wysocka. 2018. « Selective Silencing of Euchromatic L1s Revealed by Genome-Wide Screens for L1 Regulators ». *Nature* 553 (7687): 228-32. <https://doi.org/10.1038/nature25179>.
- Loghavi, Sanam, et Joseph D. Khoury. 2018. « Recent Updates on Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Current Hematologic Malignancy Reports* 13 (6): 446-54.
<https://doi.org/10.1007/s11899-018-0475-5>.
- Loo Yau, Helen, Ilias Ettayebi, et Daniel D. De Carvalho. 2019. « The Cancer Epigenome: Exploiting Its Vulnerabilities for Immunotherapy ». *Trends in Cell Biology* 29 (1): 31-43.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.07.006>.
- López-Otín, Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, et Guido Kroemer. 2013. « The Hallmarks of Aging ». *Cell* 153 (6): 1194-1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- Lorenz, E., D. Uphoff, T. R. Reid, et E. Shelton. 1951. « Modification of Irradiation Injury in Mice and Guinea Pigs by Bone Marrow Injections ». *Journal of the National Cancer Institute* 12 (1): 197-201.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, et Simon Anders. 2014. « Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 ». *Genome Biology* 15 (12): 550.
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- Luo, Min, Mira Jeong, Deqiang Sun, Hyun Jung Park, Benjamin A. T. Rodriguez, Zheng Xia, Liubin Yang, et al. 2015. « Long Non-Coding RNAs Control Hematopoietic Stem Cell Function ». *Cell Stem Cell* 16 (4): 426-38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.002>.
- Lv, Kaosheng, Jing Jiang, Ryan Donaghy, Christopher R. Riling, Ying Cheng, Vemika Chandra, Krasimira Rozenova, et al. 2017. « CBL Family E3 Ubiquitin Ligases Control JAK2 Ubiquitination and Stability in Hematopoietic Stem Cells and Myeloid Malignancies ». *Genes & Development* 31 (10): 1007-23. <https://doi.org/10.1101/gad.297135.117>.
- Machado, Patrícia M., Rita D. Brandão, Branca M. Cavaco, Joana Eugénio, Sandra Bento, Mónica Nave, Paula Rodrigues, Aires Fernandes, et Fátima Vaz. 2007. « Screening for a BRCA2 Rearrangement in High-Risk Breast/Ovarian Cancer Families: Evidence for a Founder Effect and Analysis of the Associated Phenotypes ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (15): 2027-34.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.9443>.
- Maison, Christèle, et Geneviève Almouzni. 2004. « HP1 and the Dynamics of Heterochromatin Maintenance ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (4): 296-304.
<https://doi.org/10.1038/nrm1355>.
- Majeti, Ravindra, Christopher Y. Park, et Irving L. Weissman. 2007. « Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood ». *Cell Stem Cell* 1 (6): 635-45.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.001>.
- Makałowski, W. 2000. « Genomic Scrap Yard: How Genomes Utilize All That Junk ». *Gene* 259 (1-2): 61-67. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00436-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00436-4).
- Makałowski, Wojciech, Valer Gotea, Amit Pande, et Izabela Makałowska. 2019. « Transposable Elements: Classification, Identification, and Their Use As a Tool For Comparative Genomics ». In *Evolutionary Genomics: Statistical and Computational Methods*, édité par Maria Anisimova, 177-207. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0_6.
- Makino, Satoshi, Ryuji Kaji, Satoshi Ando, Maiko Tomizawa, Katsuhito Yasuno, Satoshi Goto, Shinnichi Matsumoto, et al. 2007. « Reduced Neuron-Specific Expression of the TAF1 Gene Is

- Associated with X-Linked Dystonia-Parkinsonism ». *American Journal of Human Genetics* 80 (3): 393-406. <https://doi.org/10.1086/512129>.
- Maksakova, Irina A., Peter J. Thompson, Preeti Goyal, Steven Jm Jones, Prim B. Singh, Mohammad M. Karimi, et Matthew C. Lorincz. 2013. « Distinct Roles of KAP1, HP1 and G9a/GLP in Silencing of the Two-Cell-Specific Retrotransposon MERVL in Mouse ES Cells ». *Epigenetics & Chromatin* 6 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-15>.
- Mangiavacchi, Arianna, Peng Liu, Francesco Della Valle, et Valerio Orlando. 2021. « New Insights into the Functional Role of Retrotransposon Dynamics in Mammalian Somatic Cells ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 78 (13): 5245-56. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03851-5>.
- Månsson, Robert, Anne Hultquist, Sidinh Luc, Liping Yang, Kristina Anderson, Shabnam Kharazi, Suleiman Al-Hashmi, et al. 2007. « Molecular Evidence for Hierarchical Transcriptional Lineage Priming in Fetal and Adult Stem Cells and Multipotent Progenitors ». *Immunity* 26 (4): 407-19. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.013>.
- Maquat, Lynne E. 2020. « Short Interspersed Nuclear Element (SINE)-Mediated Post-Transcriptional Effects on Human and Mouse Gene Expression: SINE-UP for Active Duty ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 375 (1795): 20190344. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0344>.
- Mardani, Rajab, Mohammad Hassan Jafari Najaf Abadi, Mahsa Motieian, Sima Taghizadeh-Boroujeni, Amir Bayat, Alireza Farsinezhad, Seyed Mohammad Gheibi Hayat, Mahtab Motieian, et Hossein Pourghadamyari. 2019. « MicroRNA in Leukemia: Tumor Suppressors and Oncogenes with Prognostic Potential ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (6): 8465-86. <https://doi.org/10.1002/jcp.27776>.
- Martens, Joost H. A., Roderick J. O'Sullivan, Ulrich Braunschweig, Susanne Opravil, Martin Radolf, Peter Steinlein, et Thomas Jenuwein. 2005. « The Profile of Repeat-Associated Histone Lysine Methylation States in the Mouse Epigenome ». *The EMBO Journal* 24 (4): 800-812. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600545>.
- Martin, Sandra L. 2006. « The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function during L1 Retrotransposition ». *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2006 (1): 45621. <https://doi.org/10.1155/JBB/2006/45621>.
- Matsui, Toshiyuki, Danny Leung, Hiroki Miyashita, Irina A. Maksakova, Hitoshi Miyachi, Hiroshi Kimura, Makoto Tachibana, Matthew C. Lorincz, et Yoichi Shinkai. 2010. « Proviral Silencing in Embryonic Stem Cells Requires the Histone Methyltransferase ESET ». *Nature* 464 (7290): 927-31. <https://doi.org/10.1038/nature08858>.
- McClintock, B. 1941. « The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays ». *Genetics* 26 (2): 234-82. <https://doi.org/10.1093/genetics/26.2.234>.
- Mcclintock, B. 1956. « Controlling Elements and the Gene ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 21: 197-216. <https://doi.org/10.1101/sqb.1956.021.01.017>.
- Meisler, M. H., et C. N. Ting. 1993. « The Remarkable Evolutionary History of the Human Amylase Genes ». *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 4 (3-4): 503-9. <https://doi.org/10.1177/10454411930040033501>.
- Meldi, Kristen, Tingting Qin, Francesca Buchi, Nathalie Droin, Jason Sotzen, Jean-Baptiste Micol, Dorothée Selimoglu-Buet, et al. 2015. « Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia ». *The Journal of Clinical Investigation* 125 (5): 1857-72. <https://doi.org/10.1172/JCI78752>.
- Merlevede, Jane, Nathalie Droin, Tingting Qin, Kristen Meldi, Kenichi Yoshida, Margot Morabito, Emilie Chautard, et al. 2016. « Mutation Allele Burden Remains Unchanged in Chronic Myelomonocytic Leukaemia Responding to Hypomethylating Agents ». *Nature Communications* 7 (1): 10767. <https://doi.org/10.1038/ncomms10767>.

- Miglio, Umberto, Enrico Berrino, Mara Panero, Giulio Ferrero, Lucia Coscujuela Tarrero, Valentina Miano, Carmine Dell'Aglio, et al. 2018. « The Expression of LINE1-MET Chimeric Transcript Identifies a Subgroup of Aggressive Breast Cancers ». *International Journal of Cancer* 143 (11): 2838-48. <https://doi.org/10.1002/ijc.31831>.
- Mikkola, Hanna K. A., et Stuart H. Orkin. 2006. « The Journey of Developing Hematopoietic Stem Cells ». *Development (Cambridge, England)* 133 (19): 3733-44. <https://doi.org/10.1242/dev.02568>.
- Miller, Jeffrey S., Valarie McCullar, Michael Punzel, Ihor R. Lemischka, et Kateri A. Moore. 1999. « Single Adult Human CD34+/Lin-/CD38- Progenitors Give Rise to Natural Killer Cells, B-Lineage Cells, Dendritic Cells, and Myeloid Cells ». *Blood* 93 (1): 96-106. <https://doi.org/10.1182/blood.V93.1.96>.
- Mills, Ryan E., E. Andrew Bennett, Rebecca C. Iskow, et Scott E. Devine. 2007. « Which Transposable Elements Are Active in the Human Genome? ». *Trends in Genetics: TIG* 23 (4): 183-91. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.006>.
- Minucci, Saverio, et Pier Giuseppe Pelicci. 2006. « Histone Deacetylase Inhibitors and the Promise of Epigenetic (and More) Treatments for Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 6 (1): 38-51. <https://doi.org/10.1038/nrc1779>.
- Mita, Paolo, et Jef D. Boeke. 2016. « How Retrotransposons Shape Genome Regulation ». *Current Opinion in Genetics & Development* 37 (avril): 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.01.001>.
- Mitoma, Hiroki, Shino Hanabuchi, Taeil Kim, Musheng Bao, Zhiqiang Zhang, Naoshi Sugimoto, et Yong-Jun Liu. 2013. « The DHX33 RNA Helicase Senses Cytosolic RNA and Activates the NLRP3 Inflammasome ». *Immunity* 39 (1): 123-35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.001>.
- Miyagi, Satoru, Shuhei Koide, Atsunori Saraya, George R. Wendt, Motohiko Oshima, Takaaki Konuma, Satoshi Yamazaki, et al. 2014. « The TIF1 β -HP1 System Maintains Transcriptional Integrity of Hematopoietic Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 2 (2): 145-52. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.12.008>.
- Mochizuki-Kashio, Makiko, Yuta Mishima, Satoru Miyagi, Masamitsu Negishi, Atsunori Saraya, Takaaki Konuma, Jun Shinga, Haruhiko Koseki, et Atsushi Iwama. 2011. « Dependency on the Polycomb Gene Ezh2 Distinguishes Fetal from Adult Hematopoietic Stem Cells ». *Blood* 118 (25): 6553-61. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340554>.
- Moehrle, Bettina M., Kalpana Nattamai, Andreas Brown, Maria C. Florian, Marnie Ryan, Mona Vogel, Corinna Bliederhaeuser, et al. 2015. « Stem cell specific mechanisms ensure genomic fidelity within HSCs and upon aging of HSCs ». *Cell reports* 13 (11): 2412-24. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.030>.
- Mohrin, Mary, Emer Bourke, David Alexander, Matthew R. Warr, Keegan Barry-Holson, Michelle M. Le Beau, Ciaran G. Morrison, et Emmanuelle Passegué. 2010. « Hematopoietic Stem Cell Quiescence Promotes Error-Prone DNA Repair and Mutagenesis ». *Cell Stem Cell* 7 (2): 174-85. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.014>.
- Monaghan, Laura, Matthew E. Massett, Roderick P. Bunschoten, Alex Hoose, Petrisor-Alin Pirvan, Robert M. J. Liskamp, Heather G. Jørgensen, et Xu Huang. 2019. « The Emerging Role of H3K9me3 as a Potential Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia ». *Frontiers in Oncology* 9 (août): 705. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00705>.
- Moran, John. 1999. « Human L1 retrotransposition: Insights and peculiarities learned from a cultured cell retrotransposition assay ». *Genetica* 107 (février): 39-51. <https://doi.org/10.1023/A:1004035023356>.
- Moran-Crusio, Kelly, Linsey Reavie, Alan Shih, Omar Abdel-Wahab, Delphine Ndiaye-Lobry, Camille Lobry, Maria E. Figueroa, et al. 2011. « Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation ». *Cancer Cell* 20 (1): 11-24. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.001>.

- Morrison, S. J., A. M. Wandycz, K. Akashi, A. Globerson, et I. L. Weissman. 1996. « The Aging of Hematopoietic Stem Cells ». *Nature Medicine* 2 (9): 1011-16. <https://doi.org/10.1038/nm0996-1011>.
- Morrison, S. J., et I. L. Weissman. 1994. « The Long-Term Repopulating Subset of Hematopoietic Stem Cells Is Deterministic and Isolatable by Phenotype ». *Immunity* 1 (8): 661-73. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90037-x](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-x).
- Morrison, Sean J., et David T. Scadden. 2014. « The Bone Marrow Niche for Haematopoietic Stem Cells ». *Nature* 505 (7483): 327-34. <https://doi.org/10.1038/nature12984>.
- Mouly, Enguerran, Hussein Ghamlouch, Veronique Della-Valle, Laurianne Scourzic, Cyril Quivoron, Damien Roos-Weil, Patrycja Pawlikowska, et al. 2018. « B-Cell Tumor Development in Tet2-Deficient Mice ». *Blood Advances* 2 (6): 703-14. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017014118>.
- Muñoz-Lopez, Martin, Raquel Vilar-Astasio, Pablo Tristan-Ramos, Cesar Lopez-Ruiz, et Jose L. Garcia-Pérez. 2016. « Study of Transposable Elements and Their Genomic Impact ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1400: 1-19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3372-3_1.
- Myong, Sua, Sheng Cui, Peter V. Cornish, Axel Kirchhofer, Michaela U. Gack, Jae U. Jung, Karl-Peter Hopfner, et Taekjip Ha. 2009. « Cytosolic Viral Sensor RIG-I Is a 5'-Triphosphate-Dependent Translocase on Double-Stranded RNA ». *Science (New York, N.Y.)* 323 (5917): 1070-74. <https://doi.org/10.1126/science.1168352>.
- Neaga, Alexandra, Cristina Bagacean, Adrian Tempescul, Laura Jimbu, Oana Mesaros, Cristina Blag, Ciprian Tomuleasa, Corina Bocsan, Mihaela Gaman, et Mihnea Zdrenghea. 2020. « MicroRNAs Associated With a Good Prognosis of Acute Myeloid Leukemia and Their Effect on Macrophage Polarization ». *Frontiers in Immunology* 11: 582915. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.582915>.
- Nicolini, F. E., J. D. Cashman, D. E. Hogge, R. K. Humphries, et C. J. Eaves. 2004. « NOD/SCID Mice Engineered to Express Human IL-3, GM-CSF and Steel Factor Constitutively Mobilize Engrafted Human Progenitors and Compromise Human Stem Cell Regeneration ». *Leukemia* 18 (2): 341-47. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403222>.
- Niyongere, Sandrine, Nolwenn Lucas, Jun-Min Zhou, Samer Sansil, Anthony D. Pomicter, Maria E. Balasis, John Robinson, et al. 2019. « Heterogeneous Expression of Cytokines Accounts for Clinical Diversity and Refines Prognostication in CMML ». *Leukemia* 33 (1): 205-16. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0203-0>.
- Notta, Faiyaz, Sergei Doulatov, Elisa Laurenti, Armando Poepl, Igor Jurisica, et John E. Dick. 2011. « Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment ». *Science (New York, N.Y.)* 333 (6039): 218-21. <https://doi.org/10.1126/science.1201219>.
- Ohka, Fumiharu, Atsushi Natsume, Kazuya Motomura, Yugo Kishida, Yutaka Kondo, Tatsuya Abe, Yoko Nakasu, et al. 2011. « The Global DNA Methylation Surrogate LINE-1 Methylation Is Correlated with MGMT Promoter Methylation and Is a Better Prognostic Factor for Glioma ». *PLOS ONE* 6 (8): e23332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023332>.
- Ohshima, K., M. Hamada, Y. Terai, et N. Okada. 1996. « The 3' Ends of tRNA-Derived Short Interspersed Repetitive Elements Are Derived from the 3' Ends of Long Interspersed Repetitive Elements ». *Molecular and Cellular Biology* 16 (7): 3756-64. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.7.3756>.
- Ohtake, Shigeki. 2002. « Chronic Myelogenous Leukemia with P190BCR-ABL Expression: The Missing Link with Monocytosis ». *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* 41 (12): 1092-93. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.41.1092>.
- Ohtani, Hitoshi, Minmin Liu, Wanding Zhou, Gangning Liang, et Peter A. Jones. 2018. « Switching Roles for DNA and Histone Methylation Depend on Evolutionary Ages of Human Endogenous Retroviruses ». *Genome Research*, juillet. <https://doi.org/10.1101/gr.234229.118>.

- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber, et E. Li. 1999. « DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for de Novo Methylation and Mammalian Development ». *Cell* 99 (3): 247-57. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81656-6).
- Onomoto, Koji, Kazuhide Onoguchi, et Mitsutoshi Yoneyama. 2021. « Regulation of RIG-I-like Receptor-Mediated Signaling: Interaction between Host and Viral Factors ». *Cellular & Molecular Immunology* 18 (3): 539-55. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00602-7>.
- Ooi, A. G. Lisa, Debashis Sahoo, Maddalena Adorno, Yulei Wang, Irving L. Weissman, et Christopher Y. Park. 2010. « MicroRNA-125b Expands Hematopoietic Stem Cells and Enriches for the Lymphoid-Balanced and Lymphoid-Biased Subsets ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (50): 21505-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016218107>.
- Orgel, L. E., et F. H. C. Crick. 1980. « Selfish DNA: The Ultimate Parasite ». *Nature* 284 (5757): 604-7. <https://doi.org/10.1038/284604a0>.
- Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, et H. Nakauchi. 1996. « Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell ». *Science (New York, N.Y.)* 273 (5272): 242-45. <https://doi.org/10.1126/science.273.5272.242>.
- Ostertag, Eric M., John L. Goodier, Yue Zhang, et Haig H. Kazazian. 2003. « SVA Elements Are Nonautonomous Retrotransposons That Cause Disease in Humans ». *American Journal of Human Genetics* 73 (6): 1444-51. <https://doi.org/10.1086/380207>.
- Pace, John K., et Cédric Feschotte. 2007. « The evolutionary history of human DNA transposons: Evidence for intense activity in the primate lineage ». *Genome Research* 17 (4): 422-32. <https://doi.org/10.1101/gr.5826307>.
- Padron, Eric, Amy E. DeZern, Sandrine Niyongere, Markus Christian Ball, Maria Balasis, Hanadi Ramadan, Jeffrey E. Lancet, et al. 2017. « Promising Results of a Phase 1/2 Clinical Trial of Ruxolitinib in Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Blood* 130 (décembre): 162. https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.162.162.
- Padron, Eric, Jeffrey S. Painter, Sateesh Kunigal, Adam W. Mailloux, Kathy McGraw, Jessica M. McDaniel, Eunhee Kim, et al. 2013. « GM-CSF-Dependent PSTAT5 Sensitivity Is a Feature with Therapeutic Potential in Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Blood* 121 (25): 5068-77. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-460170>.
- Palma, Catalina A., Dima Al Sheikha, Teck Khai Lim, Adam Bryant, Thi Thanh Vu, Vivek Jayaswal, et David D. F. Ma. 2014. « MicroRNA-155 as an Inducer of Apoptosis and Cell Differentiation in Acute Myeloid Leukaemia ». *Molecular Cancer* 13 (avril): 79. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-79>.
- Pan, Feng, Thomas S. Wingo, Zhigang Zhao, Rui Gao, Hideki Makishima, Guangbo Qu, Li Lin, et al. 2017. « Tet2 Loss Leads to Hypermutagenicity in Haematopoietic Stem/Progenitor Cells ». *Nature Communications* 8 (avril): 15102. <https://doi.org/10.1038/ncomms15102>.
- Pang, Wendy W., Elizabeth A. Price, Debashis Sahoo, Isabel Beerman, William J. Maloney, Derrick J. Rossi, Stanley L. Schrier, et Irving L. Weissman. 2011. « Human Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells Are Increased in Frequency and Myeloid-Biased with Age ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (50): 20012-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116110108>.
- Pappalardi, Melissa B., Kathryn Keenan, Mark Cockerill, Wendy A. Kellner, Alexandra Stowell, Christian Sherk, Kristen Wong, et al. 2021. « Discovery of a First-in-Class Reversible DNMT1-Selective Inhibitor with Improved Tolerability and Efficacy in Acute Myeloid Leukemia ». *Nature Cancer* 2 (10): 1002-17.
- 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>.
- Parikh, Chaitali, Ramesh Subrahmanyam, et Ruibao Ren. 2007. « Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS Exhibit Different Leukemogenic Potentials in Mice ». *Cancer research* 67 (15): 7139-46. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0778>.

- Park, Sophie, Myriam Labopin, Ibrahim Yakoub-Agha, Jacques Delaunay, Nathalie Dhedin, Eric Deconinck, Mauricette Michallet, et al. 2013. « Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Myelomonocytic Leukemia: A Report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire ». *European Journal of Haematology* 90 (5): 355-64. <https://doi.org/10.1111/ejh.12073>.
- Patel, Amish J., Sarah Warda, Jesper L. V. Maag, Rohan Misra, Miguel A. Miranda-Román, Mohini R. Pachai, Cindy J. Lee, et al. 2022. « PRC2-Inactivating Mutations in Cancer Enhance Cytotoxic Response to DNMT1-Targeted Therapy via Enhanced Viral Mimicry ». *Cancer Discovery* 12 (9): 2120-39. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1671>.
- Patnaik, M M, M M Timm, R Vallapureddy, T L Lasho, R P Ketterling, N Gangat, M Shi, et al. 2017. « Flow cytometry based monocyte subset analysis accurately distinguishes chronic myelomonocytic leukemia from myeloproliferative neoplasms with associated monocytosis ». *Blood Cancer Journal* 7 (7): e584; <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.66>.
- Patnaik, Mrinal M., Sameer A. Parikh, Curtis A. Hanson, et Ayalew Tefferi. 2014. « Chronic Myelomonocytic Leukaemia: A Concise Clinical and Pathophysiological Review ». *British Journal of Haematology* 165 (3): 273-86. <https://doi.org/10.1111/bjh.12756>.
- Patnaik, Mrinal M., David A. Sallman, Abhishek A. Mangaonkar, Rachel Heuer, Jeffery Hirvela, Darci Zblewski, Aref Al-Kali, et al. 2020. « Phase 1 study of lenzilumab, a recombinant anti-human GM-CSF antibody, for chronic myelomonocytic leukemia ». *Blood* 136 (7): 909-13. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004352>.
- Patnaik, Mrinal M., et Ayalew Tefferi. 2020. « Chronic Myelomonocytic Leukemia: 2020 Update on Diagnosis, Risk Stratification and Management ». *American Journal of Hematology* 95 (1): 97-115. <https://doi.org/10.1002/ajh.25684>.
- Pawlikowska, P., I. Leray, B. de Laval, S. Guihard, R. Kumar, F. Rosselli, et F. Porteu. 2010. « ATM-Dependent Expression of IEX-1 Controls Nuclear Accumulation of Mcl-1 and the DNA Damage Response ». *Cell Death and Differentiation* 17 (11): 1739-50. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.56>.
- Pelinski, Yanis, Donia Hidaoui, Anne Stolz, François Hermetet, Rabie Chelbi, M'boyba Khadija Diop, Amir M. Chioukh, Françoise Porteu, et Emilie Elvira-Matelot. 2022. « NF-KB Signaling Controls H3K9me3 Levels at Intronic LINE-1 and Hematopoietic Stem Cell Genes in Cis ». *The Journal of Experimental Medicine* 219 (8): e20211356. <https://doi.org/10.1084/jem.20211356>.
- Perez-Campo, Flor M., Guilherme Costa, Michael Lie-a-Ling, Stefano Stifani, Valerie Kouskoff, et Georges Lacaud. 2014. « MOZ-Mediated Repression of P16INK4a Is Critical for the Self-Renewal of Neural and Hematopoietic Stem Cells ». *STEM CELLS* 32 (6): 1591-1601. <https://doi.org/10.1002/stem.1606>.
- Pestka, Sidney, Christopher D. Krause, et Mark R. Walter. 2004. « Interferons, Interferon-like Cytokines, and Their Receptors ». *Immunological Reviews* 202 (décembre): 8-32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>.
- Peters, A. H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schöfer, K. Weipoltshammer, et al. 2001. « Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability ». *Cell* 107 (3): 323-37. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00542-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00542-6).
- Pezic, Dubravka, Sergei A. Manakov, Ravi Sachidanandam, et Alexei A. Aravin. 2014. « piRNA pathway targets active LINE1 elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells ». *Genes & Development* 28 (13): 1410-28. <https://doi.org/10.1101/gad.240895.114>.
- Picard, G. 1976. « Non-Mendelian Female Sterility in Drosophila Melanogaster: Hereditary Transmission of I Factor ». *Genetics* 83 (1): 107-23. <https://doi.org/10.1093/genetics/83.1.107>.
- Pickeral, O. K., W. Makalowski, M. S. Boguski, et J. D. Boeke. 2000. « Frequent Human Genomic DNA Transduction Driven by LINE-1 Retrotransposition ». *Genome Research* 10 (4): 411-15. <https://doi.org/10.1101/gr.10.4.411>.

- Piriyapongsa, Jittima, et I. King Jordan. 2007. « A Family of Human MicroRNA Genes from Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements ». *PLOS ONE* 2 (2): e203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000203>.
- Platt, Roy N., Michael W. Vandewege, et David A. Ray. 2018. « Mammalian transposable elements and their impacts on genome evolution ». *Chromosome Research* 26 (1): 25-43. <https://doi.org/10.1007/s10577-017-9570-z>.
- Ploemacher, RE, JP van der Sluijs, JS Voerman, et NH Brons. 1989. « An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse ». *Blood* 74 (8): 2755-63. <https://doi.org/10.1182/blood.V74.8.2755.2755>.
- Pophali, Prateek A., Michael M. Timm, Abhishek A. Mangaonkar, Min Shi, Kaaren Reichard, Ayalew Tefferi, Kevin Pavelko, Jose C. Villasboas, Dragan Jevremovic, et Mrinal M. Patnaik. 2019. « Practical limitations of monocyte subset repartitioning by multiparametric flow cytometry in chronic myelomonocytic leukemia ». *Blood Cancer Journal* 9 (9): 65. <https://doi.org/10.1038/s41408-019-0231-7>.
- Porto, Marcella L., Bianca P. Rodrigues, Thiago N. Menezes, Sara L. Ceschim, Dulce E. Casarini, Agata L. Gava, Thiago Melo C. Pereira, Elisardo C. Vasquez, Bianca P. Campagnaro, et Silvana S. Meyrelles. 2015. « Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice ». *Journal of Biomedical Science* 22 (octobre): 97. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0201-8>.
- Portoso, Manuela, Roberta Ragazzini, Živa Brenčič, Arianna Moiani, Audrey Michaud, Ivaylo Vassilev, Michel Wassef, Nicolas Servant, Bruno Sargueil, et Raphaël Margueron. 2017. « PRC2 Is Dispensable for HOTAIR-Mediated Transcriptional Repression ». *The EMBO Journal* 36 (8): 981-94. <https://doi.org/10.15252/embj.201695335>.
- Pouyanrad, Shahrzad, Soheila Rahgozar, et Elaheh Sadat Ghodousi. 2019. « Dysregulation of MiR-335-3p, Targeted by NEAT1 and MALAT1 Long Non-Coding RNAs, Is Associated with Poor Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia ». *Gene* 692 (avril): 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.01.003>.
- Prakash, Arun, et David E. Levy. 2006. « Regulation of IRF7 Through Cell Type-Specific Protein Stability ». *Biochemical and biophysical research communications* 342 (1): 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.122>.
- Quivoron, Cyril, Lucile Couronné, Véronique Della Valle, Cécile K. Lopez, Isabelle Plo, Oriane Wagner-Ballon, Marcio Do Cruzeiro, et al. 2011. « TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis ». *Cancer Cell* 20 (1): 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.003>.
- Rangan, Prashanth, Colin D. Malone, Caryn Navarro, Sam P. Newbold, Patrick S. Hayes, Ravi Sachidanandam, Gregory J. Hannon, et Ruth Lehmann. 2011. « PiRNA Production Requires Heterochromatin Formation in Drosophila ». *Current Biology: CB* 21 (16): 1373-79. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.057>.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B. D. Strahl, Z. W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, et al. 2000. « Regulation of Chromatin Structure by Site-Specific Histone H3 Methyltransferases ». *Nature* 406 (6796): 593-99. <https://doi.org/10.1038/35020506>.
- Rinke, Jenny, Andrew Chase, Nicholas C. P. Cross, Andreas Hochhaus, et Thomas Ernst. 2020. « EZH2 in Myeloid Malignancies ». *Cells* 9 (7): E1639. <https://doi.org/10.3390/cells9071639>.
- Robbez-Masson, Luisa, Christopher H. C. Tie, Lucia Conde, Hale Tunbak, Connor Husovsky, Iva A. Tchasovnikarova, Richard T. Timms, Javier Herrero, Paul J. Lehner, et Helen M. Rowe. 2018. « The HUSH Complex Cooperates with TRIM28 to Repress Young Retrotransposons and New Genes ». *Genome Research*, mai. <https://doi.org/10.1101/gr.228171.117>.
- Roberts, Thomas C. 2014. « The MicroRNA Biology of the Mammalian Nucleus ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 3 (janvier): e188. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.40>.

- Rodić, Nemanja, et Kathleen H. Burns. 2013. « Long Interspersed Element-1 (LINE-1): Passenger or Driver in Human Neoplasms? » *PLoS Genetics* 9 (3): e1003402. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003402>.
- Rodić, Nemanja, Reema Sharma, Rajni Sharma, John Zampella, Lixin Dai, Martin S. Taylor, Ralph H. Hruban, et al. 2014. « Long Interspersed Element-1 Protein Expression Is a Hallmark of Many Human Cancers ». *The American Journal of Pathology* 184 (5): 1280-86. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.007>.
- Rodriguez-Martin, Bernardo, Eva G. Alvarez, Adrian Baez-Ortega, Jorge Zamora, Fran Supek, Jonas Demeulemeester, Martin Santamarina, et al. 2020. « Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Identifies Driver Rearrangements Promoted by LINE-1 Retrotransposition ». *Nature Genetics* 52 (3): 306-19. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0562-0>.
- Rongvaux, Anthony, Tim Willinger, Jan Martinek, Till Strowig, Sofia V. Gearty, Lino L. Teichmann, Yasuyuki Saito, et al. 2014. « Development and Function of Human Innate Immune Cells in a Humanized Mouse Model ». *Nature Biotechnology* 32 (4): 364-72. <https://doi.org/10.1038/nbt.2858>.
- Rossi, Derrick J., David Bryder, Jun Seita, Andre Nussenzweig, Jan Hoeijmakers, et Irving L. Weissman. 2007. « Deficiencies in DNA Damage Repair Limit the Function of Haematopoietic Stem Cells with Age ». *Nature* 447 (7145): 725-29. <https://doi.org/10.1038/nature05862>.
- Rossi, Derrick J., David Bryder, Jacob M. Zahn, Henrik Ahlenius, Rebecca Sonu, Amy J. Wagers, et Irving L. Weissman. 2005. « Cell Intrinsic Alterations Underlie Hematopoietic Stem Cell Aging ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (26): 9194-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503280102>.
- Roulois, David, Helen Loo Yau, Rajat Singhania, Yadong Wang, Arnavaz Danesh, Shu Yi Shen, Han Han, et al. 2015. « DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts ». *Cell* 162 (5): 961-73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.056>.
- Rowe, Helen M., et Didier Trono. 2011. « Dynamic Control of Endogenous Retroviruses during Development ». *Virology* 411 (2): 273-87. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.007>.
- Rübe, Claudia E., Andreas Fricke, Thomas A. Widmann, Tobias Fürst, Henning Madry, Michael Pfreundschuh, et Christian Rübe. 2011. « Accumulation of DNA Damage in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells during Human Aging ». *PLOS ONE* 6 (3): e17487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017487>.
- Rubin, G. M., M. G. Kidwell, et P. M. Bingham. 1982. « The Molecular Basis of P-M Hybrid Dysgenesis: The Nature of Induced Mutations ». *Cell* 29 (3): 987-94. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90462-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90462-7).
- Rundberg Nilsson, Alexandra, Shamit Soneji, Sofia Adolfsson, David Bryder, et Cornelis Jan Pronk. 2016. « Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias ». *PloS One* 11 (7): e0158369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158369>.
- Sadeq, Shaymaa, Surar Al-Hashimi, Carmen M. Cusack, et Andreas Werner. 2021. « Endogenous Double-Stranded RNA ». *Non-Coding RNA* 7 (1): 15. <https://doi.org/10.3390/ncrna7010015>.
- Saint-André, Violaine, Eric Batsché, Christophe Rachez, et Christian Muchardt. 2011. « Histone H3 Lysine 9 Trimethylation and HP1 γ Favor Inclusion of Alternative Exons ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (3): 337-44. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1995>.
- Salvador-Palomeque, Carmen, Francisco J. Sanchez-Luque, Patrick R. J. Fortuna, Adam D. Ewing, Ernst J. Wolvetang, Sandra R. Richardson, et Geoffrey J. Faulkner. 2019. « Dynamic Methylation of an L1 Transduction Family during Reprogramming and Neurodifferentiation ». *Molecular and Cellular Biology* 39 (7): e00499-18. <https://doi.org/10.1128/MCB.00499-18>.
- San José-Enériz, Ederne, Xabier Agirre, Obdulia Rabal, Amaia Vilas-Zornoza, Juan A. Sanchez-Arias, Estibaliz Miranda, Ana Ugarte, et al. 2017. « Discovery of First-in-Class Reversible Dual Small

- Molecule Inhibitors against G9a and DNMTs in Hematological Malignancies ». *Nature Communications* 8 (1): 15424. <https://doi.org/10.1038/ncomms15424>.
- Sanchez-Correa, Beatriz, Juan M. Bergua, Carmen Campos, Inmaculada Gayoso, Maria Jose Arcos, Helena Bañas, Sara Morgado, Javier G. Casado, Rafael Solana, et Raquel Tarazona. 2013. « Cytokine Profiles in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis: Survival Is Inversely Correlated with IL-6 and Directly Correlated with IL-10 Levels ». *Cytokine* 61 (3): 885-91. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.12.023>.
- Sanjuan-Pla, Alejandra, Iain C. Macaulay, Christina T. Jensen, Petter S. Woll, Tiago C. Luis, Adam Mead, Susan Moore, et al. 2013. « Platelet-Biased Stem Cells Reside at the Apex of the Haematopoietic Stem-Cell Hierarchy ». *Nature* 502 (7470): 232-36. <https://doi.org/10.1038/nature12495>.
- Satoh, Takashi, Hiroki Kato, Yutaro Kumagai, Mitsutoshi Yoneyama, Shintaro Sato, Kazufumi Matsushita, Tohru Tsujimura, Takashi Fujita, Shizuo Akira, et Osamu Takeuchi. 2010. « LGP2 Is a Positive Regulator of RIG-I- and MDA5-Mediated Antiviral Responses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (4): 1512-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912986107>.
- Scaffidi, Paola, et Tom Misteli. 2006. « Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5776): 1059-63. <https://doi.org/10.1126/science.1127168>.
- Scheller, Marina, Anne Kathrin Ludwig, Stefanie Göllner, Christian Rohde, Stephen Krämer, Sina Stäble, Maike Janssen, et al. 2021. « Hotspot DNMT3A Mutations in Clonal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia Sensitize Cells to Azacytidine via Viral Mimicry Response ». *Nature Cancer* 2 (5): 527-44. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00213-9>.
- Schneider, William M., Meike Dittmann Chevillotte, et Charles M. Rice. 2014. « Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses ». *Annual Review of Immunology* 32: 513-45. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>.
- Schones, Dustin E., Xiaoji Chen, Candi Trac, Ryan Setten, et Patrick J. Paddison. 2014. « G9a/GLP-Dependent H3K9me2 Patterning Alters Chromatin Structure at CpG Islands in Hematopoietic Progenitors ». *Epigenetics & Chromatin* 7: 23. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-23>.
- Schroeder, Timm. 2010. « Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity: Subtypes, Not Unpredictable Behavior ». *Cell Stem Cell* 6 (3): 203-7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.006>.
- Schultz, David C., Kasirajan Ayyanathan, Dmitri Negorev, Gerd G. Maul, et Frank J. Rauscher. 2002. « SETDB1: A Novel KAP-1-Associated Histone H3, Lysine 9-Specific Methyltransferase That Contributes to HP1-Mediated Silencing of Euchromatic Genes by KRAB Zinc-Finger Proteins ». *Genes & Development* 16 (8): 919-32. <https://doi.org/10.1101/gad.973302>.
- Schulze, Isabell, Christian Rohde, Marina Scheller-Wendorff, Nicole Bäumer, Annika Krause, Friederike Herbst, Pia Riemke, et al. 2016. « Increased DNA methylation of Dnmt3b targets impairs leukemogenesis ». *Blood* 127 (12): 1575-86. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-655928>.
- Schwarz, Benjamin A., et Avinash Bhandoola. 2006. « Trafficking from the Bone Marrow to the Thymus: A Prerequisite for Thymopoiesis ». *Immunological Reviews* 209 (1): 47-57. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00350.x>.
- Sciamanna, Ilaria, Chiara De Luca, et Corrado Spadafora. 2016. « The Reverse Transcriptase Encoded by LINE-1 Retrotransposons in the Genesis, Progression, and Therapy of Cancer ». *Frontiers in Chemistry* 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2016.00006>.
- Sciamanna, Ilaria, Alberto Gualtieri, Pier Francesco Piazza, et Corrado Spadafora. 2014. « Regulatory Roles of LINE-1-Encoded Reverse Transcriptase in Cancer Onset and Progression ». *Oncotarget* 5 (18): 8039-51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2504>.
- Segal, Y, B Peissel, A Renieri, M de Marchi, A Ballabio, Y Pei, et J Zhou. 1999. « LINE-1 elements at the sites of molecular rearrangements in Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis. ». *American Journal of Human Genetics* 64 (1): 62-69.

- Segovia, Cristina, Edurne San José-Enériz, Ester Munera-Maravilla, Mónica Martínez-Fernández, Leire Garate, Estíbaliz Miranda, Amaia Vilas-Zornoza, et al. 2019. « Inhibition of a G9a/DNMT Network Triggers Immune-Mediated Bladder Cancer Regression ». *Nature Medicine* 25 (7): 1073-81. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0499-y>.
- Seita, Jun, et Irving L. Weissman. 2010. « Hematopoietic Stem Cell: Self-Renewal versus Differentiation ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 2 (6): 640-53. <https://doi.org/10.1002/wsbm.86>.
- Selimoglu-Buet, Dorothée, Julie Rivière, Hussein Ghamlouch, Laura Bencheikh, Catherine Lacout, Margot Morabito, M'boyba Diop, et al. 2018. « A miR-150/TET3 pathway regulates the generation of mouse and human non-classical monocyte subset ». *Nature Communications* 9 (décembre): 5455. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07801-x>.
- Selimoglu-Buet, Dorothée, Oriane Wagner-Ballon, Véronique Saada, Valérie Bardet, Raphaël Itzykson, Laura Bencheikh, Margot Morabito, et al. 2015. « Characteristic Repartition of Monocyte Subsets as a Diagnostic Signature of Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Blood* 125 (23): 3618-26. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-620781>.
- Seth, Rashu B., Lijun Sun, Chee-Kwee Ea, et Zhijian J. Chen. 2005. « Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein That Activates NF-KappaB and IRF 3 ». *Cell* 122 (5): 669-82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.012>.
- Shah, Parisha P., Greg Donahue, Gabriel L. Otte, Brian C. Capell, David M. Nelson, Kajia Cao, Varun Aggarwala, et al. 2013. « Lamin B1 Depletion in Senescent Cells Triggers Large-Scale Changes in Gene Expression and the Chromatin Landscape ». *Genes & Development* 27 (16): 1787-99. <https://doi.org/10.1101/gad.223834.113>.
- Sharan, C., N. M. Hamilton, A. K. Parl, P. K. Singh, et G. Chaudhuri. 1999. « Identification and Characterization of a Transcriptional Silencer Upstream of the Human BRCA2 Gene ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265 (2): 285-90. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1652>.
- Sharma, Shilpa, et Gangenahalli Gurudutta. 2016. « Epigenetic Regulation of Hematopoietic Stem Cells ». *International Journal of Stem Cells* 9 (1): 36-43. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2016.9.1.36>.
- Shin, Joseph Y., Wenhua Hu, Mayumi Naramura, et Christopher Y. Park. 2014. « High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias ». *Journal of Experimental Medicine* 211 (2): 217-31. <https://doi.org/10.1084/jem.20131128>.
- Shukla, Ruchi, Kyle R. Upton, Martin Muñoz-Lopez, Daniel J. Gerhardt, Malcolm E. Fisher, Thu Nguyen, Paul M. Brennan, et al. 2013. « Endogenous Retrotransposition Activates Oncogenic Pathways in Hepatocellular Carcinoma ». *Cell* 153 (1): 101-11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.032>.
- Silverman, Robert H. 2007. « Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response ». *Journal of Virology* 81 (23): 12720-29. <https://doi.org/10.1128/JVI.01471-07>.
- Simon, Matthew, Michael Van Meter, Julia Ablaeva, Zhonghe Ke, Raul S. Gonzalez, Taketo Taguchi, Marco De Cecco, et al. 2019. « LINE1 derepression in aged wild type and SIRT6 deficient mice drives inflammation ». *Cell metabolism* 29 (4): 871-885.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.014>.
- Sims, Robert J., Patrick Trojer, Guohong Li, et Danny Reinberg. 2006. « Methods to identify and functionally analyze factors that specifically recognize histone lysine methylation ». *Methods (San Diego, Calif.)* 40 (4): 331-38. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.031>.
- Singer, Silke S., Daniela N. Männel, Thomas Hehlhans, Jürgen Brosius, et Jürgen Schmitz. 2004. « From "Junk" to Gene: Curriculum Vitae of a Primate Receptor Isoform Gene ». *Journal of Molecular Biology* 341 (4): 883-86. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.070>.
- Sitnicka, Ewa, Cord Brakebusch, Inga-Lill Martensson, Marcus Svensson, William W. Agace, Mikael Sigvardsson, Natalija Buza-Vidas, et al. 2003. « Complementary Signaling through Flt3 and

- Interleukin-7 Receptor Alpha Is Indispensable for Fetal and Adult B Cell Genesis ». *The Journal of Experimental Medicine* 198 (10): 1495-1506.
<https://doi.org/10.1084/jem.20031152>.
- Slotkin, R. Keith, et Robert Martienssen. 2007. « Transposable Elements and the Epigenetic Regulation of the Genome ». *Nature Reviews. Genetics* 8 (4): 272-85.
<https://doi.org/10.1038/nrg2072>.
- Smith, Christof C., Sara R. Selitsky, Shengjie Chai, Paul M. Armistead, Benjamin G. Vincent, et Jonathan S. Serody. 2019. « Alternative Tumour-Specific Antigens ». *Nature Reviews. Cancer* 19 (8): 465-78. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0162-4>.
- Smith, T. M., M. K. Lee, C. I. Szabo, N. Jerome, M. McEuen, M. Taylor, L. Hood, et M. C. King. 1996. « Complete Genomic Sequence and Analysis of 117 Kb of Human DNA Containing the Gene BRCA1 ». *Genome Research* 6 (11): 1029-49. <https://doi.org/10.1101/gr.6.11.1029>.
- Solary, Eric, Orianne Wagner-Ballon, et Dorothée Selimoglu-Buet. 2020. « Incorporating Flow Cytometry and Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of CMML. Are We Ready for Prime? » *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 33 (2): 101134.
<https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.101134>.
- Srour, Nivine, Oscar D. Villarreal, Swanand Hardikar, Zhenbao Yu, Samuel Preston, Wilson H. Miller, Magdalena M. Szewczyk, et al. 2022. « PRMT7 Ablation Stimulates Anti-Tumor Immunity and Sensitizes Melanoma to Immune Checkpoint Blockade ». *Cell Reports* 38 (13): 110582.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110582>.
- Stancheva, Irina, et Eric C. Schirmer. 2014. « Nuclear Envelope: Connecting Structural Genome Organization to Regulation of Gene Expression ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 773: 209-44. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8_10.
- Statello, Luisa, Chun-Jie Guo, Ling-Ling Chen, et Maite Huarte. 2021. « Gene Regulation by Long Non-Coding RNAs and Its Biological Functions ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22 (2): 96-118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>.
- Stephens, Matthew. 2017. « False discovery rates: a new deal ». *Biostatistics* 18 (2): 275-94.
<https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxw041>.
- Stetson, Daniel B., Joan S. Ko, Thierry Heidmann, et Ruslan Medzhitov. 2008. « Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity ». *Cell* 134 (4): 587-98.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.032>.
- Stresemann, Carlo, et Frank Lyko. 2008. « Modes of Action of the DNA Methyltransferase Inhibitors Azacytidine and Decitabine ». *International Journal of Cancer* 123 (1): 8-13.
<https://doi.org/10.1002/ijc.23607>.
- Su, I.-Hsin, Ashwin Basavaraj, Andrew N. Krutchinsky, Oliver Hobert, Axel Ullrich, Brian T. Chait, et Alexander Tarakhovsky. 2003. « Ezh2 Controls B Cell Development through Histone H3 Methylation and Igh Rearrangement ». *Nature Immunology* 4 (2): 124-31.
<https://doi.org/10.1038/ni876>.
- Su, I.-hsin, Marc-Werner Dobenecker, Ephraim Dickinson, Matthew Oser, Ashwin Basavaraj, Raphael Marqueron, Agnes Viale, Danny Reinberg, Christoph Wülfing, et Alexander Tarakhovsky. 2005. « Polycomb Group Protein Ezh2 Controls Actin Polymerization and Cell Signaling ». *Cell* 121 (3): 425-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.029>.
- Su, Rui, Lei Dong, Yangchan Li, Min Gao, Li Han, Mark Wunderlich, Xiaolan Deng, et al. 2020. « Targeting FTO suppresses cancer stem cell maintenance and immune evasion ». *Cancer cell* 38 (1): 79-96.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.04.017>.
- Such, Esperanza, José Cervera, Dolores Costa, Francesc Solé, Teresa Vallespí, Elisa Luño, Rosa Collado, et al. 2011. « Cytogenetic Risk Stratification in Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Haematologica* 96 (3): 375-83. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.030957>.
- Suetake, Isao, Fuminori Shinozaki, Junichi Miyagawa, Hideyuki Takeshima, et Shoji Tajima. 2004. « DNMT3L Stimulates the DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a Direct

- Interaction ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 27816-23.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M400181200>.
- Sun, Deqiang, Min Luo, Mira Jeong, Benjamin Rodriguez, Zheng Xia, Rebecca Hannah, Hui Wang, et al. 2014. « Epigenomic Profiling of Young and Aged HSCs Reveals Concerted Changes during Aging That Reinforce Self-Renewal ». *Cell Stem Cell* 14 (5): 673-88.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.03.002>.
- Sun, Hong, Yu Huang, Shan Mei, Fengwen Xu, Xiaoman Liu, Fei Zhao, Lijuan Yin, et al. 2021. « A Nuclear Export Signal Is Required for CGAS to Sense Cytosolic DNA ». *Cell Reports* 34 (1): 108586. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108586>.
- Sun, Lijun, Jiayi Wu, Fenghe Du, Xiang Chen, et Zhijian J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 786-91. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>.
- Sun, Xiaoji, Xuya Wang, Zuoqian Tang, Mark Grivainis, David Kahler, Chi Yun, Paolo Mita, David Fenyö, et Jef D. Boeke. 2018. « Transcription Factor Profiling Reveals Molecular Choreography and Key Regulators of Human Retrotransposon Expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (24): E5526-35.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1722565115>.
- Sunami, Eiji, Michiel de Maat, Anna Vu, Roderick R. Turner, et Dave S. B. Hoon. 2011. « LINE-1 Hypomethylation During Primary Colon Cancer Progression ». *PLOS ONE* 6 (4): e18884.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018884>.
- Sundaram, Vasavi, et Ting Wang. 2018. « Transposable element mediated innovation in gene regulatory landscapes of cells: Re-visiting the 'gene-battery' model ». *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 40 (1): 10.1002/bies.201700155.
<https://doi.org/10.1002/bies.201700155>.
- Sutherland, Heather J., Connie J. Eaves, Allen C. Eaves, Wieslawa Dragowska, et Peter M. Lansdorp. 1989. « Characterization and Partial Purification of Human Marrow Cells Capable of Initiating Long-Term Hematopoiesis In Vitro ». *Blood* 74 (5): 1563-70.
<https://doi.org/10.1182/blood.V74.5.1563.1563>.
- Svoboda, Petr. 2020. « Key Mechanistic Principles and Considerations Concerning RNA Interference ». *Frontiers in Plant Science* 11.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.01237>.
- Symeonidis, Argiris, Anja van Biezen, Liesbeth de Wreede, Alfonso Piciocchi, Juergen Finke, Dietrich Beelen, Martin Bornhäuser, et al. 2015. « Achievement of Complete Remission Predicts Outcome of Allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Chronic Myelomonocytic Leukaemia. A Study of the Chronic Malignancies Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation ». *British Journal of Haematology* 171 (2): 239-46. <https://doi.org/10.1111/bjh.13576>.
- Tachibana, Makoto, Kenji Sugimoto, Masami Nozaki, Jun Ueda, Tsutomu Ohta, Misao Ohki, Mikiko Fukuda, et al. 2002. « G9a Histone Methyltransferase Plays a Dominant Role in Euchromatic Histone H3 Lysine 9 Methylation and Is Essential for Early Embryogenesis ». *Genes & Development* 16 (14): 1779-91. <https://doi.org/10.1101/gad.989402>.
- Tachibana, Makoto, Jun Ueda, Mikiko Fukuda, Naoki Takeda, Tsutomu Ohta, Hiroko Iwanari, Toshiko Sakihama, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, et Yoichi Shinkai. 2005. « Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9 ». *Genes & Development* 19 (7): 815-26.
<https://doi.org/10.1101/gad.1284005>.
- Tadokoro, Yuko, Hideo Ema, Masaki Okano, En Li, et Hiromitsu Nakauchi. 2007. « De Novo DNA Methyltransferase Is Essential for Self-Renewal, but Not for Differentiation, in Hematopoietic Stem Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (4): 715-22.
<https://doi.org/10.1084/jem.20060750>.

- Takano, Hina, Hideo Ema, Kazuhiro Sudo, et Hiromitsu Nakauchi. 2004. « Asymmetric Division and Lineage Commitment at the Level of Hematopoietic Stem Cells: Inference from Differentiation in Daughter Cell and Granddaughter Cell Pairs ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (3): 295-302. <https://doi.org/10.1084/jem.20030929>.
- Takikita, Shoichi, Ryunosuke Muro, Toshiyuki Takai, Takeshi Otsubo, Yuki I. Kawamura, Taeko Dohi, Hiroyo Oda, et al. 2016. « A Histone Methyltransferase ESET Is Critical for T Cell Development ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 197 (6): 2269-79. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502486>.
- Talati, Chetasi, Ling Zhang, Ghada Shaheen, Andrew Kuykendall, Markus Ball, Qing Zhang, Jeffrey E. Lancet, et al. 2017. « Monocyte Subset Analysis Accurately Distinguishes CMML from MDS and Is Associated with a Favorable MDS Prognosis ». *Blood* 129 (13): 1881-83. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-753210>.
- Tan, Siok-Lay, Miyuki Nishi, Toshiyuki Ohtsuka, Toshiyuki Matsui, Keiko Takemoto, Asuka Kamio-Miura, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Shinkai, et Ryoichiro Kageyama. 2012. « Essential Roles of the Histone Methyltransferase ESET in the Epigenetic Control of Neural Progenitor Cells during Development ». *Development (Cambridge, England)* 139 (20): 3806-16. <https://doi.org/10.1242/dev.082198>.
- Taoka, Kazuki, Shunya Arai, Keisuke Kataoka, Masataka Hosoi, Masashi Miyauchi, Sho Yamazaki, Akira Honda, et al. 2018. « Using Patient-Derived iPSCs to Develop Humanized Mouse Models for Chronic Myelomonocytic Leukemia and Therapeutic Drug Identification, Including Liposomal Clodronate ». *Scientific Reports* 8 (1): 15855. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34193-1>.
- Tarallo, Valeria, Yoshio Hirano, Bradley D. Gelfand, Sami Dridi, Nagaraj Kerur, Younghee Kim, Won Gil Cho, et al. 2012. « DICER1 Loss and Alu RNA Induce Age-Related Macular Degeneration via the NLRP3 Inflammasome and MyD88 ». *Cell* 149 (4): 847-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.036>.
- Tchasovnikarova, Iva A., Richard T. Timms, Nicholas J. Matheson, Kim Wals, Robin Antrobus, Berthold Göttgens, Gordon Dougan, Mark A. Dawson, et Paul J. Lehner. 2015. « GENE SILENCING. Epigenetic Silencing by the HUSH Complex Mediates Position-Effect Variegation in Human Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 348 (6242): 1481-85. <https://doi.org/10.1126/science.aaa7227>.
- Temin, H. M. 1993. « Retrovirus Variation and Reverse Transcription: Abnormal Strand Transfers Result in Retrovirus Genetic Variation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (15): 6900-6903. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.15.6900>.
- Thomas, Graham D, Anouk AJ Hamers, Catherine Nakao, Paola Marcovecchio, Angela M. Taylor, Chantel McSkimming, Anh Tram Nguyen, Coleen A. McNamara, et Catherine C Hedrick. 2017. « Human blood monocyte subsets: a new gating strategy defined using cell surface markers identified by mass cytometry ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37 (8): 1548-58. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309145>.
- Thomas, Graham, Robert Tacke, Catherine C. Hedrick, et Richard N. Hanna. 2015. « Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35 (6): 1306-16. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304650>.
- Thomas, James H., et Sean Schneider. 2011. « Coevolution of retroelements and tandem zinc finger genes ». *Genome Research* 21 (11): 1800-1812. <https://doi.org/10.1101/gr.121749.111>.
- Thomas, Tim, Lynn M. Corcoran, Raffi Gugasyan, Mathew P. Dixon, Thomas Brodnicki, Stephen L. Nutt, Donald Metcalf, et Anne K. Voss. 2006. « Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long-term reconstituting hematopoietic stem cells ». *Genes & Development* 20 (9): 1175-86. <https://doi.org/10.1101/gad.1382606>.
- Till, J. E., et E. A. McCulloch. 1961. « A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells ». *Radiation Research* 14 (2): 213-22. <https://doi.org/10.2307/3570892>.

- Ting, David T., Doron Lipson, Suchismita Paul, Brian W. Brannigan, Sara Akhavanfard, Erik J. Coffman, Gianmarco Contino, et al. 2011. « Aberrant Overexpression of Satellite Repeats in Pancreatic and Other Epithelial Cancers ». *Science (New York, N.Y.)* 331 (6017): 593-96. <https://doi.org/10.1126/science.1200801>.
- Trizzino, Marco, Aurélie Kapusta, et Christopher D. Brown. 2018. « Transposable Elements Generate Regulatory Novelty in a Tissue-Specific Fashion ». *BMC Genomics* 19 (1): 468. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4850-3>.
- Trujillo, Miguel A., Michiko Sakagashira, et Norman L. Eberhardt. 2006. « The Human Growth Hormone Gene Contains a Silencer Embedded within an Alu Repeat in the 3'-Flanking Region ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20 (10): 2559-75. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0147>.
- Tsai, Hsing-Chen, Huili Li, Leander Van Neste, Yi Cai, Carine Robert, Feyruz V. Rassool, James J. Shin, et al. 2012. « Transient Low Doses of DNA-Demethylating Agents Exert Durable Antitumor Effects on Hematological and Epithelial Tumor Cells ». *Cancer Cell* 21 (3): 430-46. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.029>.
- Turelli, Priscilla, Nathaly Castro-Diaz, Flavia Marzetta, Adamandia Kapopoulou, Charlène Raclot, Julien Duc, Vannary Tieng, Simon Quenneville, et Didier Trono. 2014. « Interplay of TRIM28 and DNA Methylation in Controlling Human Endogenous Retroelements ». *Genome Research* 24 (8): 1260-70. <https://doi.org/10.1101/gr.172833.114>.
- Tutar, Yusuf. 2012. « Pseudogenes ». *Comparative and Functional Genomics* 2012: 424526. <https://doi.org/10.1155/2012/424526>.
- Ugarte, Fernando, Rebekah Sousae, Bertrand Cinquin, Eric W. Martin, Jana Krietsch, Gabriela Sanchez, Margaux Inman, et al. 2015. « Progressive Chromatin Condensation and H3K9 Methylation Regulate the Differentiation of Embryonic and Hematopoietic Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 5 (5): 728-40. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.09.009>.
- Unnikrishnan, Ashwin, Elli Papaemmanuil, Dominik Beck, Nandan P. Deshpande, Arjun Verma, Ashu Kumari, Petter S. Woll, et al. 2017. « Integrative Genomics Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacitidine Therapy in Myelodysplastic Syndromes ». *Cell Reports* 20 (3): 572-85. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.067>.
- Urbán, Noelia, et Tom H. Cheung. 2021. « Stem cell quiescence: the challenging path to activation ». *Development (Cambridge, England)* 148 (3): dev165084. <https://doi.org/10.1242/dev.165084>.
- Vainchenker, William, François Delhommeau, Stefan N. Constantinescu, et Olivier A. Bernard. 2011. « New Mutations and Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms ». *Blood* 118 (7): 1723-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-292102>.
- Vakoc, Christopher R., Sean A. Mandat, Benjamin A. Olenchock, et Gerd A. Blobel. 2005. « Histone H3 Lysine 9 Methylation and HP1 γ Are Associated with Transcription Elongation through Mammalian Chromatin ». *Molecular Cell* 19 (3): 381-91. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.011>.
- Valencia-Sanchez, Marco Antonio, Jidong Liu, Gregory J. Hannon, et Roy Parker. 2006. « Control of Translation and mRNA Degradation by MiRNAs and SiRNAs ». *Genes & Development* 20 (5): 515-24. <https://doi.org/10.1101/gad.1399806>.
- Van Meter, Michael, Mehr Kashyap, Sarallah Rezazadeh, Anthony J. Geneva, Timothy D. Morello, Andrei Seluanov, et Vera Gorbunova. 2014. « SIRT6 Represses LINE1 Retrotransposons by Ribosylating KAP1 but This Repression Fails with Stress and Age ». *Nature Communications* 5 (septembre): 5011. <https://doi.org/10.1038/ncomms6011>.
- Vanin, E. F. 1985. « Processed Pseudogenes: Characteristics and Evolution ». *Annual Review of Genetics* 19: 253-72. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.19.120185.001345>.
- Vasilatou, Diamantina, Sotirios Papageorgiou, Vassiliki Pappa, Efstathios Papageorgiou, et John Dervenoulas. 2010. « The Role of MicroRNAs in Normal and Malignant Hematopoiesis ».

- European Journal of Haematology* 84 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01348.x>.
- Vedadi, Masoud, Dalia Barsyte-Lovejoy, Feng Liu, Sylvie Rival-Gervier, Abdellah Allali-Hassani, Viviane Labrie, Tim J. Wigle, et al. 2011. « A Chemical Probe Selectively Inhibits G9a and GLP Methyltransferase Activity in Cells ». *Nature Chemical Biology* 7 (8): 566-74. <https://doi.org/10.1038/nchembio.599>.
- Vedi, Aditi, Antonella Santoro, Cyrille F. Dunant, John E. Dick, et Elisa Laurenti. 2016. « Molecular Landscapes of Human Hematopoietic Stem Cells in Health and Leukemia ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1370 (1): 5-14. <https://doi.org/10.1111/nyas.12981>.
- Veer, M. J. de, M. Holko, M. Frevel, E. Walker, S. Der, J. M. Paranjape, R. H. Silverman, et B. R. Williams. 2001. « Functional Classification of Interferon-Stimulated Genes Identified Using Microarrays ». *Journal of Leukocyte Biology* 69 (6): 912-20.
- Velten, Lars, Simon F. Haas, Simon Raffel, Sandra Blaszkiewicz, Saiful Islam, Bianca P. Hennig, Christoph Hirche, et al. 2017. « Human Haematopoietic Stem Cell Lineage Commitment Is a Continuous Process ». *Nature Cell Biology* 19 (4): 271-81. <https://doi.org/10.1038/ncb3493>.
- Venkatraman, Aparna, Xi C. He, Joanne L. Thorvaldsen, Ryohichi Sugimura, John M. Perry, Fang Tao, Meng Zhao, et al. 2013. « Maternal Imprinting at the H19-Igf2 Locus Maintains Adult Haematopoietic Stem Cell Quiescence ». *Nature* 500 (7462): 345-49. <https://doi.org/10.1038/nature12303>.
- Vignard, Julien, Gladys Mirey, et Bernard Salles. 2013. « Ionizing-Radiation Induced DNA Double-Strand Breaks: A Direct and Indirect Lighting Up ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 108 (3): 362-69. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.06.013>.
- Vilcek, Jan. 2006. « Fifty Years of Interferon Research: Aiming at a Moving Target ». *Immunity* 25 (3): 343-48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.008>.
- Viollet, Sébastien, Clément Monot, et Gaël Cristofari. 2014. « L1 Retrotransposition: The Snap-Velcro Model and Its Consequences ». *Mobile Genetic Elements* 4 (1): e28907. <https://doi.org/10.4161/mge.28907>.
- Vojvoda Zeljko, Tanja, Đurđica Ugarković, et Željka Pezer. 2021. « Differential enrichment of H3K9me3 at annotated satellite DNA repeats in human cell lines and during fetal development in mouse ». *Epigenetics & Chromatin* 14 (1): 47. <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00423-6>.
- Volkman, Hannah E., et Daniel B. Stetson. 2014. « The Enemy within: Endogenous Retroelements and Autoimmune Disease ». *Nature Immunology* 15 (5): 415-22. <https://doi.org/10.1038/ni.2872>.
- Wada, Taeko, Jiro Kikuchi, Noriko Nishimura, Rumi Shimizu, Toshio Kitamura, et Yusuke Furukawa. 2009. « Expression Levels of Histone Deacetylases Determine the Cell Fate of Hematopoietic Progenitors ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (44): 30673-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042242>.
- Wahlestedt, Martin, Vasileios Ladopoulos, Isabel Hidalgo, Manuel Sanchez Castillo, Rebecca Hannah, Petter Säwén, Haixia Wan, et al. 2017. « Critical Modulation of Hematopoietic Lineage Fate by Hepatic Leukemia Factor ». *Cell Reports* 21 (8): 2251-63. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.112>.
- Walter, Marius, Aurélie Teissandier, Raquel Pérez-Palacios, et Déborah Bourc'h. 2016a. « An Epigenetic Switch Ensures Transposon Repression upon Dynamic Loss of DNA Methylation in Embryonic Stem Cells ». *ELife* 5 (janvier): e11418. <https://doi.org/10.7554/eLife.11418>.
- Walter, Mark R. 2020. « The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling ». *Frontiers in Immunology* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.606489>.
- Wang, Hui, Jinchuan Xing, Deepak Grover, Dale J. Hedges, Kyudong Han, Jerilyn A. Walker, et Mark A. Batzer. 2005. « SVA Elements: A Hominid-Specific Retroposon Family ». *Journal of Molecular Biology* 354 (4): 994-1007. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.085>.

- Wang, Kun, Haiwei Li, Yue Xu, Qianzhi Shao, Jianming Yi, Ruichao Wang, Wanshi Cai, et al. 2019. « MFEprimer-3.0: Quality Control for PCR Primers ». *Nucleic Acids Research* 47 (W1): W610-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz351>.
- Wang, Pan, Zi Wang, et Jing Liu. 2020. « Role of HDACs in normal and malignant hematopoiesis ». *Molecular Cancer* 19 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1127-7>.
- Wang, Peng, Wei Zhao, Kai Zhao, Lei Zhang, et Chengjiang Gao. 2015. « TRIM26 Negatively Regulates Interferon- β Production and Antiviral Response through Polyubiquitination and Degradation of Nuclear IRF3 ». *PLOS Pathogens* 11 (3): e1004726. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004726>.
- Wang, Ying, Jin-ping Zheng, Ying Luo, Junyi Wang, Lingjie Xu, Jinyong Wang, John M. Sedivy, Zhangfa Song, Hu Wang, et Zhenyu Ju. 2020. « L1 Drives HSC Aging and Affects Prognosis of Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 205. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00279-4>.
- Wang, Yong, Bradley A. Schulte, Amanda C. LaRue, Makio Ogawa, et Daohong Zhou. 2006. « Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence ». *Blood* 107 (1): 358-66. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1418>.
- Warren, Luigi A., et Derrick J. Rossi. 2009. « Stem Cells and Aging in the Hematopoietic System ». *Mechanisms of Ageing and Development, From Cellular Senescence and Cell Death to Cancer and Ageing*, 130 (1): 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.03.010>.
- Wassie, Emnet A., Raphael Itzykson, Terra L. Lasho, Olivier Kosmider, Christy M. Finke, Curtis A. Hanson, Rhett P. Ketterling, Eric Solary, Ayalew Tefferi, et Mrinal M. Patnaik. 2014. « Molecular and Prognostic Correlates of Cytogenetic Abnormalities in Chronic Myelomonocytic Leukemia: A Mayo Clinic-French Consortium Study ». *American Journal of Hematology* 89 (12): 1111-15. <https://doi.org/10.1002/ajh.23846>.
- Weiner, A. M., P. L. Deininger, et A. Efstratiadis. 1986. « Nonviral Retroposons: Genes, Pseudogenes, and Transposable Elements Generated by the Reverse Flow of Genetic Information ». *Annual Review of Biochemistry* 55: 631-61. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.003215>.
- Weirich, Sara, Mina S. Khella, et Albert Jeltsch. 2021. « Structure, Activity and Function of the Suv39h1 and Suv39h2 Protein Lysine Methyltransferases ». *Life (Basel, Switzerland)* 11 (7): 703. <https://doi.org/10.3390/life11070703>.
- Weishaupt, Holger, Mikael Sigvardsson, et Joanne L. Attema. 2010. « Epigenetic Chromatin States Uniquely Define the Developmental Plasticity of Murine Hematopoietic Stem Cells ». *Blood* 115 (2): 247-56. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235176>.
- Wheelan, Sarah J., Yasunori Aizawa, Jeffrey S. Han, et Jef D. Boeke. 2005. « Gene-breaking: A new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution ». *Genome Research* 15 (8): 1073-78. <https://doi.org/10.1101/gr.3688905>.
- Wicker, Thomas, François Sabot, Aurélie Hua-Van, Jeffrey L. Bennetzen, Pierre Capy, Boulos Chalhoub, Andrew Flavell, et al. 2007. « A Unified Classification System for Eukaryotic Transposable Elements ». *Nature Reviews Genetics* 8 (12): 973-82. <https://doi.org/10.1038/nrg2165>.
- Wilson, Anne, Elisa Laurenti, Gabriela Oser, Richard C. van der Wath, William Blanco-Bose, Maike Jaworski, Sandra Offner, et al. 2008. « Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair ». *Cell* 135 (6): 1118-29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.048>.
- Wilund, Kenneth R., Ming Yi, Filomena Campagna, Marcello Arca, Giovanni Zuliani, Renato Fellin, Yiu-Kee Ho, J. Victor Garcia, Helen H. Hobbs, et Jonathan C. Cohen. 2002. « Molecular Mechanisms of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia ». *Human Molecular Genetics* 11 (24): 3019-30. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.24.3019>.
- Wingett, Steven W., et Simon Andrews. 2018. « FastQ Screen: A Tool for Multi-Genome Mapping and Quality Control ». *F1000Research* 7: 1338. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15931.2>.

- Wolff, Erika M., Hyang-Min Byun, Han F. Han, Shikhar Sharma, Peter W. Nichols, Kimberly D. Siegmund, Allen S. Yang, Peter A. Jones, et Gangning Liang. 2010. « Hypomethylation of a LINE-1 Promoter Activates an Alternate Transcript of the MET Oncogene in Bladders with Cancer ». *PLOS Genetics* 6 (4): e1000917. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000917>.
- Wood, Jason G., et Stephen L. Helfand. 2013. « Chromatin Structure and Transposable Elements in Organismal Aging ». *Frontiers in Genetics* 4 (décembre): 274. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00274>.
- Wood, Jason G., Brian C. Jones, Nan Jiang, Chengyi Chang, Suzanne Hosier, Priyan Wickremesinghe, Meyrolin Garcia, et al. 2016. « Chromatin-Modifying Genetic Interventions Suppress Age-Associated Transposable Element Activation and Extend Life Span in *Drosophila* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (40): 11277-82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604621113>.
- Wu, Hao, et Yi Zhang. 2014. « Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions ». *Cell* 156 (1-2): 45-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.019>.
- Wu, Jiayi, Lijun Sun, Xiang Chen, Fenghe Du, Heping Shi, Chuo Chen, et Zhijian J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 826-30. <https://doi.org/10.1126/science.1229963>.
- Wu, Mei-Yi, Karen W. Eldin, et Arthur L. Beaudet. 2008. « Identification of Chromatin Remodeling Genes *Arid4a* and *Arid4b* as Leukemia Suppressor Genes ». *Journal of the National Cancer Institute* 100 (17): 1247-59. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn253>.
- Wu, Xianfang, Viet Loan Dao Thi, Yumin Huang, Eva Billerbeck, Debjani Saha, Hans-Heinrich Hoffmann, Yaomei Wang, et al. 2018. « Intrinsic Immunity Shapes Viral Resistance of Stem Cells ». *Cell* 172 (3): 423-438.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.018>.
- Xiao, Fu-Hui, Qing-Peng Kong, Benjamin Perry, et Yong-Han He. 2016. « Progress on the role of DNA methylation in aging and longevity ». *Briefings in Functional Genomics* 15 (6): 454-59. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elw009>.
- Xie, Mingchao, Charles Lu, Jiayin Wang, Michael D. McLellan, Kimberly J. Johnson, Michael C. Wendl, Joshua F. McMichael, et al. 2014. « Age-Related Mutations Associated with Clonal Hematopoietic Expansion and Malignancies ». *Nature Medicine* 20 (12): 1472-78. <https://doi.org/10.1038/nm.3733>.
- Xing, Jinchuan, Hui Wang, Victoria P. Belancio, Richard Cordaux, Prescott L. Deininger, et Mark A. Batzer. 2006. « Emergence of Primate Genes by Retrotransposon-Mediated Sequence Transduction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (47): 17608-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603224103>.
- Xing, Jinchuan, Yuhua Zhang, Kyudong Han, Abdel Halim Salem, Shurjo K. Sen, Chad D. Huff, Qiong Zhou, et al. 2009. « Mobile Elements Create Structural Variation: Analysis of a Complete Human Genome ». *Genome Research* 19 (9): 1516-26. <https://doi.org/10.1101/gr.091827.109>.
- Xiong, Feng, Ruoyu Wang, Joo-Hyung Lee, Shenglan Li, Shin-Fu Chen, Zian Liao, Lana Al Hasani, et al. 2021. « RNA m6A Modification Orchestrates a LINE-1–Host Interaction That Facilitates Retrotransposition and Contributes to Long Gene Vulnerability ». *Cell Research* 31 (8): 861-85. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00515-8>.
- Xu, Feng, Xiao Li, Lingyun Wu, Qingxia Zhang, Rui Yang, Yujuan Yang, Zheng Zhang, Qi He, et Chunkang Chang. 2011. « Overexpression of the *EZH2*, *RING1* and *BMI1* Genes Is Common in Myelodysplastic Syndromes: Relation to Adverse Epigenetic Alteration and Poor Prognostic Scoring ». *Annals of Hematology* 90 (6): 643-53. <https://doi.org/10.1007/s00277-010-1128-5>.
- Xu, Jane Jialu, Alistair M. Chalk, Meaghan Wall, Wallace Y. Langdon, Monique F. Smeets, et Carl R. Walkley. 2022. « *Srsf2*^{P95H/+} Co-Operates with Loss of TET2 to Promote Myeloid Bias and Initiate a Chronic Myelomonocytic Leukemia like Disease in Mice ». <https://doi.org/10.1101/2022.06.21.496931>.

- Yahata, Takashi, Tomomi Takanashi, Yukari Muguruma, Abd Aziz Ibrahim, Hideyuki Matsuzawa, Tomoko Uno, Yin Sheng, et al. 2011. « Accumulation of Oxidative DNA Damage Restricts the Self-Renewal Capacity of Human Hematopoietic Stem Cells ». *Blood* 118 (11): 2941-50. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330050>.
- Yamamoto, Ryo, Adam C. Wilkinson, Jun Ooehara, Xun Lan, Chen-Yi Lai, Yusuke Nakauchi, Jonathan K. Pritchard, et Hiromitsu Nakauchi. 2018. « Large-Scale Clonal Analysis Resolves Aging of the Mouse Hematopoietic Stem Cell Compartment ». *Cell Stem Cell* 22 (4): 600-607.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.013>.
- Yamashita, Masayuki, et Emmanuelle Passegué. 2019. « TNF- α Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration ». *Cell Stem Cell* 25 (3): 357-372.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.019>.
- YAZDI, Narjes, Mohammad HOUSHMAND, Amir ATASHI, Alireza KAZEMI, Ali Anjam NAJMEDINI, et Mahin Nikougoftar ZARIF. 2018. « Long noncoding RNA PVT1: potential oncogene in the development of acute lymphoblastic leukemia ». *Turkish Journal of Biology* 42 (5): 405-13. <https://doi.org/10.3906/biy-1801-46>.
- Ye, Mengliang, Christel Goudot, Thomas Hoyler, Benjamin Lemoine, Sebastian Amigorena, et Elina Zueva. 2020. « Specific subfamilies of transposable elements contribute to different domains of T lymphocyte enhancers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (14): 7905-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912008117>.
- Yildirim, Eda, James E. Kirby, Diane E. Brown, Francois E. Mercier, Ruslan I. Sadreyev, David T. Scadden, et Jeannie T. Lee. 2013. « Xist RNA Is a Potent Suppressor of Hematologic Cancer in Mice ». *Cell* 152 (4): 727-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.034>.
- Yin, Rong, Jiwei Chang, Yashu Li, Zhuying Gao, Qiang Qiu, Qifan Wang, Guoqiang Han, et al. 2022. « Differential M6A RNA Landscapes across Hematopoiesis Reveal a Role for IGF2BP2 in Preserving Hematopoietic Stem Cell Function ». *Cell Stem Cell* 29 (1): 149-159.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.09.014>.
- Yoshida, Kenichi, Masashi Sanada, Yuichi Shiraishi, Daniel Nowak, Yasunobu Nagata, Ryo Yamamoto, Yusuke Sato, et al. 2011. « Frequent Pathway Mutations of Splicing Machinery in Myelodysplasia ». *Nature* 478 (7367): 64-69. <https://doi.org/10.1038/nature10496>.
- Yoshimi, Akihide, Maria E. Balasis, Alexis Vedder, Kira Feldman, Yan Ma, Hailing Zhang, Stanley Chun-Wei Lee, et al. 2017. « Robust Patient-Derived Xenografts of MDS/MPN Overlap Syndromes Capture the Unique Characteristics of CMML and JMML ». *Blood* 130 (4): 397-407. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-763219>.
- Yu, Qiuqing, Christopher J. Carbone, Yuliya V. Katlinskaya, Hui Zheng, Ke Zheng, Mengcheng Luo, P. Jeremy Wang, Roger A. Greenberg, et Serge Y. Fuchs. 2015. « Type I Interferon Controls Propagation of Long Interspersed Element-1 * ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (16): 10191-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612374>.
- Yue, Sibiao. 2017. « Age-Associated Loss of Lamin-B1 in Thymic Epithelial Cells Disrupts the Thymic Microenvironment for Thymopoiesis and Leads to Thymic Involution ». *The Journal of Immunology* 198 (1 Supplement): 202.13-202.13.
- Zawada, Adam M., Kyrill S. Rogacev, Björn Rotter, Peter Winter, Rolf-R. Marell, Danilo Fliser, et Gunnar H. Heine. 2011. « SuperSAGE Evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ Monocytes as a Third Monocyte Subset ». *Blood* 118 (12): e50-61. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-326827>.
- Zhang, Jianong, Kun Gao, Hongyan Xie, Dejie Wang, Pingzhao Zhang, Ting Wei, Yuqian Yan, et al. 2021. « SPOP mutation induces DNA methylation via stabilizing GLP/G9a ». *Nature Communications* 12 (septembre): 5716. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25951-3>.
- Zhang, Pan, Xiang Li, Chengwei Pan, Xinmin Zheng, Bohan Hu, Ruiheng Xie, Jialu Hu, Xuequn Shang, et Hui Yang. 2022. « Single-cell RNA sequencing to track novel perspectives in HSC heterogeneity ». *Stem Cell Research & Therapy* 13 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02718-1>.

- Zhang, Peng, Fuhong He, Jie Bai, Shohei Yamamoto, Shi Chen, Lin Zhang, Mengyao Sheng, et al. 2018. « Chromatin Regulator Asxl1 Loss and Nf1 Haploinsufficiency Cooperate to Accelerate Myeloid Malignancy ». *The Journal of Clinical Investigation* 128 (12): 5383-98. <https://doi.org/10.1172/JCI121366>.
- Zhang, Shang-Min, Wesley L. Cai, Xiaoni Liu, Durga Thakral, Jiesi Luo, Lok Hei Chan, Meaghan K. McGeary, et al. 2021. « KDM5B Promotes Immune Evasion by Recruiting SETDB1 to Silence Retroelements ». *Nature* 598 (7882): 682-87. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03994-2>.
- Zhang, Weiqi, Jingyi Li, Keiichiro Suzuki, Jing Qu, Ping Wang, Junzhi Zhou, Xiaomeng Liu, et al. 2015. « A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging ». *Science (New York, N.Y.)* 348 (6239): 1160-63. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1356>.
- Zhang, Xiaoyu, Yong Wang, Qiang Guo, Yutao Diao, Hongyan Liu, Guanhua Song, Wei Wang, Zhiyong Zhang, Haipeng Yin, et Lianlian Li. 2018. « Prognostic Role of MicroRNA-155 in Patients with Leukemia: A Meta-Analysis ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 483 (août): 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.04.015>.
- Zhang, Xu, et Wenqian Hu. 2016. « Long noncoding RNAs in hematopoiesis ». *F1000Research* 5 (juillet): F1000 Faculty Rev-1771. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8349.1>.
- Zhang, Yanyan, Liang He, Dorothée Selimoglu-Buet, Chloe Jegou, Margot Morabito, Christophe Willekens, M'boyba Khadija Diop, et al. 2017. « Engraftment of Chronic Myelomonocytic Leukemia Cells in Immunocompromised Mice Supports Disease Dependency on Cytokines ». *Blood Advances* 1 (14): 972-79. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017004903>.
- Zhang, Zhao, Jian Zhang, Lixia Diao, et Leng Han. 2021. « Small Non-Coding RNAs in Human Cancer: Function, Clinical Utility, and Characterization ». *Oncogene* 40 (9): 1570-77. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01630-3>.
- Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, A. M. Colapietro, J. Sampath, J. J. Morris, I. Lagutina, et al. 2001. « The ABC Transporter Bcrp1/ABCG2 Is Expressed in a Wide Variety of Stem Cells and Is a Molecular Determinant of the Side-Population Phenotype ». *Nature Medicine* 7 (9): 1028-34. <https://doi.org/10.1038/nm0901-1028>.
- Zhu, Chengzhan, Tohru Utsunomiya, Tetsuya Ikemoto, Shinichiro Yamada, Yuji Morine, Satoru Imura, Yusuke Arakawa, et al. 2014. « Hypomethylation of Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1) Is Associated with Poor Prognosis via Activation of c-MET in Hepatocellular Carcinoma ». *Annals of Surgical Oncology* 21 Suppl 4 (décembre): S729-735. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3874-4>.
- Ziegler-Heitbrock, Loems, et Thomas Hofer. 2013. « Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets ». *Frontiers in Immunology* 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2013.00023>.
- Zimmer, Stephanie N., Madeleine E. Lemieux, Bijal P. Karia, Claudia Day, Ting Zhou, Qing Zhou, Andrew L. Kung, et al. 2012. « Mice Heterozygous for CREB Binding Protein Are Hypersensitive to γ -Radiation and Invariably Develop Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasm ». *Experimental Hematology* 40 (4): 295-306.e5. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2011.12.004>.
- Zink, Florian, Simon N. Stacey, Gudmundur L. Norddahl, Michael L. Frigge, Olafur T. Magnusson, Ingileif Jonsdottir, Thorgeir E. Thorgeirsson, et al. 2017. « Clonal Hematopoiesis, with and without Candidate Driver Mutations, Is Common in the Elderly ». *Blood* 130 (6): 742-52. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-769869>.
- Zinkel, Sandra S., Christy C. Ong, David O. Ferguson, Hiromi Iwasaki, Koichi Akashi, Roderick T. Bronson, Jeffrey L. Kutok, Frederick W. Alt, et Stanley J. Korsmeyer. 2003. « Proapoptotic BID Is Required for Myeloid Homeostasis and Tumor Suppression ». *Genes & Development* 17 (2): 229-39. <https://doi.org/10.1101/gad.1045603>.

Titre : Dérégulation de l'hétérochromatine et des rétro-éléments dans les cellules souches hématopoïétiques avec l'âge : conséquences et applications potentielles pour le traitement de la leucémie myélomonocytaire chronique

Mots clés : rétro-élément, leucémie, épigénétique, cellule souche hématopoïétique, vieillissement

Résumé : Avec l'âge, le tissu hématopoïétique se détériore. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) accumulent des mutations, ont une réduction de leur capacité de reconstitution et une différenciation biaisée vers la lignée myéloïde. La perte de l'immunité adaptative et l'augmentation de l'inflammation, favorisent l'émergence d'hémopathies myéloïdes.

L'hétérochromatine est un état condensé de l'ADN défini par les marques H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3 et la méthylation de l'ADN. La réorganisation de l'hétérochromatine est un changement fréquemment signalé dans le vieillissement. Notamment, dans les CSH, la baisse de H3K9me3 avec l'âge est associée à une perte du potentiel de différenciation vers la lignée lymphoïde B. L'hétérochromatine a un rôle majeur dans la répression des rétro-éléments (RE) qui sont des séquences répétées capable d'altérer le génome et de modifier le transcriptome. L'équipe a récemment montré que les CSH de souris expriment des niveaux élevés de RE qui peuvent se mobiliser et altérer leur fonction de reconstitution dans le cadre d'un vieillissement prématuré induit par l'irradiation (IR). Les objectifs de mon projet de thèse sont d'analyser l'hétérochromatine et le rôle des RE dans : 1/ la transcription et la fonction des CSH murines lors de l'IR ; 2/ une situation pathologique du vieillissement : la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) et de proposer une application thérapeutique.

Nous montrons que l'IR contribue directement à la perte de H3K9me3 qui est responsable de l'expression accrue de RE. De plus, nous rapportons que les altérations transcriptomiques observées dans les CSH lors de l'IR, notamment la perte de la signature CSH, est associée à la dérégulation d'un ensemble particulier de RE introniques : des éléments LINE-1 récents abritant des sites de liaison NF- κ B, présents au sein des gènes des CSH. Nous révélons aussi que la voie TNF- α /NF- κ B/LINE-1 est impliquée dans le contrôle des gènes de CSH en cas de stress dû à l'IR.

La LMMC est une maladie clonale de la CSH contre laquelle il n'existe aucun traitement curatif. Les agents hypométhylants de l'ADN (HMA) sont efficaces chez 40% des patients LMMC mais leur effet est transitoire et le clone muté est toujours présent. Dans certains cancers, les HMA tuent les cellules tumorales en induisant une réponse immune via la dérégulation des RE mais cette réponse n'a jamais été démontrée dans la LMMC. Bien que des défauts dans la répression des RE participent au développement des tumeurs, les cellules cancéreuses deviennent dépendantes des RE, créant de la vulnérabilité. En effet, la forte hausse de RE par exemple par des HMA induit la formation d'ARN-db déclenchant la production d'interféron de type I (IFN-I) et une réponse immune anti-tumorale. Une expression insuffisante de RE due à un blocage épigénétique dans les CSH de LMMC pourrait expliquer la résistance aux HMA.

Nous rapportons pour la première fois que les CSH et progéniteurs (CSPH) de patients atteints de LMMC ont des défauts globaux de l'hétérochromatine dont une hausse de H3K9me2 par rapport aux cellules de sujets sains âgés. Nous avons émis l'hypothèse que cette hausse de H3K9me2 pourrait bloquer une induction importante des RE par les HMA. En effet, le traitement des CSPH de LMMC avec des HMA et des inhibiteurs de H3K9me2 diminue leur clonogénicité en méthylcellulose ainsi que leur survie et leur prolifération dans des cultures liquides à l'échelle unicellulaire, de façon synergique. De plus, le double traitement réduit voire même éradique les clones mutés des patients LMMC. Cet effet implique l'induction des RE, d'IFN-I et d'une signalisation antivirale dans les CSPH LMMC.

Ainsi les modifications de l'hétérochromatine observées avec l'âge et dans les maladies du vieillissement ont un impact majeur dans la dérégulation des RE et dans les anomalies fonctionnelles des CSH. La prise en compte de ces changements est cruciale pour découvrir de nouveaux traitements de ces pathologies.

Title : Dereglulation of heterochromatin and retroelements in hematopoietic stem cells with age : implications and potential applications for the treatment of chronic myelomonocytic leukemia
Keywords : retroelements, leukemia, epigenetics, hematopoietic stem cell, aging

Abstract : With age, the hematopoietic tissue deteriorates. Hematopoietic stem cells (HSCs) accumulate mutations, have a reduced capacity for reconstitution and a biased differentiation towards the myeloid lineage. The loss of adaptive immunity and increased inflammation favor the emergence of myeloid malignancies.

Heterochromatin is a condensed state of DNA defined by H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3 and DNA methylation. Its reorganization is a frequently reported change in aging. Notably, in HSCs, the decrease in H3K9me3 with age is associated with a loss of differentiation potential to the B lymphoid lineage. Heterochromatin has a major role in the repression of retroelements (REs). REs are repeated sequences capable of altering the genome and modifying the transcriptome. The team has recently shown that mouse HSCs express high levels of REs that can mobilize and alter their reconstitution function in the context of irradiation-induced premature aging (IR). The objectives of my thesis project are: 1/ to analyze the HSC heterochromatin state and the role of REs in: 1/ transcription and function of murine HSCs during IR; 2/ a pathological disease of aging: chronic myelomonocytic leukemia (CMML), and to propose a therapeutic application.

We show that IR directly contributes to the loss of H3K9me3 which is responsible for the increased expression of REs. Furthermore, we report that the transcriptomic alterations observed in HSCs during IR, including the loss of the HSC signature, is associated with the derepression of a particular set of intronic REs: recent LINE-1 elements harboring NF- κ B binding sites, present within HSC genes. We also reveal that the TNF- α /NF- κ B/LINE-1 pathway is involved in the control of HSC genes under IR stress.

CMML is a clonal disease for which there is no curative treatment. DNA hypomethylating agents

(HMAs) are effective in 40% of CMML patients but their effect is transient and the mutated clone is not eradicated. In some cancers, HMAs kill tumor cells by inducing an immune response via derepression of REs. Indeed, although defects in RE repression participate in tumor development, cancer cells become dependent on REs, creating vulnerability. Indeed, high RE upregulation by e.g. HMAs induces the formation of dsRNA triggering the production of type I interferon (IFN-I) and an anti-tumor immune response. This response has never been demonstrated in CMML. Insufficient RE expression due to epigenetic blockade in CMML HSCs could explain HMA resistance.

We report for the first time that HSCs and progenitors (HSPCs) from patients with CMML have global heterochromatin defects, notably a striking increase in H3K9me2 found all patients, compared to age-matched healthy subjects. We hypothesized that this increase in H3K9me2 could block significant RE induction by HMAs. Indeed, the treatment of CMML HSPCs with HMAs and H3K9me2 inhibitors decreases their clonogenicity in methylcellulose as well as their survival and proliferation in single-cell liquid cultures in a synergistic manner while having no effect on healthy cells. Moreover, the dual treatment reduces or even eradicates mutated clones. Furthermore, we demonstrate that targeting H3K9me2 enhances the efficacy of HMAs via induction of RE, IFN-I and antiviral signaling in malignant CSPH.

Thus, the changes in heterochromatin observed with age and in diseases of aging have a major impact on the deregulation of REs and functional abnormalities of HSCs. Taking into account these changes is crucial to discover new treatments for these diseases.