



**HAL**  
open science

# Rôle du microenvironnement inflammatoire dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T

Charly Le Maout

► **To cite this version:**

Charly Le Maout. Rôle du microenvironnement inflammatoire dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T. Hématologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5042 . tel-04894770

**HAL Id: tel-04894770**

**<https://theses.hal.science/tel-04894770v1>**

Submitted on 17 Jan 2025

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

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

# Université Paris Cité

École doctorale Hématologie, oncogénèse et biothérapies (ED 561)  
Laboratoire : Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiation (SGCSR)  
Équipe : Niche et Cancer dans l'Hématopoïèse

## Rôle du microenvironnement inflammatoire dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T

Par Charly LE MAOUT

Thèse de doctorat d'Hématologie

Dirigée par Dr. Françoise PFLUMIO et co-encadrée par Dr. Vanessa PETIT

*Présentée et soutenue publiquement le 23 Mai 2023*

Devant un jury composé de :

Dr. Susan CHAN	DR, Université de Strasbourg	Rapportrice
Dr. Alexandre BOISSONNAS	DR, Sorbonne Université	Rapporteur
Dr. Dominique PAYET-BORNET	DR, Aix-Marseille Université	Examinatrice
Dr. François DELHOMMEAU	PU-PH, Sorbonne Université	Examineur
Dr. Benjamin UZAN	MCU, Université Paris Cité	Membre invité
Dr. Vanessa PETIT	MCU, Université Paris-Saclay	Membre invitée
Dr. Françoise PFLUMIO	DR, Université Paris Cité / Université Paris-Saclay	Directrice de thèse



# Remerciements

---

Tout d'abord, je tiens à remercier les rapporteurs le Dr. Susan CHAN et le Dr. Alexandre BOISSONNAS pour avoir accepté de corriger mon manuscrit et participer à mon jury de thèse. Je souhaite également remercier les examinateurs, le Dr. Dominique PAYET-BORNET et le Dr. François DELHOMMEAU pour avoir accepté mon invitation pour juger mon travail de thèse. Et finalement je souhaite remercier le Dr. Benjamin UZAN qui a accepté de participer à mon jury de thèse en tant que membre invité.

Je remercie les organismes qui ont financé ma thèse, l'école doctorale n°561 « Hématologie, Oncogénèse, Biothérapie » qui m'a permis d'obtenir une bourse doctorale versée par le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur, puis la Ligue Nationale Contre le Cancer qui a financé ma 4<sup>ème</sup> année de thèse.

Je voudrais ensuite remercier ma directrice de thèse, le Dr. Françoise PFLUMIO. Tu m'as accueilli dans ton laboratoire il y a plus de 4 ans et demi sous l'aile de Benjamin et Vanessa pour prendre en main ce projet inflammation. A la tête du Laboratoire des cellules Souches Hématopoïétiques et Leucémies, tu sais créer un environnement de travail formidable permettant d'accomplir de nombreuses expériences. Grâce à ta rigueur et ton exigence, tu as su me faire évoluer dans mon travail et ma réflexion, remettre en question mes résultats tout en co-dirigeant le projet d'un regard expérimenté me poussant à toujours m'améliorer. Je t'en remercie.

Je tiens maintenant à remercier le Dr. Vanessa PETIT, qui m'a encadré durant ce projet de thèse. Tu m'as tellement apporté, tant au niveau scientifique que personnel. Je ne peux que saluer ta dévotion et ta rigueur au travail au quotidien tout en gardant une humeur toujours extrêmement positive ce qui a rendu ma collaboration avec toi toujours très agréable. Tu m'as apporté le soutien et la direction dont j'ai eu besoin aux moments où j'en ai eu besoin tout en sachant me motiver et réussir à me faire rester efficace. Ton encadrement dans mon expérience de thèse m'a marqué et je tâcherai de me rappeler des conseils que tu m'as donnés. Merci.

J'adresse mes remerciements au Dr. Benjamin UZAN. Tu m'as présenté ce projet de thèse à la fin de mon stage de master 2 et tu as su me convaincre pour monter à bord. Merci de m'avoir initié au monde des LAL-T. Tu m'as montré les rouages des mécanismes des débuts de la thèse et tu as su me mettre le pied à l'étrier pour produire les résultats nécessaires tout en apportant le cheminement de réflexion. Je te remercie également pour ton humour et la légèreté que tu as apporté à mon début de thèse. Tu as dû quitter le LSHL pour te diriger vers de nouveaux horizons qui ont été glorieux puisque tu as pu passer ton HDR. Je te remercie également pour ta participation à mes comités de suivi de thèse pendant lesquels tu as toujours su me donner de très bonnes remarques pertinentes concernant la suite du projet.

Je souhaite également remercier le Dr. Christine TRAN QUANG pour sa contribution et ses commentaires très utiles et pertinents lors de mes comités de suivi de thèse ainsi que pour m'avoir fourni la lignée ICN FF3 que je n'ai malheureusement pas pu foncièrement exploiter.



Je tiens à remercier le Dr. Daniel LEWANDOWSKI pour ses conseils lors de mes comités de suivi de thèse et pour la rédaction du manuscrit, ainsi que pour m'avoir encadré et aidé pour l'expérience de micro-array.

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres du laboratoire, pour leur bonne humeur. Il aurait été moins facile de se lever le matin si vous n'aviez pas contribué à cette bonne ambiance de travail : merci à Rima, Laurent, Anne, Klaudia ainsi qu'aux nouveaux arrivants Keltouma, Maciva et Boubacar d'avoir été de si bons collègues pendant cette fin de thèse. Je remercie également les anciens membres du laboratoire avec qui j'ai beaucoup échangé et aimé travailler. Merci à toi Julien, Laura J., Laura D., Mariquita (sorry, I couldn't say Veronica, it felt too weird), Guillaume, Irina, Marie-Laure, Elia, Lucine et Sarah. Votre accueil et gentillesse à tous ont grandement facilité mon intégration à cette équipe.

Merci à vous, Vilma, Caroline et Charlotte pour votre aide fantastique dans toutes les expériences souris que j'ai pu réaliser au laboratoire.

Merci Nathalie DECHAMPS, pour avoir trié les cellules lorsque j'en avais besoin, et d'avoir été une oreille attentive. Merci également à toi, Jan pour m'avoir formé à l'utilisation des cytomètres mais également à l'utilisation du trieur.

Merci également aux collègues du LRTS avec qui j'ai pu échanger de science et autre au cours de ma thèse. Merci à Daniel, Christophe, Nathalie, Stéphanie, Fédérica, Anne, Jaqueline et Germain. Et merci aux thésardes de cette équipe, Marion, Anaïs et Honorine qui ont toujours su amener une bonne ambiance au 2<sup>ème</sup> étage, par leur rire tonitruants que l'on entend de l'autre bout de l'institut. Merci également à l'ensemble des étudiants de l'institut, qui par leur sympathie et gentillesse sont parvenus à créer une bonne cohésion de groupe entre thésards.

Je tiens également à remercier ma famille, et plus particulièrement mes parents sans qui rien de tout cela n'aurait été faisable et qui m'ont toujours soutenu dans le choix de mes études. Merci également à toi Emilie, pour avoir pavé le chemin de la thèse dans la famille et pour avoir toujours été accueillante et aidante, et merci à toi Fabien pour ta présence et ton soutien, je suis très heureux d'avoir grandi avec vous.

Je remercie également mes amis de m'avoir supporté pendant ces 4 ans et demi, à ne parler que d'une seule chose : ma thèse. Merci aux amis du magistère Valéria, Grégoire, Elie, Sylvain, Egill, Yoann, Bertrand, Marie, François, Estelle, Guillerm, Clari, Matthieu, Léone, Maxime, Yann, Simone avec qui je suis resté proche. Merci à toi tout particulièrement Claire, car sans toi, je ne serais peut-être jamais venu à Paris pour le magistère, et je n'aurais peut-être jamais fait cette thèse, elle se réalise donc également grâce à toi.

Merci à tous mes amis d'enfance et de Bretagne, Paul, Jenny, Hugo, Pol, François, Romain, Gwenola, Bleuenn, c'est toujours un plaisir de se retrouver pour faire le point sur nos vies et se voir évoluer. J'ai hâte de vous revoir.

Merci également à tous ceux que j'ai rencontré pendant ma thèse. Ralph, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, ton soutien infaillible, ta présence, je ne sais pas si je pouvais rencontrer quelqu'un qui pouvait aussi bien me comprendre que toi. Merci.

Merci également à Thomas, Maria, Dan, Gabriel pour tous ces moments de plaisir passés avec vous. On se revoit tous très vite, c'est promis.

# Table de matières

---

Remerciements .....	1
Table de matières.....	3
Liste des figures et tableaux .....	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction .....	12
A. Leucémies aigües lymphoblastiques T (LAL-T) .....	12
1. Introduction sur l'hématopoïèse normale .....	12
i. Généralités sur l'hématopoïèse .....	12
ii. Lymphopoïèse T.....	14
2. Les Leucémies Aigües Lymphoblastiques T (LAL-T) .....	18
i. Introduction sur les hémopathies et les leucémies.....	18
ii. Généralités sur les LAL-T .....	20
iii. Classification des LAL-T .....	21
iv. L'hétérogénéité tumorale au sein des LAL-T.....	27
3. Prise en charge des LAL-T.....	28
i. Traitements.....	28
ii. Les rechutes .....	34
4. Microenvironnements et niches tumorales : rôle des facteurs extrinsèques dans le développement des LAL-T.....	36
i. Introduction sur les niches tumorales .....	36
ii. Les microenvironnements dans les LAL-T .....	37
iii. Le microenvironnement thymique .....	38
iv. Le microenvironnement de la MO.....	40
v. Le microenvironnement de la rate .....	45
vi. Conclusion sur les interactions LAL-T et microenvironnements.....	48
5. Les modèles d'étude des LAL-T.....	48
i. Utilisation d'échantillons primaires de patients .....	49
ii. Utilisation de modèles de LAL-T murines.....	52
iii. Modèles d'études in vitro de LAL-T .....	53
B. Le microenvironnement inflammatoire.....	54
1. Généralités .....	54

2.	Rôles des cellules immunitaires myéloïdes dans l'inflammation et dans les cancers	56
i.	Monocytes .....	57
ii.	Macrophages .....	59
iii.	Cellules dendritiques .....	61
iv.	Granulocytes neutrophiles .....	62
v.	Les Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) .....	63
vi.	Conclusion sur les cellules myéloïdes dans l'inflammation et les microenvironnements tumoraux .....	64
3.	L'inflammation dans les leucémies aigües Lymphoblastiques. ....	64
i.	Rôle du microenvironnement inflammatoire dans les LAL-B.....	65
ii.	Rôle du microenvironnement inflammatoire dans les LAL-T.....	68
C.	Conclusion générale.....	76
	<b>Objectifs de la thèse.....</b>	<b>77</b>
	<b>Résultats.....</b>	<b>78</b>
	<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>119</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>138</b>
	<b>Annexe.....</b>	<b>165</b>

## Liste des figures et tableaux

---

Figure 1 : Evolution de la représentation schématique de la hiérarchie hématopoïétique en lien avec l'arrivée de nouvelles technologies.

Figure 2 : Expression des marqueurs de surface des progéniteurs et précurseurs thymiques au cours de la différenciation, comparatif murins et humains.

Figure 3 : Différenciation lymphocytaire T et interaction entre progéniteurs et le microenvironnement thymique.

Figure 4 : Représentation schématique de l'activité NOTCH1 dans les progéniteurs lymphocytaires T.

Figure 5 : Diagramme des 4 différents types de leucémies majeurs en fonction de la lignée impactée et de la vitesse de progression leucémique aigüe ou chronique.

Figure 6 : Nouveaux traitements mis en place dans le ciblage de voies activées dans les LAL-T.

Figure 7 : Digramme de Wenn représentant les nouveaux évènements oncogéniques majoritaires identifiés dans les rechutes des LAL-T en fonction du type de rechute (type 1 ou type 2).

Figure 8 : Colonisation des LAL-T du thymus vers les différents organes.

Figure 9 : Organisation spatiale et composition cellulaire du thymus avec et sans LAL-T.

Figure 10 : Composition cellulaire et organisation du microenvironnement médullaire.

Figure 11 : Rôle de la signalisation la signalisation CCL19/CCR7 dans les modèles syngéniques de LAL-T.

Figure 12 : Schéma récapitulatif des interactions entre les acteurs cellulaires et moléculaires du microenvironnement et des LAL-T.

Figure 13 : Intensité de l'activité inflammatoire en fonction du temps et du recrutement des populations immunitaires.

Figure 14 : Mécanismes de recrutement des monocytes au cours de l'inflammation.

Figure 15 : Mécanismes de polarisation des macrophages en type M1 ou M2.

Figure 16 : Mécanismes de la voie SOCE « Store Operated Calcium Entry » médiée par les gènes *Stim1* et *Stim2* dans les LAL-T sur l'induction d'un microenvironnement inflammatoire.

Figure 17 : Rôle de soutien des cellules myéloïdes systémique à la LAL-T.

Figure 18 : Activité phagocytaire anti-tumorale dépendante de p21 des macrophages dans les LAL-T.

Figure 19 : Simulation de la niche médullaire dans l'étude de la LAL-B ex vivo.

Figure 20 : Effet du traitement CCPA sur la progression leucémique de T-ALL#1 et sur la sécrétion de molécules inflammatoires dans le plasma.

Figure 21 : Effet de l'injection de LPS sur progression leucémique.

Figure 22 : Effet de l'inhibition de la voie de signalisation HGF/cMet *in vitro* sur T-ALL#1.

Figure 23 : Effet du traitement SU sur les souris T-ALL#1 *in vivo*.

Tableau 1 : Classification EGIL (European Group for Immunological Characterization of Leukemia).

Tableau 2 : Fréquence de mutation des gènes dans la LAL-T en fonction de la famille de gènes et de l'âge des patients.

# Liste des abréviations

---

ABL1	Abelson Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase
ADAM10	ADAM Metallopeptidase Domain 10
ADN	acide desoxiribonucleique
AID	Activation-Induced Deaminase
AKT	AKT Serine/Threonine Kinase 1
Arg-1	Arginase 1
ARNm	ARN messagers
ATP	Adenosine triphosphate
BCL11B	BCL11 Transcription Factor B
BCL-2	BCL2 Apoptosis Regulator
BCL-XL	Longue isoforme de BCL2
BCR	Breakpoint Cluster Region
bHLH	basic Helix Loop Helix
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophages
CAR-T cells	Chimeric Antigen Receptor T cells
cCD3	expression intra-cytoplasmique de CD3
CCL	Chemokine (C-C motif) Ligand 2
CCND3	Cyclin D3
CCR	récepteur des chimiokines de la famille CC
CD	Clusters de Différentiation
cDC	cellules dendritiques conventionnelles
CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CIL	Cellules Initiatrices de Leucémie
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CLR	C type lectin receptors
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMH 1	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type 1
CMH 2	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type 2
CMP	Common Myeloid Progenitor
CNOT3	CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 3
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
CSF-1 (M-CSF)	Colony Stimulating Factor 1 (Macrophage-Colony Stimulating Factor)
CSF1-R (M-CSFR)	Colony Stimulating Factor 1 Receptor (Macrophage-Colony Stimulating Factor Receptor)
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CSL	Cellules Souches Leucémiques
CSM	cellules souches/stromales mésenchymateuses
cTEC	Cellules épithéliales thymiques du cortex
CXCL12	CXC-chemokine ligand
CXCR5	CXC-Receptor 5
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DC	Dendritic Cells

DLL1	Delta Like Canonical Notch Ligand 1
DLL4	Delta Ligand Like 4
DN	Doubles Négatives
DNMT3A	DNA Methyltransferase 3 Alpha
DP	Double Positives
EED	Embryonic Ectoderm Development
EGIL	European Group for Immunological Characterization of leukemias
EoBP	Eosinophil Basophil Progenitor
EOPS	Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques
ETP	Early T cell Progenitors
ETP-LAL	Early T-Cell Progenitors-Leucémie Aigüe Lymphoblastique
ETV6	ETS Variant Transcription Factor 6
EZH2	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
FAB	Franco-Americano Britanique
FBXW7	F-Box And WD Repeat Domain Containing 7
FLT3L	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3 Ligand
FPR1	Formyl Peptide Receptor 1
FT	Facteurs de Transcription
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating factor
G-MDSC	MDSC granulocytiques
GMP	Granulocyte-Monocyte Progenitor
GSI	inhibiteurs de la gamma sécrétase
HIF1 $\alpha$	Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$
HLA	Human Leucocyte Antigen
HMGB1	High group box 1 protein
HOXA	Homeobox A
HS5	Human Stromal 5
HSP70	heat-shock protein 70
ICN1	Intra Cellular NOTCH1
IFN-I	Interféron de type 1
IGF1	Insulin Growth Factor
IGF1R	Insulin Growth Factor Receptor
IL	interleukine
ILC	Inate Lymphoid Cells
iSP	immature Simple Positives
IT-HSC	Intermediate Term Hematopoietic Stem Cell
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase
JAK	Janus Kinase
KDM6A	Lysine Demethylase 6A
KO	Knock-out
LAL	leucémie aigüe lymphoblastique
LAL-T	leucémie aigüe lymphoblastique T
LAM	leucémie aigüe myéloïde
LEF1	Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
LepR <sup>+</sup>	Récepteur de la Leptine
Lf $\alpha$	Lymphotoxine $\alpha$

LILRB1	Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor B1
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LMC	leucémie myéloïdes chroniques
LMO	LIM-Only domaine
LMPP	Lympho-myeloid Primed Progenitor
LPS	Lipopolysaccharides
LT-HSC	Long Term Hematopoietic Stem Cells
MAL	macrophage associée à la leucémie
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAT	Macrophages Associés aux Tumeurs
mCD3	expression intra-membranaire de CD3
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein
MDR1	MultiDrug Resistant gene 1
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MEK	MAP/ERK Kinase
MEP	Megakaryo-Erythroid Progenitor
miRNA	micro RNA
MMP-9	Matrix Metallopeptidase 9
MO	moelle osseuse
moDCs	cellules dendritiques issues de monocytes
MO-MDSC	MDSC Monocytiques
MPP	MultiPluripotent Progenitor
MRD	maladie résiduelle minimale
MS5	Murine Stromal 5
mTEC	Cellules épithéliales thymiques de la medulla
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
MAT	Macrophages Associés aux Tumeurs
MVP	Major Vault Protein
MYB	MYB Proto-Oncogene, Transcription Factor
MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
MYH11+	Myosin Heavy Chain 11
NAT	Neutrophiles associés aux Tumeurs
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1
NG2	Neuron-glia antigen 2
NGS	next generation sequencing
NHEJ	Non homologous End Joining
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
NKX2	NK2 Homeobox
NOD	Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing
NOS1	Nitric Oxide Synthase 1
NSG	Non Obese Diabetic / Severe Combined ImmunoDefficiency / γ chain receptor of IL-2
NT5C2	5'-Nucleotidase, Cytosolic II
NUP214	Nucleoporin 214
OMS	Organisation Mondiale de la Santé



P53	Tumor Protein P53
PAMPs	Pathogene Associated Molecular Patterns
PCR	amplification en chaine par polymérase
pDC	cellules dendritiques plasmacytoïdes
PD-L1	Programmed death-Ligand 1
PDX	Patient-Derived Xenograft
PECAM1	Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PHF6	PHD Finger Protein 6
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PIM1	Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinas
PRC2	Polycomb Repressing Complex 2
pre-cDC	cellules dendritiques pré conventionnelles
pre-TCR	pre T Cell Receptor
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
RAF	Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
RAS	RAS Proto-Oncogene, GTPase
RB	RB Transcriptional Corepressor
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species espèces réactives d'Oxygène
RPL10	Ribosomal Protein L10
RTK	Receptor tyrosine kinase
RUNX1	RUNX Family Transcription Factor 1
SCF	Stem Cell Factor
SCID	Immunodéficience Combinée Sévère
scRNAseq	single cell RNA sequencing
SERCA	ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> Transporting 2
Siglec-10	Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 10
siRNA	small interference RNA
SIRP $\alpha$	Signal Regulatory Protein Alpha
SKP2	S-Phase Kinase Associated Protein 2
SNC	système nerveux centrale
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
SP	Simple Positifs
SSC	Side Scatter
STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription
ST-HSC	Short Term Hematopoietic Stem Cells
Stim	Stromal Interaction Molecule
SUZ12	SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
TAL1	T-Cell Acute Leukemia 1
TAM	Tumor Associated Macrophage
TAN	Tumor Associated Neutrophiles
TCR	T Cell Receptor
TEC	Cellules épithéliales thymiques
TEC	Thymic Epithelial Cells
Tfh	T follicular helper

TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TLR	Toll like receptors
TLX	T Cell Leukemia Homeobox 1
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPO	Trombopoiétine
Treg	lymphocytes T régulateurs
TSP	Thymus Seeding Progenitors
TSP	Thrombospondin 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH	Virus d'Immunodéficience Humain
WT1	WT1 Transcription Factor

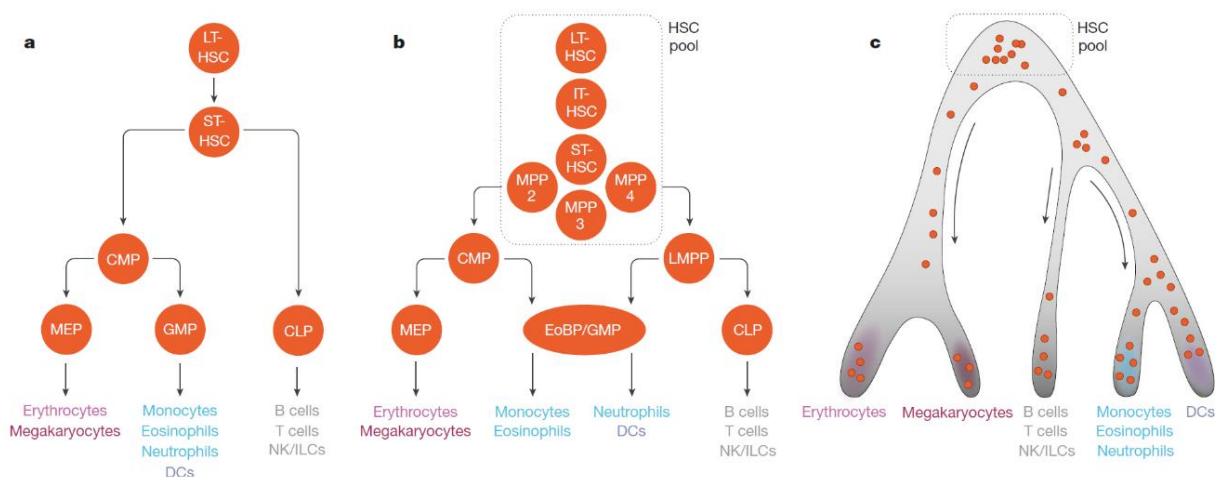
## A. Leucémies aigües lymphoblastiques T (LAL-T)

### 1. Introduction sur l'hématopoïèse normale

#### i. Généralités sur l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus physiologique conduisant à la production et à la maturation d'éléments figurés et fonctionnels du sang, comprenant les érythrocytes (également appelés globules rouges ou hématies), les thrombocytes (également appelés plaquettes) et les leucocytes (également appelés globules blancs) composés de cellules myéloïdes et lymphoïdes. Les cellules du système hématopoïétique ont des rôles très distincts. Les globules rouges transportent le dioxygène nécessaire à la respiration cellulaire. Le processus de production des globules rouges est l'érythropoïèse. La myélopoïèse est la production de cellules myéloïdes matures qui permettent la réponse inflammatoire suite à une infection bactérienne (Kruger et al., 2015), virale (Stegelmeier et al., 2019) ou parasitaire au cours de la réponse inflammatoire. Les granulocytes (éosinophiles, neutrophiles et basophiles), les monocytes, macrophages et les cellules dendritiques d'origine myéloïde constituent l'ensemble des cellules myéloïdes matures. La lymphopoïèse est le processus de production des lymphocytes T, B, des cellules NK « Natural Killer » et NKT « Natural Killers T », et des cellules dendritiques d'origine lymphoïde. Les lymphocytes contribuent à la réponse immunitaire innée mais sont en majorité à l'origine de l'immunité adaptative. Pour simplifier, les cellules lymphoïdes sont responsables de la réponse immunitaire adaptative et contribuent également à la réponse inflammatoire. Il existe donc schématiquement deux grandes catégories de cellules hématopoïétiques matures, les cellules myéloïdes, et les cellules lymphoïdes. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se trouvent dans la MO. Ce sont les cellules les plus immatures capables de s'autorenouveler et, grâce à leur potentiel multipotent, de se différencier en n'importe quelle cellule du sang sous couvert de signaux déterminant cette différenciation. En se divisant de façon asymétrique, les CSH présentes en très faible quantité dans la MO (1 cellule sur 1 million (Wang et al., 1997)) peuvent théoriquement donner naissance à des cellules progénitrices (CPH) qui peuvent à leur tour se différencier et produire quotidiennement les 500 milliards de cellules sanguines matures nécessaires aux fonctions vitales, tout en préservant leur capacité pérenne de cellules souches et de maintenir une

hématopoïèse viable tout au long de la vie d'un individu. Il est possible d'identifier par cytométrie en flux différentes vagues de maturation de progéniteurs hématopoïétiques vers les cellules qui acquièrent de plus en plus de caractéristiques de maturité, grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés vers les protéines de surfaces exprimées par ces cellules (Bhatia et al., 1997; Civin et al., 1984; Laurenti and Göttgens, 2018)) (Figure 1a-b). Cependant, grâce à l'avènement de nouvelles technologies comme le séquençage du transcriptome de cellules uniques (Tang et al., 2009), il est possible d'identifier l'expression génique qui conduit à la différenciation cellulaire. Cette différenciation est caractérisée par un continuum, plutôt que par des phases séparées de différenciation. La précision de la caractérisation des progéniteurs hématopoïétiques a mené les chercheurs à revisiter leur représentation de la différenciation hématopoïétique à l'image de la représentation du paysage épigénétique imaginé par Conrad H. Waddington en 1940 (Figure 1c) (Laurenti and Göttgens, 2018).



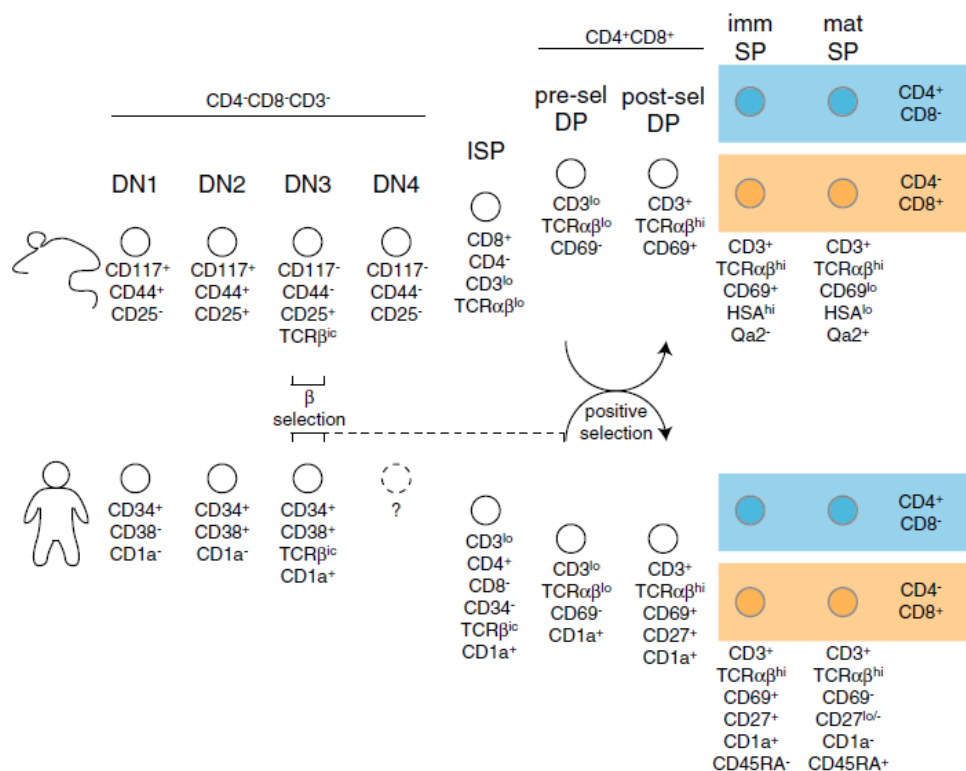
**Figure 1 :** Evolution de la représentation schématique de la hiérarchie hématopoïétique en lien avec l'arrivée de nouvelles technologies. a) Représentation de l'arbre hématopoïétique avec les premières identifications des progéniteurs hématopoïétiques : LT-HSC (Long Term Hematopoietic Stem Cells), ST-HSC (Short Term Hematopoietic Stem Cells), CMP (Common Myeloid Progenitor), CLP (Common Lymphoid Progenitor), MEP (Megakaryo-Erythroid Progenitor), GMP (Granulocyte-Monocyte Progenitor), DCs (Dendritic Cells), ILCs (Inate Lymphoid Cells). b) Précision de l'identification de progéniteurs hématopoïétique grâce à l'amélioration des techniques de cytométrie en flux, MPP (MultiPluripotent Progenitor), LMPP (Lympho-myeloid Primed Progenitor), EoBP (Eosinophil Basophil Progenitor), IT-HSC (Intermediate Term Hematopoietic Stem Cell). c) Représentation revisitée de l'arbre hématopoïétique sous forme de continuum de différenciations (de Laurenti and Göttgens, 2018).

## ii. Lymphopoïèse T

Contrairement aux autres lignées hématopoïétiques qui sont majoritairement générées dans la MO, la lymphopoïèse T se développe dans un organe épithélial spécialisé appelé thymus. La lymphopoïèse T est l'ensemble des événements physiologiques conduisant à la production de lymphocytes T matures et fonctionnels. Les cellules progénitrices passent par différents stades de différenciation qu'il est important de définir afin de mieux comprendre la classification des Leucémies Aigües Lymphoblastiques T (LAL-T) qui font l'objet de cette étude. Puisque ce processus est légèrement différent entre l'humain et la souris, les différences entre les 2 seront indiquées.

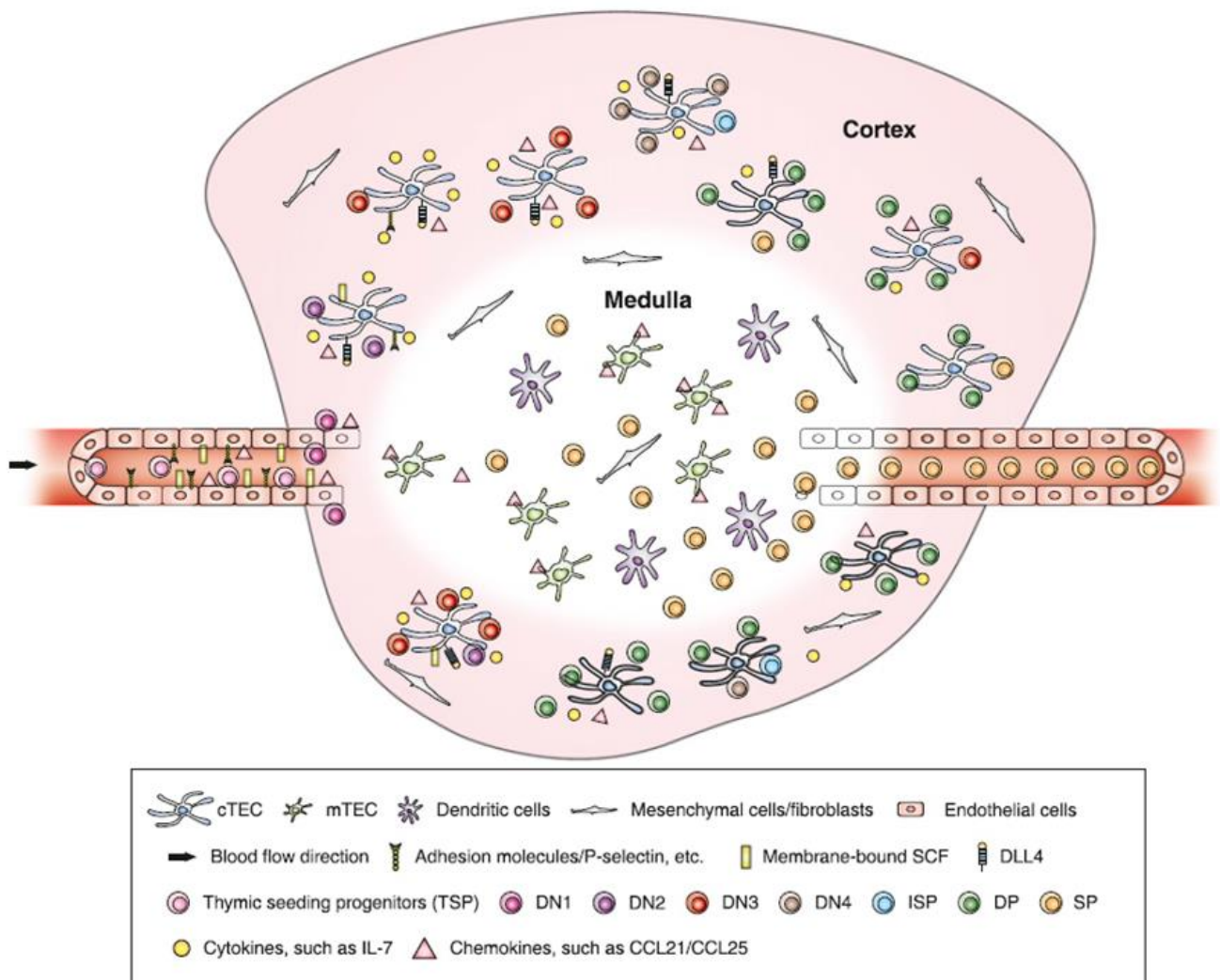
Etapes de différenciation caractérisée par l'expression de marqueurs de surface :

Les progéniteurs lymphoïdes immatures appelés "Thymus Seeding Progenitors" (TSP) proviennent de la MO. Ils vont migrer du microenvironnement médullaire vers le thymus en



**Figure 2 :** Expression des marqueurs de surface des progéniteurs et précurseurs thymiques au cours de la différenciation, comparatif murins et humains. Les cellules Doubles Négatives (DN) n'expriment ni le CD4, ni le CD8. Les progéniteurs passent ensuite par une étape immature Simple Positives (iSP) (CD4<sup>+</sup> chez l'Homme, CD8<sup>+</sup> chez la souris) avant de devenir Double Positives (DP) CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>. Et finalement, les lymphocytes T matures se restreignent pour l'un ou l'autre des marqueurs CD4 ou CD8 Simple Positifs (SP)(pour revue de Halkias *et al.*, 2014).

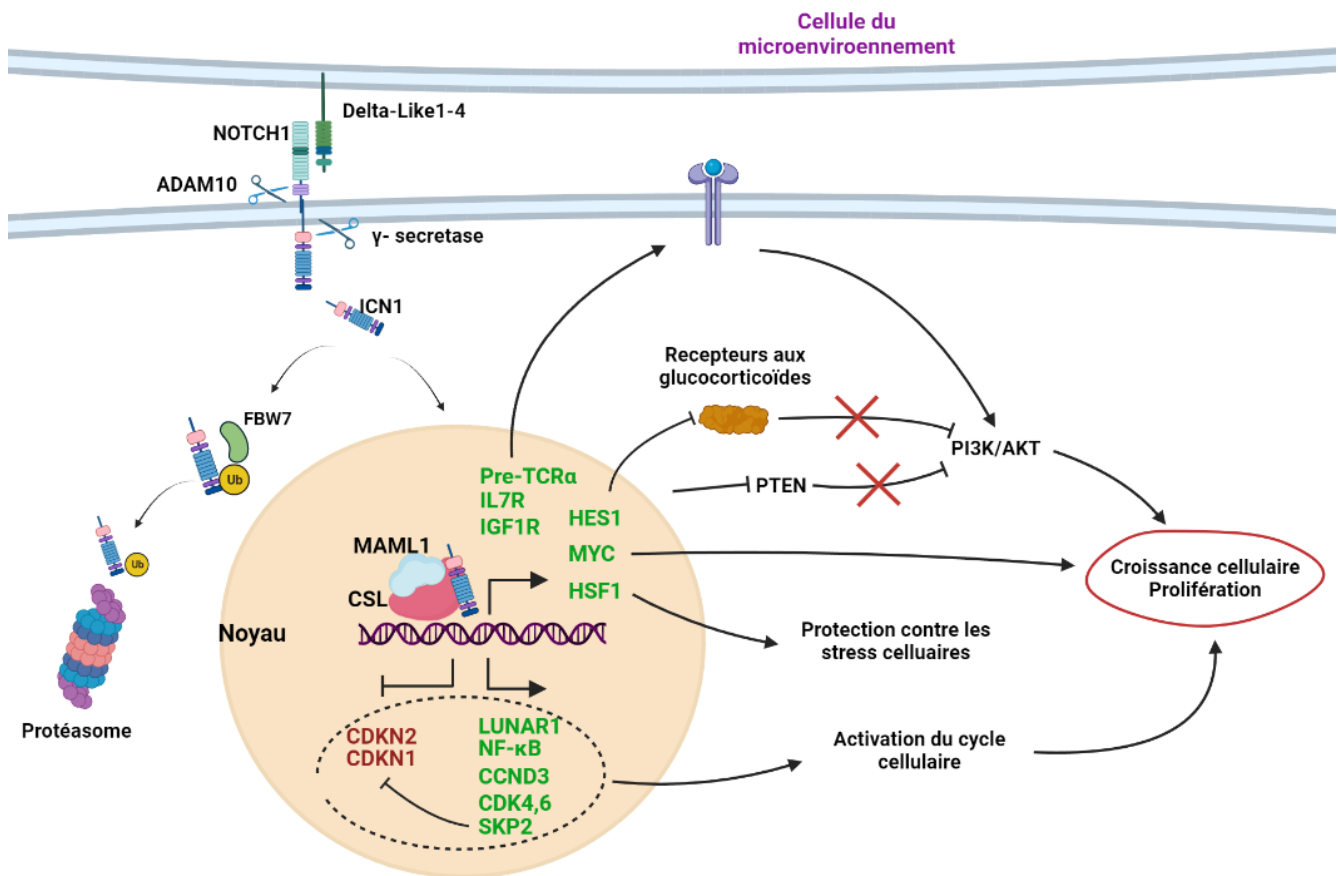
réponse à des signaux chimiotactiques comme la signalisation entre les chimiokines de la famille CC (CCL) et de leur récepteur (CCR), CCL21-CCL19/CCR7, CCL25/CCR9 ou CXCL12/CXCR4 (Calderón and Boehm, 2011; Liu et al., 2006), où leur maturation va se poursuivre suivant plusieurs étapes de sélection. Des analyses de scRNAseq comparant les thymocytes et les progéniteurs hématopoïétiques de la MO montrent que les TSP proviendraient de 3 groupes cellulaires avec des signatures transcriptomiques proches des CSH, MPP (MultiPotent



**Figure 3 : Différenciation lymphocytaire T et interaction entre progéniteurs et le microenvironnement thymique.** Les progéniteurs lymphocytaire T vont être adressés par la circulation sanguine en réponse à la signalisation CCL21, CCL19, CCL25. Les progéniteurs lymphocytaires T vont proliférer dans le cortex sous la signalisation NOTCH induite par les TEC et la signalisation IL-7/IL-7R du stade Double Négatif 1 (DN1) jusqu'au stade Double Positives (DP). Au stade Simple Positif (SP) les lymphocytes T matures vont rejoindre la médulla du thymus pour pouvoir rejoindre la circulation (de Han et Zuñiga-Pflucker, 2021).

Progenitor), LMPP (Lymphoid-Myeloid Primed Progenitors) et CLP (Common Lymphoid Progenitors) de la MO (Cordes et al., 2022). Il existerait donc une hétérogénéité de progéniteurs immatures médullaires capables de réaliser les premières étapes de la thymopoïèse. Une fois arrivés au thymus, les premiers progéniteurs T alors appelés ETP (Early T cell Progenitors) vont passer par plusieurs étapes de maturation (Figure 2). On caractérise les différentes étapes de maturation cellulaire lymphocytaire T en fonction de l'expression de marqueurs de surface appelés "Clusters of Différentiation" (CD), du TCR par l'expression intracytoplasmique (cCD3) ou membranaire (mCD3) du CD3. Chez l'humain on distingue les pro-T (cCD3+, CD7+/-, CD34+, CD33-, CD44+, CD33-, CD7+ CD5+/-), puis viennent les pre-T (CD34-, CD44-, CD7+, CD5+, CD1a+/-), ensuite les progéniteurs T corticaux, phase pendant laquelle les cellules font passer la sélection  $\beta$  dans le cortex du thymus (CD7+, CD5+, CD1a+, CD4 et/ou CD8, acquisition de mCD3, TCR $\alpha\beta$ +/-) et finalement les cellules matures (CD7+, CD5+ CD1a-, CD4 ou CD8+ exclusivement, TCR $\alpha\beta$ +, mCD3+).

L'impact de l'environnement thymique est primordial sur la différenciation T notamment au moment de la sélection  $\beta$ . Cette étape consiste à sélectionner les progéniteurs lymphocytes T capable d'initier la maturation lymphocytaire T. L'expression de la protéine NOTCH1 est primordiale dans les progéniteurs les plus immatures. Son activation induit l'expression du pre-TCR « pre T Cell Receptor » constitué du TCR- $\beta$  (formé à la suite de la recombinaison VDJ complète du locus de la chaîne  $\beta$  du TCR) et du preTCR- $\alpha$  (caractérisé par l'expression pT $\alpha$ , le gène de la chaîne  $\alpha$  du TCR non réarrangée) (Fehling et al., 1995). Les cellules de l'environnement thymique et particulièrement les TEC « Thymic Epithelial Cells » expriment le ligand de NOTCH, DLL4 « Delta Ligand Like 4 » (Figure 3) et via l'induction de la signalisation NOTCH vont induire la prolifération des progéniteurs, sélectionnant ainsi les cellules exprimant le pre-TCR (Figure 4). Il existe d'autres acteurs primordiaux dans le microenvironnement thymique comme l'interleukine 7 (IL-7) qui contribuent à la prolifération et la maturation des progéniteurs thymiques (Figure 3) (Rodewald et al., 1997). Cette prolifération est conjointe à une maturation caractérisée par l'expression successive de marqueurs de surface (Dutta et al., 2021). Une fois cette première phase de sélection achevée, la prolifération des progéniteurs va être diminuée en réponse à une diminution de la signalisation DLL4 dans le thymus et les progéniteurs T vont pouvoir achever la recombinaison du TCR- $\alpha$  pour alors former un TCR $\alpha\beta$  mature. Survient ensuite la phase de sélection des TCR $\alpha\beta$



**Figure 4 :** Représentation schématique de l'activité NOTCH1 dans les progéniteurs lymphocytaires T. Après son clivage, la partie intra cellulaire de NOTCH1 (ICN1) va être adressée au noyau. En s'associant avec ses co-activateurs (les complexes CSL et MAML1) ICN1 va induire l'expression de gènes comme HES1, MYC et HSF1 qui contribuent à la croissance et la prolifération cellulaire. La signalisation NOTCH1 induit également l'expression de récepteurs agissant en aval de la voie PI3K/AKT. Elle active la transcription de gènes de la voie NF-κB et induit la transcription de gènes favorisant l'activation du cycle cellulaire (CCND3, CDK4,6, SKP2).

fonctionnels. Les progéniteurs T via leur TCR vont reconnaître les antigènes du soi présenté par les cellules du microenvironnement thymique (cellules dendritiques ou TEC) par leur Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 1 (CMH 1). Les progéniteurs dont le TCR ne reconnaissent pas le CMH 1 seront éliminés de même que les progéniteurs qui reconnaissent le CMH 1 avec une affinité trop importante. De cette façon, sont produits des lymphocytes T capables de reconnaître les cellules du soi sans générer de réaction auto-immune, indispensable pour engendrer une réponse immunitaire fonctionnelle.



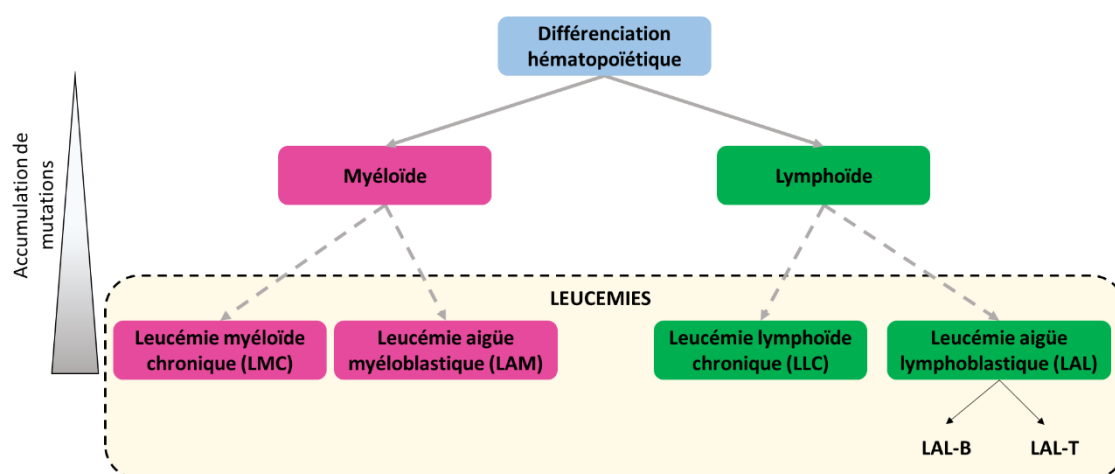
## 2. Les Leucémies Aigües Lymphoblastiques T (LAL-T)

### i. Introduction sur les hémopathies et les leucémies

Les hémopathies (« *haima* » : le sang, « *pathos* » : la pathologie) sont des maladies du système hématopoïétique classées en deux catégories. La première catégorie comprend les hémopathies bénignes caractérisées par les hémoglobinopathies et les carences conduisant à une anémie comme la drépanocytose également appelée anémie falciforme, identifiée par des mutations dans l'hémoglobine causant une forme particulière des érythrocytes. La seconde catégorie comprend les hémopathies malignes représentées majoritairement par les leucémies.

### Les leucémies

Le premier diagnostic et la définition du terme « Leucémie » prennent naissance en 1848 après que Rudolf Virchow, un chercheur allemand, ait réalisé une autopsie sur une patiente qui présentait une splénomégalie, des œdèmes et des saignements. Il a remarqué dans le sang que le nombre de leucocytes dans la circulation sanguine était élevé et conclut que la patiente avait une pathologie systémique du sang indépendamment d'une inflammation et la nomma « Leukämie » en allemand issu de « leukos » blanc et « haima » sang en grec ancien (Virchow, 1848). En effet, les leucémies sont des hémopathies malignes caractérisées par la prolifération anarchique de progéniteurs hématopoïétiques immatures bloqués dans leur



**Figure 5 :** Diagramme des 4 différents types de leucémies majeurs en fonction de la lignée impactée et de la vitesse de progression leucémique aigüe ou chronique. Les leucémies sont différenciées en fonction de la lignée hématopoïétique impactée (myéloïde ou lymphoïde) et la vitesse de progression de la maladie (chronique ou aigüe).

maturation. Ce phénotype particulier résulte d'une accumulation d'anomalies génétiques dans des oncogènes induisant la prolifération ou une perte de la mort cellulaire programmée.

Les leucémies sont classées en fonction du type cellulaire touché, lymphoïde ou myéloïde, et la vitesse de progression de la leucémie, chronique ou aigüe. Il existe donc quatre types majoritaires de leucémies : les leucémies à progression lente touchant la lignée myéloïde ou leucémie myéloïdes chroniques (LMC), les leucémies à progression rapide touchant la lignée myéloïde ou leucémie aigüe myéloïde (LAM), les leucémies à progression lente touchant la lignée lymphoïde ou leucémie lymphoïde chronique (LLC) et les leucémies à progression rapide touchant la lignée lymphoïde ou leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) (Figure 5).

### Classifications des leucémies aigües

#### Classification Franco-Américano Britannique (FAB)

En 1976, un premier consortium d'hématologistes d'origine française, américaine et britannique (FAB) ont mis en place un système d'identification des leucémies aigües basée sur l'identification cytologique et morphologique de cellules leucémiques, appelées blastes, issus du sang ou de la moelle osseuse d'environ 200 patients (Bennett et al., 1976). La classification FAB avait pour but à partir du type de leucémie aigüe (myéloïde ou lymphoïde) de définir des sous-groupes et de les corrélés avec une réponse aux traitements. L'analyse des cellules est basée par l'observation microscopique sur la taille des cellules, la présence de nucléoles dans le noyau, de vacuoles dans le cytoplasme et l'observation de la colorisation basophile. Les LAM sont catégorisées en 6 classes alors que l'on observe seulement 3 catégories de LAL indépendamment de l'identification des leucémies des lignées B et T.

#### Classification par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

La classification FAB a ensuite été raffinée par l'OMS, ce qui a permis de mettre en lumière les 2 catégories LAL-B et les LAL-T. Bien que la classification révisée de l'OMS de 2009 raffine la classification des néoplasmes myéloprolifératifs et décrit brièvement 7 sous-catégories de LAL-B basées sur des anomalies génétiques spécifiques, les LAL-T ne sont que très peu décrites.

### Les Leucémies Aigües Lymphoblastiques

Les **leucémies aigües lymphoblastiques (LAL)** sont des hémopathies malignes à développement rapide de progéniteurs lymphoïdes B ou T. Il s'agit de l'une des formes prédominantes du cancer de l'enfant. La prévalence des LAL a une distribution biphasique avec 80% de cas

pédiatriques et 20% de cas adultes. Les LAL-T représentent 15% des LAL pédiatriques et 20% des LAL de l'adulte, le reste étant représenté par les LAL-B (Chiaretti and Foà, 2009). L'étiologie des LAL est multifactorielle. Des prédispositions génétiques sont décrites dans une minorité de cas avec des syndromes associés comme le syndrome de Down, l'anémie de Fanconi, le syndrome de Bloom, le syndrome de Nimègue ou l'ataxie télangiectasie, tous accompagnés par une forte instabilité génétique. D'autres facteurs environnementaux de prédisposition ont été décrits comme les radiations ionisantes, certains solvants et des infections virales comme le virus d'Epstein-Barr ou le Virus d'Immunodéficience Humain (VIH). On observe généralement des aberrations (fusions, translocations) chromosomiques caractéristiques qui sont indispensables, mais souvent pas suffisantes pour induire la transformation leucémique (Terwilliger and Abdul-Hay, 2017). C'est l'accumulation de 10 à 20 anomalies dont des mutations et des délétions géniques qui induit la transformation leucémique dans les LAL (De Keersmaecker et al., 2013; Holmfeldt et al., 2013; Mullighan, 2012; Zhang et al., 2012a).

## ii. Généralités sur les LAL-T

Les LAL-T sont des hémopathies malignes caractérisées par l'expansion anarchique d'un ou plusieurs clones issus de progéniteurs ou de précurseurs lymphocytaires T bloqués dans leur différenciation. Bien que la prévalence des leucémies augmente avec l'âge, on observe un pic des LAL-T chez l'enfant et les adolescents (80% < 18 ans) et un second pic chez l'adulte de plus de 50 ans. Les symptômes des LAL-T identifiés au diagnostic peuvent comprendre une anémie liée à un déficit de production de globules rouges, une numération sanguine élevée, des symptômes cardiovasculaires comme la respiration coupée, des palpitations, des infections récurrentes et intenses, des purpuras, saignements du nez et apparitions d'hématomes dus à un déficit de production de plaquettes et l'apparition d'une masse dans le médiastin à partir du gonflement du thymus et des ganglions lymphatiques. Ces symptômes peuvent également apparaître avec les lymphomes T. Cependant on les différencie des LAL-T par l'expression de marqueurs de surface présents dans la différenciation lymphocytaire T plus immature pour les LAL-T ainsi qu'un envahissement des blastes leucémiques dans la MO, qui doit être supérieure à 20% des cellules nucléées selon l'OMS (Vardiman et al., 2009).

### iii. Classification des LAL-T

#### Classification EGIL des LAL-T

L'acronyme EGIL signifie "European Group for Immunological Characterization of leukemias". Le but de ce travail réalisé en 1995 était d'améliorer la classification des Leucémies Aiguës sur la base de l'expression par les blastes leucémiques de protéines de surface, représentatives du stade de blocage de la différenciation. La classification EGIL décrit 4 grands groupes de leucémies aiguës comprenant entre autre les LAL-T (Bene et al., 1995). Ainsi, la présence ou l'absence de ces marqueurs permet de classer les LAL-T selon 4 sous-groupes représentatifs de l'étape dans la lymphopoïèse T où le blocage de la différenciation a eu lieu : du stade le plus immature (pro-T ou T-I) au plus avancé dans la différenciation (mature ou T-IV) (Tableau 1). Cette classification est utilisée par les cliniciens au moment du diagnostic et les LAL-T à phénotype plus immature sont en probabilité de pronostic plus défavorable que les LAL-T à phénotype mature (Belver and Ferrando, 2016).

Type de LAL-T	cCD3	CD7	CD5	CD2	CD1a	CD34	CD4	CD8	mCD3	TCRαβ ou TCRγδ
LAL pro-T (T-I)	+	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-
LAL pre-T (T-II)	+	+	+	+	-	+/-	-	-	-	-
LAL-T corticale (T-III)	+	+	+/-	+/-	+	-	+	+	-	-
LAL-T mature (T-IV)	+	+	+/-	+	-	-	+/-	+/-	+	+

**Tableau 1 : Classification EGIL (European Group for Immunological Characterization of Leukemia).** Les sous-groupes de LAL-T sont classés en fonction de l'expression de marqueurs CD3 (intra-cytoplasmique cCD3 ou à la surface de la membrane mCD3), CD2, CD7, CD5, CD34, CD4, CD8, CD1a, TCRαβ ou TCRγδ (adapté de Bene et al, 1995 ; Litzow et Ferrando, 2015 ; et Marks et Rowntree, 2015).

#### Les Early T-Cell Progenitors Acute Lymphoblastic Leukemia (ETP-LAL)

Les ETP-LAL pour « Early T progenitors » Leucémie Aiguës Lymphoblastique, ont été classées par l'OMS en 2016 comme étant une classe particulière des LAL-T (Arber et al., 2016). Les ETP-LAL proviennent de la transformation oncogénique des ETP, des progéniteurs lymphocytaires T plus immatures. Les blastes des ETP-LAL expriment un phénotype de surface lymphoïde très immature proche de la classe I (Pro T-ALL : cCD3<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD1a<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD5<sup>-dim</sup>) qui ont maintenu la capacité d'exprimer au moins un marqueur de surface de lignage myéloïde ou immature tel que CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD11b ou CD165 (Coustan-Smith et al., 2009). On trouve des ETP-LAL parmi les patients pédiatriques (5-17% des LAL-T (Coustan-

Smith et al., 2009; Wood et al., 2014)) comme parmi les patients adultes (7.5% des LAL-T (Guo et al., 2016; Jain et al., 2016; Shah et al., 2015)). Les ETP-LAL ont un profil d'expression génique différent (signature transcriptomique proche des progéniteurs myéloïdes et des CSH) des autres LAL-T et sont associées avec un mauvais pronostic (Coustan-Smith et al., 2009).

### Classification des LAL-T en fonction des altérations génétiques et génomiques

Les LAL-T peuvent également être classées en fonction des oncogènes qu'elles expriment. On sait qu'entre 10 à 20 altérations génétiques induisant la modification de l'expression ou de l'activité des protéines coopèrent pour le développement leucémique T (De Keersmaecker et al., 2013; Girardi et al., 2017; Holmfeldt et al., 2013; Zhang et al., 2012a) et l'on sait grâce aux données de séquençage que ces coopérations apparaissent de façon coordonnée pour induire la leucémogénèse (De Bie et al., 2018; Girardi et al., 2017). Ces mutations apparaissent souvent à la suite d'une recombinaison défectueuse de l'un des gènes du TCR. Cependant il existe une récurrence dans des familles de gènes impliqués dans ces processus biologiques majeurs. On retrouve ainsi des mutations conduisant à l'expression ectopique de gènes impliqués dans la **voie NOTCH1**, le **cycle cellulaire**, la **traduction**, la **transduction du signal**, dans la régulation transcriptionnelle comme des **acteurs épigénétiques** ou encore des gènes codant des **Facteurs de Transcription** (FT). On peut ainsi classer les LAL-T en fonction des mutations dans les familles de gènes concernés.

#### La voie NOTCH1

Une voie de signalisation primordiale dans la différenciation T est la voie NOTCH1 (partie lymphopoïèse T) (Deftos and Bevan, 2000; Radtke et al., 2013) et on la retrouve mutée dans environ 50% des LAL-T (Weng et al., 2004). Il existe également de rares cas de translocation de *NOCTH1* induisant l'expression tronquée de la partie intracellulaire (ICN1) et une activation constitutive de la voie (Ellisen et al., 1991). En plus des mutations dans le gène *NOTCH1*, on retrouve également des mutations dans le gène *FBXW7*, l'E3 ubiquitine ligase responsable de l'adressage d'ICN1 au protéasome, ou encore des mutations gain de fonction pour la protéine  $\gamma$ -sécrétase l'enzyme clivant ICN1 (Figure 4). L'importance de l'activation de NOTCH1 via les mutations est réelle, toutefois il semble que la signalisation NOTCH1 activée par un de ses ligands DL1 est primordiale pour l'activité de propagation leucémique indépendamment du statut mutationnel de NOTCH1 dans les LAL-T (Armstrong et al., 2009).

## Cycle cellulaire :

Les gènes participant à la régulation du cycle cellulaire sont souvent mutés dans les cancers (Hanahan and Weinberg, 2011). Ces mutations conduisent généralement à une perte de l'apoptose et une progression du cycle cellulaire incontrôlée (Clappier et al., 2006; Liu et al., 2017). On retrouve notamment dans 70% des LAL-T une délétion du locus CDKN2A qui régule la transition entre la phase G1 et S du cycle cellulaire (Ferrando et al., 2002; Hebert et al., 1994).

## Facteurs de transcription (FT) :

Les facteurs de transcription du fait de leur rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes sont des cibles privilégiées, souvent mutées dans les cancers. Certains gènes sont retrouvés plus particulièrement dans les LAL-T.

*Les facteurs de transcription (FT) **bHLH** (basic Helix Loop Helix) de classe II.* Les FT les plus connus identifiés dans la LAL-T sont TAL1 dont l'expression est alternée dans 30 à 40% des LAL-T, TAL2 et LYL1. Cette famille comprend également les gènes de la **famille LIM-Only domaine** comme LMO1 ou LMO2 qui collaborent avec d'autres facteurs de transcription pour activer des programmes transcriptionnels proche de celui de cellules souches, favorisant un phénotype d'auto-renouvellement (Gerby et al., 2014; McCormack et al., 2010), caractéristique particulièrement représentée dans les ETP-LAL.

*Les FT **oncogéniques à homéodomaine.*** Ils sont classiquement exprimés lors du développement pour induire le lignage cellulaire, l'organisation corporelle et l'organogénèse. On retrouve notamment les gènes de la famille HOXA (HOXA9, HOXA10) également caractéristiques des ETP-LAL (Ferrando et al., 2003, 2002; Soulier et al., 2005). De même, l'expression oncogénique de la **famille de facteurs de transcription NKL** est particulièrement présente dans les LAL-T. Les LAL-T mutées pour les gènes de la famille TLX (TLX1, TLX2, TLX3) (entre 5 à 30% des LAL-T) ainsi que les gènes de la famille NKX2 (NKX2-1-, NKX2-2-, NKX2-5-) (5% des LAL-T) ont un profil transcriptionnel unique avec un arrêt du développement et une inhibition de l'expression de suppresseurs de tumeurs comme BCL11B, PHF6 et RUNX1 (De Keersmaecker et al., 2010; Della Gatta et al., 2012; Graux et al., 2004; Homminga et al., 2011).

*Les FT à **leucine zipper.*** MYC fait partie de cette famille de FT et est souvent dérégulé dans les LAL-T. L'activité de MYC se situe en aval de la signalisation NOTCH et du TCR. Lorsqu'elle est mutée, elle induit une forte croissance cellulaire et une prolifération conférant

une capacité initiatrice de leucémie aux progéniteurs lymphocytaires T (King et al., 2013; Langenau et al., 2003). On retrouve également MYB, un autre FT de cette famille, surexprimé dans 19% des LAL-T (majoritairement dans les LAL-T également mutées pour TAL1) (Sanda et al., 2012).

*Les FT suppresseurs de tumeurs* comme ETV6, RUNX1 et GATA3 sont associés aux ETP-ALL alors que les mutations de BCL11B, LEF1 et WT1 (respectivement mutés dans 10%, 15% et 10% des LAL-T) sont plus souvent retrouvées dans des LAL-T corticale associés avec des translocation TLX1 et TLX3.

### Acteurs épigénétiques

Certains régulateurs épigénétiques qui ont un rôle primordial dans la régulation de l'expression des gènes, notamment par la régulation de l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine, peuvent être mutés dans les LAL-T, et contribuer à la leucémogénèse. On retrouve ainsi des mutations dans des **modificateurs d'histones** comme PHF6 (20% des LAL-T) qui interagit avec le complexe NurD (Nucleosome remodeling Deacetylase) une histone déacetylase (Todd and Picketts, 2012; Van Vlierberghe et al., 2010), les protéines du complexe PRC2 (Polycom Repressing Complex 2) EZH2, EED et SUZ12 (25% des LAL-T) (Ntziachristos et al., 2012), ou le gène KDM6A (UTX) (Ntziachristos et al., 2014). Des mutations dans les gènes responsables de la **méthylation de l'ADN** sont également détectées dans les LAL-T, comme IDH1, IDH2 et DNMT3A (Buffière et al., 2019; Van Vlierberghe et al., 2011; Zhang et al., 2012b). Les **ARN non codants** peuvent également contribuer à la leucémogénèse des LAL-T. Les siRNA et miRNA, permettent l'inhibition de la transcription ou la dégradation d'ARN messagers (ARNm) de gènes cibles par homologie de séquence (Bartel, 2009; Wei et al., 2017). Il a été démontré que la dérégulation d'ARN non codants et plus particulièrement de miRNA favorise le développement des LAL-T (Correia and Barata, 2019; Renou et al., 2017; Wallaert et al., 2017).

### Transduction du signal

La transduction du signal est la conséquence de l'activation ou de l'inhibition de voies de signalisation. 6% des LAL-T portent des fusions oncogéniques faisant intervenir la **tyrosine kinase ABL1** souvent en duo avec des nucléoporines dans les LAL-T, comme dans la fusion NUP214-ABL1 (Graux et al., 2004).

De façon intéressante, la voie de signalisation **PI3K/AKT/mTOR** est l'une des voies de signalisation dérégulées dans 30% des LAL-T (Liu et al., 2017). Cette activation de la signalisation résulte fréquemment des pertes de fonction ou délétions de la protéine PTEN, un régulateur majeur de cette voie, dans 10-15% des LAL-T (Mendes et al., 2014; Palomero et al., 2007). La conséquence est de favoriser la progression du cycle cellulaire, une survie cellulaire, la glycolyse et la synthèse protéique (Cully et al., 2006; Stambolic et al., 1998).

La voie de signalisation **JAK/STAT induite par l'Interleukine 7 (IL-7)** via le récepteur à l'IL-7 (IL-7R) aide la progression des progéniteurs lymphocytaires T au cours de la lymphopoïèse en induisant la prolifération et la survie des cellules (Mazzucchelli and Durum, 2007). Ainsi, on retrouve des mutations activatrices dans les gènes de cette signalisation comme IL7R, ou plus en aval de la voie de signalisation, JAK1, JAK3 ou STAT5 (10% des LAL-T) (Liu et al., 2017).

On retrouve également des mutations dans les gènes de la voie de signalisation **RAS/MAPK**, qui souvent agit en aval de récepteurs à tyrosine kinase et induit la survie cellulaire ou la progression du cycle cellulaire (10-15% des LAL-T).

#### Traduction et protéines ribosomales :

Les protéines ribosomales sont retrouvées mutées dans certaines LAL-T. Notamment la protéine RPL10 code pour la sous-unité ribosomale 60S et est mutée par une substitution de l'Arginine 98 en Serine (mutation RPL10 R98S) (De Keersmaecker et al., 2013) dans 5 à 10% des LAL-T pédiatriques. Cette altération contribue à l'hypersensibilisation de la voie JAK-STAT conférant ainsi un avantage de survie aux blastes leucémiques (Kampen et al., 2019). Les études de séquençage des LAL-T réalisées par l'équipe de Kim de Keersmaecker et Jan Cools identifient des mutations sur d'autres protéines impliquées dans la traduction, comme les protéines ribosomales RPL5, RPL22 et RPL11, ou CNOT3, une protéine maintenant la stabilité des ARNm (De Keersmaecker et al., 2013; Girardi et al., 2017).



Famille de gènes	Pédiatrique	Adulte
<b>Différenciation lymphocytaire T</b>		
NOTCH1	50%	57%
FBXW7	14%	14%
<b>Cycle cellulaire</b>		
CDKN2A	61%	55%
CDKN2B	58%	46%
RB1 and CDKN1B	15%	
CCND3	6%	
CCND2	3%	
<b>Facteurs de transcription oncogéniques</b>		
TAL1	30%	34%
LMO1-LMO2	10%	
<b>Facteurs de transcription homeobox</b>		
HOXA9 -HOXA10	3%	
<b>Facteurs de transcription homeobox NKL</b>		
TLX1	8%	20%
TLX3	19%	9%
NKX2-1- NKX2-2-	8%	
<b>Facteurs de transcription leucine zipper</b>		
MYC	1%	
MYB	7%	17%
<b>Facteurs de transcription suppresseurs de tumeur</b>		
ETV6	8%	14%
RUNX1	8%	10%
GATA3	5%	3%
BCL11B	10%	9%
LEF1	10%	2%
WT1	19%	11%
<b>Acteurs épigénétiques</b>		
PHF6	19%	30%
PCR2 (EZH2, EED, SUZ12)	25%	
KDM6A	5-15%	
DNMT3A	1%	14%
SUZ12	11%	5%
<b>Transduction du signal</b>		
PI3K/AKT (PTEN, AKT1, PI3K, PIKC3A, PIK3CD)	30%	
IL7R/JAK/STAT (IL7R, JAK1, JAK3, STAT5)	25%	
ABL1-Fusions (NUP214-ABL1, EML1-ABL1, ETV6-ABL1)	8%	
RAS/MAPK (HRAS, KRAS, NF1)	10-15%	
<b>Traduction protéique et protéines ribosomales</b>		
RPL10	8%	1%
RPL5	2%	2%
RPL22	4%	0%
CNOT3	3%	8%
mTOR	5%	

Tableau 2 : Fréquence de mutation des gènes dans la LAL-T en fonction de la famille de gènes et de l'âge des patients (pédiatrique ou adulte) si documentée (adapté de Gianni et al, 2020 ; Girardi et al, 2017 ; Belder et Ferrando, 2016).

## Conclusion sur la classification des LAL-T

De nombreuses études de séquençage et fonctionnelles des LAL-T décrivent l'impact de mutations sur un large panel de voies biologiques majeures citées ci-dessus. On comprend donc qu'il existe un éventail de possibilités au sein même des LAL-T créant une diversité intrinsèque. Lorsqu'on parle de LAL-T il est donc aberrant de parler d'un seul type de LAL-T et pour traiter cette hémopathie, il faut comprendre qu'il n'existe pas qu'une LAL-T mais des LAL-T, avec une hétérogénéité inter-patients mais également intra-patient décrite par l'hétérogénéité tumorale.

### *iv. L'hétérogénéité tumorale au sein des LAL-T*

Plusieurs niveaux d'hétérogénéité ont été décrits au sein de leucémies. L'équipe du Docteur John E. Dick a dévoilé une hétérogénéité cellulaire dans les LAM. En effet, en pratiquant des transplantations de sous-populations cellulaires, sur la base d'expression de marqueurs de surface comme CD34, CD38 ou CD123, identifiées au sein de LAM, l'équipe s'est aperçue que l'une des sous-populations cellulaires était capable de régénérer une leucémie avec une hétérogénéité cellulaire similaire à la leucémie de départ. Cette population a été définie comme enrichie en Cellules Souches Leucémiques (ou CSL), également nommées Cellules Initiatrices de Leucémie (CIL) (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Cette hétérogénéité intra leucémique ainsi que l'identification de CIL ont ensuite été décrites au sein des LAL-T en montrant que des cellules CD34<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup> ou CD7<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> au sein de LAL-T étaient enrichies en CIL comparé à leurs contreparties CD34<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup> et CD7<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>. De plus, grâce à leur capacité souche, les CSL sont souvent plus enclines à s'autorenouveler (Gerby et al., 2014), à entrer en quiescence et *in fine* à résister aux traitements chimiothérapeutiques (Chiu et al., 2010). Ces mécanismes expliquent pourquoi les CSL pourraient contribuer aux rechutes (Belmonte et al., 2016).

D'autre part, il arrive que plusieurs clones avec des mutations différentes cohabitent au sein d'une même leucémie, auquel cas on observe une hétérogénéité génétique au sein d'une LAL-T d'un même patient (De Bie et al., 2018). Cette hétérogénéité tumorale peut être aussi à l'origine de variabilités de réponse aux traitements et à l'origine de rechutes (Richter-Pechańska et al., 2022). Les notions d'hétérogénéité tumorale, cellulaire et/ou génétique, compliquent la problématique des traitements et sont donc à prendre en considération lors des traitements ou de la recherche pour en développer de nouveaux.

### 3. Prise en charge des LAL-T

#### i. Traitements

##### Historique des traitements

La prise en charge des patients LAL-T a grandement été améliorée entre les années 1980 où les premiers traitements chimiothérapeutiques permettaient une proportion de rémission complète de 10% (Greaves et al., 1981; Thiel, 1985) et les années 2000 où l'on observe jusqu'à 90% de guérison des LAL-T pédiatriques (Conter et al., 2014; Hunger et al., 2012; Möricke et al., 2008; Pui et al., 2008; Pui and Evans, 2006; Vrooman and Silverman, 2009) et 50% des patients adultes (Marks et al., 2009; Patel et al., 2020; Pui and Evans, 2006) grâce en partie à l'intensification des protocoles de chimiothérapies.

##### Traitements actuels

Les protocoles actuels de traitement comprennent 3 phases : induction, consolidation, et entretien. A la fin de chaque phase de traitement, les cliniciens réalisent un myélogramme du patient afin de suivre la progression de la maladie. On quantifie la maladie résiduelle minimale ou MRD « Minimal Residual Disease » par le pourcentage de blastes leucémique après traitement identifié par cytométrie en flux ou amplification en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction ou PCR) pour détecter de plus faibles quantités de blastes résiduels afin raffiner la suite du protocole. On considère que MRD est négative lorsqu'on peut identifier moins 0.01% de blastes leucémiques dans le prélèvement de MO par rapport aux seuil de détection liées aux techniques utilisées (Campana and Pui, 2017). Bien que les protocoles de traitement soient très favorables pour les patients pédiatriques, le traitement des patients adultes n'est pas satisfaisant. En effet, les protocoles de traitement des patients prennent en compte différents paramètres au moment du diagnostic comme l'âge du patient (les patients plus jeunes sont susceptibles d'être moins sensibles aux effets secondaires et donc peuvent subir des traitements chimiothérapeutiques plus intenses), la présence d'anomalies génétiques particulières, le sous-type de LAL-T et l'état de santé global du patient.

##### La phase d'induction :

Il s'agit de la première phase de traitement où les patients subissent une polychimiothérapie intense avec l'injection quotidienne d'agents chimiothérapeutiques comme la **vincristine**, qui inhibe la polymérisation des fuseaux mitotiques (Johnson et al., 1963), une **anthracycline**, qui est généralement la daunorubicine (un intercalant de l'ADN (Waksman,

1960) qui cible les cellules en prolifération, et la **L-asparaginase**, un cytostatique spécifique des blastes de LAL-T bloquant la synthèse de l'asparagine (Broome, 1981). Ces molécules chimiothérapeutiques sont accompagnées de **glucocorticoïdes** comme la dexaméthasone (Pearson and Eliel, 1950; Pui and Evans, 2006) qui en se fixant à ses récepteurs intracellulaires induit une inhibition de la production de cytokines (Arya et al., 1984), modifie l'expression d'oncogènes (Schuchard et al., 1993), induit l'arrêt du cycle cellulaire et favorise l'apoptose (Harmon et al., 1979; Wyllie, 1980). Cette première phase d'induction arrive juste après le diagnostic où les patients ont une charge tumorale forte et sert à éliminer la grande majorité des blastes leucémiques présents en espérant éradiquer l'ensemble de la charge leucémique en ciblant les blastes leucémiques par plusieurs axes. On considère qu'il y a « réponse complète » en fin de protocole d'induction (entre 30 et 40 jours) lorsque le myélogramme indique qu'il y a moins de 5% de blastes leucémiques dans la MO, une absence de signes cliniques de la leucémie et un liquide céphalo rachidien normal, quelques semaines après la fin de la phase d'induction (Schrappe et al., 2011). Cette information est indicative de la réponse du patient à la première ligne de traitement et est critique pour les cliniciens afin de raffiner la suite du traitement. Chez les patients adultes, les cliniciens injectent également du méthotrexate de façon intrathécale (dans le liquide céphalo rachidien) lors de la phase d'induction, en traitement prophylactique, afin d'éviter l'invasion du système nerveux centrale (SNC) par la leucémie (Marks and Rowntree, 2017).

Cette première phase de polychimiothérapie intense permet un fort taux de rémission, surtout chez les patients pédiatriques avec un taux de survie à 5 ans après traitement de 90% (Hunger et al., 2012). En revanche, les patients adultes ne tolèrent pas une chimiothérapie aussi intense et on atteint 48% de taux de survie 5 ans après le traitement (Marks et al., 2009).

#### La phase de consolidation :

La phase de consolidation sert à soutenir la première phase de traitement. Les agents thérapeutiques peuvent être les mêmes ou peuvent être modifiés en fonction du niveau de la MRD. Il est également possible d'administrer d'autres molécules comme des inhibiteurs de tyrosine kinases (Tyrosine Kinase Inhibitors ou **TKI**) comme le dasatinib pour des LAL-T dont la kinase ABL1 est activée, si la présence d'une mutation/fusion d'un récepteur à tyrosine kinase est détectée par les panels de NGS (Next Generation Sequencing) en combinaison avec la polychimiothérapie administrée pendant la phase d'induction.

### La phase d'entretien :

Lors de la phase d'entretien, les patients reçoivent du méthotrexate (par voie orale généralement) et sont suivis sur le long terme pour surveiller la survenue éventuelle de rechutes.

### Transplantation de CSH

Après les traitements chimiothérapeutiques, les patients se retrouvent dépourvus d'une grande majorité de leur cellules malignes mais les cellules saines sont également impactées par ces traitements. De plus, certains patients répondent moins bien aux traitements de chimiothérapie classiquement appliquée, voire rechutent après ces traitements, et sont donc considérés à haut risque. Dans ces 2 cas, il est nécessaire de réaliser une greffe de CSH. Les cellules du donneur proviennent généralement, d'un membre de la fratrie avec un locus HLA identique, de donneur non apparenté avec une immunocompatibilité, ou d'un donneur apparenté haploidentique (Leung et al., 2012). Cependant le niveau de la MRD impacte la réponse à la transplantation de cellules hématopoïétiques et plus la MRD est forte, moins il y a de chance d'obtenir une rémission complète dans la LAL-T (Leung et al., 2012). Ainsi, la majorité des patients reçoit une irradiation totale du corps dans le but de créer une myéloablation afin d'éliminer l'ensemble des cellules présentes dans la MO pour permettre le nichage d'une nouvelle hématopoïèse saine et éliminer tous les éventuels blastes leucémiques restants (Hamilton et al., 2017). Cependant comme décrit dans (De Bie et al., 2018) certaines mutations peuvent être déjà présentes dans des progéniteurs hématopoïétiques immatures "normaux". Il faut donc également rester vigilant sur le statut mutationnel des cellules du donneur.

### Autres traitements

Comme indiqué ci-dessus, de nombreux gènes impliquant de multiples voies de signalisation peuvent être mutés dans les LAL-T. Au moment du diagnostic, les cliniciens réalisent un séquençage des blastes leucémiques par la technique de "Next Generation Sequencing" (NGS) ciblant les mutations connues afin de connaître le profil génétique de la leucémie et d'administrer un traitement approprié, notamment avec des molécules capables de cibler les voies de signalisation mutées. De nouveaux traitements en essais cliniques ou déjà utilisés pour d'autres pathologies sont décrits ci-dessous avec les voies de signalisation qu'ils ciblent (Cordo' et al., 2021).

## Inhibiteurs spécifiques de la voie NOTCH

On observe des mutations gain de fonction de la voie NOTCH dans 50% des LAL-T. Ces mutations conduisent à une sur-activation de la voie (cf partie NOTCH), contribuant en grande partie au phénotype leucémique (Girardi et al., 2017). Comme décrit en Figure 4 la  $\gamma$ -sécrétase réalise l'une des étapes clés d'activation de la voie NOTCH en réalisant la protéolyse de la partie C-terminale de NOTCH1. Des inhibiteurs de la  $\gamma$ -sécrétase (Gamma Secretase Inhibitors **GSI**) ont été développés afin de moduler l'activation de cette voie (Augelli-Szafran et al., 2010; Kaushik et al., 2021; Wolfe, 2006). Il a ainsi été démontré *in vitro* et *in vivo* que l'inhibition de la voie NOTCH1 grâce à l'utilisation de GSI induit un ralentissement de la progression leucémique dans les LAL-T (Armstrong et al., 2009; Palomero et al., 2006; Rao et al., 2009) et que l'utilisation combinée de GSI et de glucocorticoïdes, tels que la Dexaméthasone, potentialise leur action et permet une meilleure réponse des patients (Grosveld, 2009; Pui et al., 2008). Le souci de ces inhibiteurs de première génération a été une toxicité intestinale, contre-indiquant leur utilisation pour le traitement des LAL-T. De nouveaux GSI sont en phase clinique afin d'améliorer cet axe de traitement des LAL-T (Papayannidis et al., 2015). Dans le cas des translocations induisant l'expression de la version tronquée ICN1 et l'activation constitutive de la voie NOTCH, de telles stratégies thérapeutiques seraient inefficaces.

## Utilisation d'inhibiteurs de tyrosines kinases (ITK)

Certains réarrangements chromosomiques dans les LAL-T font intervenir des tyrosine kinases et provoquent leur suractivation induisant le phénotype cancéreux, notamment la fusion entre la nucléoporine NUP214 et la tyrosine kinase ABL1 (Graux et al., 2004). Les fusions faisant intervenir les tyrosine kinases étant établies dans d'autres leucémies (García-Gutiérrez and Hernández-Boluda, 2019; Leoni and Biondi, 2015), les cliniciens ont pris avantage de l'existence d'ITK qui étaient déjà prescrits pour d'autres leucémies (Quintás-Cardama et al., 2008) comme l'imatinib, le nilotinib ou le dasatinib, tous les 3 utilisés en clinique.

## Inhibiteurs de la voie JAK/STAT et PI3K/AKT

La voie JAK/STAT et PI3K/AKT peuvent être mutées dans les LAL-T (Girardi et al., 2017). Ainsi des inhibiteurs de cette voie comme le Ruxolitinib utilisés dans la LAM ou la LAL-B pour cibler la voie JAK/STAT peuvent être repositionnés et utilisés dans le cadre de la LAL-T. De la même façon, le Pictilisib et l'Apitolisib utilisés dans d'autres cancers pour inhiber PI3K peuvent également être repositionnés dans le cas de la LAL-T.

### Inducteurs d'apoptose

Les inducteurs de l'apoptose comme Navitoclax et Venetoclax peuvent induire la mort cellulaire des blastes de LAL-T, notamment en inhibant BCL-2 ou BCL-XL (Kampen et al., 2019).

### Inhibiteurs de la traduction

Des inhibiteurs de la traduction comme la Rapamycine sont en essais cliniques de phase 2 pour d'autres hémopathies comme les LAL-B et les lymphomes T et leur utilisation dans les LAL-T pourrait également être testé.

### Inhibiteurs de MEK

MEK est une protéine qui intervient dans de nombreuses réactions de transduction du signal notamment dans la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK. Cette voie est activée en aval des RTK et induit la prolifération cellulaire. Inhiber cette voie de signalisation avec des molécules comme le Trametinib (inhibiteur de MEK1/2) ou le Selumetinib (inhibiteur de MEK1) peut faciliter le traitement des LAL-T mutées pour ces voies de signalisation.

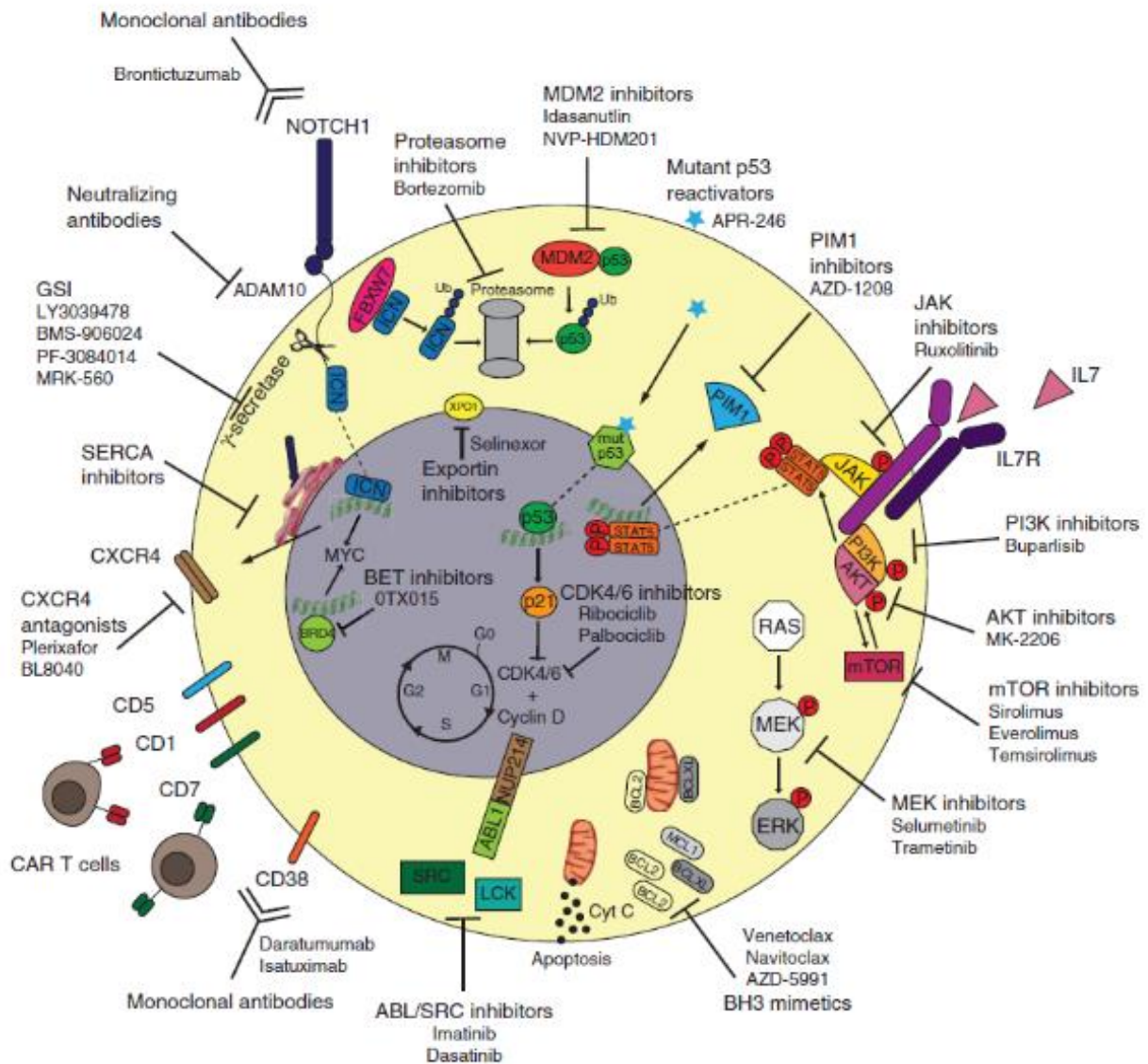
### Inhibiteurs d'ABL1

Dans le cas des réarrangements impliquant la kinase ABL1, il existe des inhibiteurs utilisés dans le traitement d'autres cancers et hémopathies comme l'Imatinib ou le Dasatinib qui semblent efficaces pour certaines LAL-T (Chen et al., 2017).

### Immunothérapies

L'immunothérapie se base sur le ciblage d'antigènes exprimés uniquement à la surface des cellules malignes. Cependant, il existe peu, voire pas, d'antigène exprimé spécifiquement par les blastes leucémiques de LAL-T. De récentes avancées en immunothérapies ont conduit à la production d'une nouvelle technique, les CAR-T cells pour « Chimeric Antigen Receptor T cells ». Les Lymphocytes T cytotoxiques normaux du patient sont prélevés et modifiés afin qu'ils expriment le CAR, un récepteur synthétique comprenant une partie intracellulaire nécessaire à la signalisation (CD3 zeta) et un récepteur extracellulaire ciblant un antigène spécifique souhaité. Une fois l'antigène reconnu par le CAR-T cell, la cellule ciblée sera supprimée par l'activité cytotoxique du lymphocyte T. Différentes générations de CAR-T cells se sont succédées pour améliorer la construction du CAR et l'efficacité du traitement (Bayón-Calderón et al., 2020). Cette technique est très efficace dans le cas des LAL-B pour cibler l'antigène CD19 à la surface des blastes (Greenbaum et al., 2020) mais plusieurs problématiques s'opposent à

leur utilisation dans le cas des LAL-T. Par exemple, le prélèvement de lymphocytes T sains est compliqué dans le cas des LAL-T où la majorité des cellules lymphocytaires du patient se rapprochant de la lignée T sont des blastes leucémiques, et donc les risques de contamination sont grands. De même, la population cellulaire leucémique ciblée étant des précurseurs de lymphocytes T, il n'est pas aisé de choisir une cible protéique non exprimées par les lymphocytes T matures non leucémiques. Un ciblage mal maîtrisé induirait une aplasie



**Figure 6 :** Nouveaux traitements mis en place dans le ciblage de voies activées dans les LAL-T. Cette représentation montre l'ensemble des voies qui peuvent être ciblées par les traitements : la voie NOTCH (NOTCH, ADAM10, SERCA,  $\gamma$ -sécrétase), CXCR4, le protéasome, MDM2, p53, PIM1, JAK/STAT et PI3K/AKT (mTOR, AKT, PI3K, IL7R, PIM1), RAS/MEK, l'apoptose (BCL-2, BCL-XL), le cycle cellulaire, les recombinaisons faisant intervenir ABL1, les protéines de surface (CD38, CD7, CD5, CD1) (de Cordo et al., 2021).



lymphocytaire T qui provoquerait une immunodéficience mortelle. Finalement, les CAR-T pourraient exercer une activité « fratricide » où les CAR se cibleraient les uns les autres de par leur nature de Lymphocytes T. Cependant, quelques études démontrent l'efficacité de l'utilisation de cellules CAR-T ou d'anticorps monoclonaux ciblant le CD5, le CD7 et le CD1a dans des LAL-T *in vivo* (Mamonkin et al., 2015; Sánchez-Martínez et al., 2019).

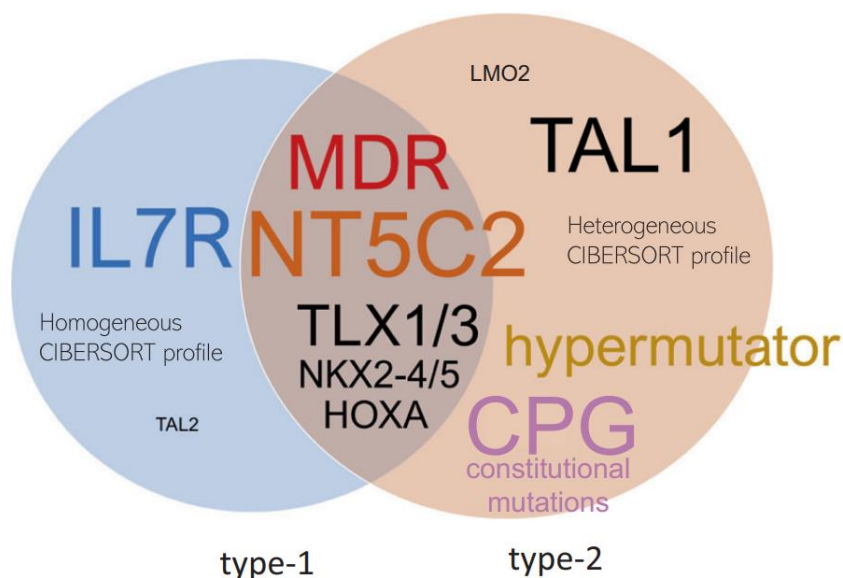
### Conclusion sur les traitements

L'amélioration des traitements des LAL-T depuis les débuts de la chimiothérapie a permis d'augmenter drastiquement le nombre de patients en rémission. Cependant, les rechutes restent très agressives, et souvent résistantes aux traitements ce qui est de mauvais pronostic pour les patients. Grâce à l'étude du microenvironnement et des mécanismes intrinsèques et extrinsèques impliqués dans la progression leucémique, les chercheurs tentent de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques pour mieux traiter les patients (Figure 6).

#### ii. *Les rechutes*

Bien que les taux de survie aient augmentés grâce à l'amélioration de la prise en charge des patients de LAL, il persiste 15 à 20% de rechute des patients pédiatriques de LAL-T (Pui et al., 2012). Même si 70% des cas de LAL sont des patients pédiatriques et jeunes adultes, les patients adultes sont beaucoup sensibles avec un taux de survie <35% pour les adultes de plus de 50 ans (Shiraz et al., 2021). Les rechutes sont particulièrement de mauvais pronostic avec un taux de survie de 10% (Einsiedel et al., 2005) et il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace.

Plusieurs études de séquençage de transcriptomique ou de génomique comparant des blastes de LAL-T au diagnostic et à la rechute ont montré qu'il existe 2 types majoritaires de rechute. Soit le clone à l'origine de la rechute fait partie du clone majoritaire au diagnostic ayant acquis de nouvelles mutations (le type 1), soit la rechute émerge d'un clone mineur ancestral avec une signature mutationnelle distincte de celle du clone majoritaire au diagnostic (le type 2) (Kunz et al., 2015; Mullighan et al., 2008). Pour le cas des LAL-T de l'adulte, Sentis a montré que les rechutes provenaient en grande partie d'un clone minoritaire présent au moment du diagnostic qui par pression de sélection suite aux traitements chimiothérapeutiques accumule des mutations supplémentaires lui conférant un avantage de prolifération (Sentis et al., 2020). De plus, il a été identifié grâce aux échantillons de diagnostic et rechute de 38 patients que les 2 types de rechutes avaient des profils de mutations caractéristiques mais que le type 2 présentait de fortes modifications épigénétiques induisant une mutagenèse importante à l'origine de l'avantage de prolifération du clone de la rechute. Cependant, dans les 2 cas, de nouvelles mutations caractéristiques des résistances aux traitements chimiothérapeutiques comme MDR1 (MultiDrug Resistant gene 1), MVP (Major Vault Protein) et NT5C2 sont retrouvées dans le clone majoritaire de rechute (Richter-Pechańska et al., 2022) (Figure 7).



**Figure 7 :** Digramme de Wenn représentant les nouveaux évènements oncogéniques majoritaires identifiés dans les rechutes des LAL-T en fonction du type de rechute (type 1 ou type 2). La taille de la police est proportionnelle à la fréquence de mutation du gène dans la rechute (de Richter-Pechańska et al., 2022)

## 4. Microenvironnements et niches tumorales : rôle des facteurs extrinsèques dans le développement des LAL-T.

### i. *Introduction sur les niches tumorales*

#### Importance de l'étude des microenvironnements

Les chercheurs et hématologues cherchent à mieux caractériser les leucémies depuis 50 ans afin d'améliorer les thérapies et augmenter le taux de survie en réponse à ces stratégies thérapeutiques. Les études décrites dans la partie classification des LAL-T et traitements des LAL-T montrent qu'il existe une hétérogénéité inter- et intra- leucémique influençant l'évolution de la maladie et la réponse aux traitements. De ce fait, pour mieux comprendre les LAL-T et identifier de nouvelles pistes thérapeutiques, il n'est pas souhaitable de se concentrer uniquement sur la diversité des LAL-T. Actuellement, la recherche en oncohématologie se penche aussi sur le microenvironnement des leucémies et sur son impact sur le développement leucémique et la réponse aux traitements (Passaro et al., 2016).

#### Définition de la niche

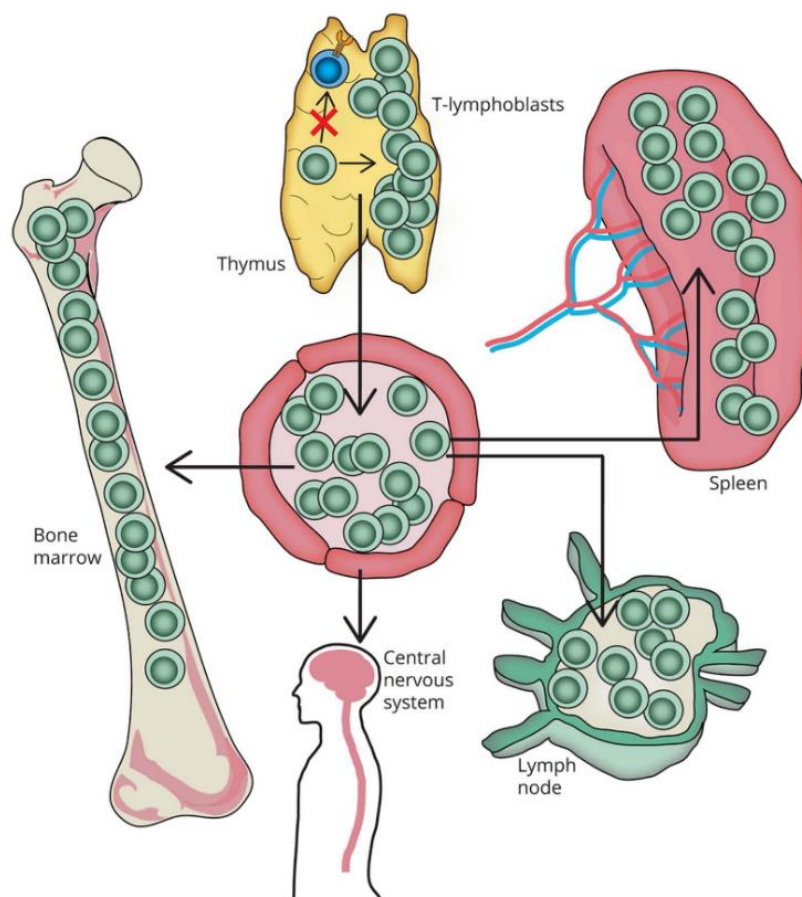
La notion de niche est définie par Jones et Wagers comme "l'ensemble des acteurs cellulaires et non cellulaires (molécules sécrétées, contraintes biophysiques...) dans le microenvironnement qui contribue à la localisation, la survie, la différenciation et la prolifération des cellules souches" (Jones and Wagers, 2008). L'étude de la niche est très importante au niveau de la MO pour comprendre le fonctionnement et la régulation des CSH (Boulais and Frenette, 2015; Sánchez-Lanzas et al., 2022) et grâce à l'avènement de la technique de séquençage de transcriptome sur cellule unique, de plus en plus de populations cellulaires interagissant avec les CSH sont définies (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019). Les conclusions sont que la niche hématopoïétique joue un rôle primordial dans la régulation des CSH en conditions d'homéostasie.

Puisque la niche joue un rôle si important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire normale, il convient de s'interroger sur son rôle dans un contexte cancéreux. Dans les tumeurs solides on lui donne un rôle majeur dans le conditionnement de l'hétérogénéité tumorale et l'induction des cellules souches cancéreuses (Plaks et al., 2015). La partie suivante adresse la question de la définition de la niche ainsi que de son rôle dans un contexte leucémique et plus particulièrement dans les LAL-T. L'étude du rôle de la niche permet de mieux comprendre les

interactions entre les LAL-T et le microenvironnement et d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

## ii. Les microenvironnements dans les LAL-T

Même si les premières mutations dans les LAL-T peuvent apparaître dans les progéniteurs hématopoïétiques immatures de la MO (De Bie et al., 2018), le site primaire de développement des LAL-T se trouve dans le thymus. Les blastes, qui sont des précurseurs T arrêtés dans leur différenciation thymique, envahissent le thymus lors de leur phase d'expansion, ce qui augmente son volume et induit une masse médiastinale. Ils envahissent ensuite d'autres organes hématopoïétiques, majoritairement la MO, les ganglions lymphatiques, la rate et le foie (conduisant à des splénomégalies et hépatomégalies) en passant par la circulation sanguine (Karrman and Johansson, 2017) (Figure 8). On peut également



**Figure 8 :** Colonisation des LAL-T du thymus vers les différents organes. Les LAL-T s'accumulent dans une première phase dans le thymus puis envahissent d'autres organes comme la MO, la rate, les ganglions lymphatiques et peuvent envahir le système nerveux central (de Karrman et al, 2017).

retrouver des atteintes du tissu adipeux testiculaire ainsi que du système nerveux central (SNC). Il est donc facile de s'imaginer que les blastes leucémiques passent par différents environnements cellulaires et moléculaires et que ces interactions peuvent influencer la progression leucémique.

### iii. *Le microenvironnement thymique*

#### Composition cellulaire du thymus

Le thymus est un organe épithélial bilobé situé dans la partie médiastinale de l'abdomen composé de 3 zones morphologiques : le cortex situé vers la périphérie de l'organe, la médulla qui constitue la partie la plus interne et la zone cortico-médullaire qui fait la jonction entre ces 2 parties. Toutes les cellules thymiques autres que les cellules de la lignée lymphoïde T sont identifiées comme des cellules stromales. Parmi elles, on retrouve les Cellules épithéliales thymiques (TEC) qui en fonction de leur localisation dans le thymus (cortex ou médulla) seront identifiées comme cTEC ou mTEC, les cellules endothéliales constituant la paroi des vaisseaux sanguins, les cellules mésenchymateuses/fibroblastiques, les cellules dendritiques et des lymphocytes B (Han and Zúñiga-Pflücker, 2021) (Figure 9). L'ensemble de ces cellules constituent le microenvironnement thymique cellulaire.

#### Rôle de la niche thymique dans les LAL-T

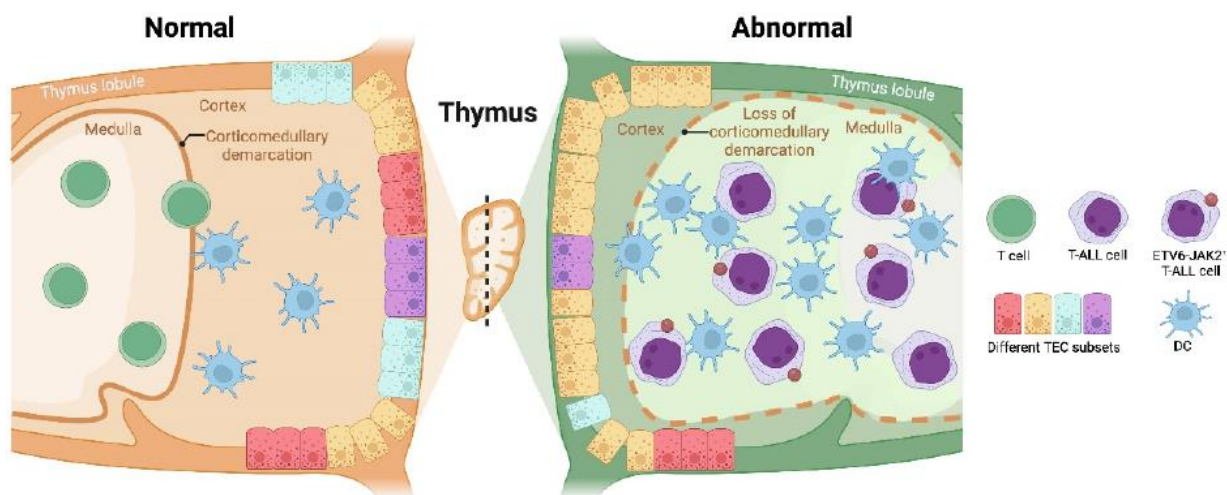
##### *Rôle des facteurs solubles*

**IL-7/IL-7R** : Il a été démontré par des expériences de co-culture *ex vivo* en utilisant des cellules primaires de LAL-T de patients sur un stroma cellulaire composés de TEC de donneurs sains que ces cellules de support favorisent la survie des blastes leucémiques. Cette équipe a ensuite démontré grâce à l'utilisation d'anticorps ciblant les épitopes fonctionnels de l'interleukine-7 (IL-7) dans leur milieu de culture que ce support de la leucémie était dû à la signalisation de l'IL-7 sécrétée par les TEC (Scupoli et al., 2003). Il a ainsi pu être démontré que les LAL-T qui expriment le récepteur à l'IL-7 à leur surface peuvent tirer avantage du microenvironnement thymique. De plus, il a également été décrit qu'ajouter de l'IL7 au milieu de culture de cellules primaires de LAL-T de patients aidait la prolifération des cellules leucémiques *ex vivo* (Barata et al., 2001). Le rôle de soutien de la progression leucémique de cette interaction ligand-récepteur a également été montrée *in vivo* notamment grâce à l'utilisation de modèles murins KO pour la sécrétion d'IL-7 (Silva et al., 2011).

**IGF1/IGF1R** : Les cellules dendritiques dans le thymus participent à la sélection des lymphocytes T et à leur immunotolérance des antigènes du soi. Dans cette étude, on apprend que les cellules dendritiques thymiques, jouent également un rôle de support de croissance des LAL-T en sécrétant de l'Insulin Growth Factor (IGF1). En se fixant sur le récepteur IGF1R à la surface des blastes LAL-T, l'IGF1 va induire la prolifération des cellules (Triplet et al., 2016). Le rôle de cette interaction a été validée, notamment par l'ajout d'inhibiteurs spécifiques de l'IGF1R au milieu de co-culture entre cellules dendritiques et blastes leucémiques.

### Impact des LAL-T sur le tissu thymique sain

Le microenvironnement thymique peut impacter la leucémie, mais l'inverse est également vrai. En effet, la niche thymique est également modifiée par la présence de blastes de LAL-T. En effet, dans Triplet et al., la réalisation d'expériences de co-culture entre des échantillons primaires de LAL-T et un stroma thymique issu de souris non leucémiques comparé à un stroma issu de souris leucémiques montrent que le stroma préalablement en contact avec la leucémie aide significativement mieux la croissance et la survie cellulaire *ex vivo* que le stroma non éduqué. Dans la même étude, on se rend compte que la distribution des TEC (du cortex ou de la medulla) est complètement altérée dans le thymus leucémique avec une perte majeure des TEC qui laissent la place aux blastes leucémiques, cellules endothéliales,



**Figure 9** : Organisation spatiale et composition cellulaire du thymus avec et sans LAL-T. La prolifération des blastes leucémique dans le thymus favorise une augmentation de la taille de la médulla, une perturbation de l'organisation des cellules épithéliales du thymus accompagnée d'une accumulation de cellules dendritiques et endothéliales (de Zhang et al, 2022).

fibroblastes et cellules dendritiques (Figure 9). En somme, cette étude démontre qu'il existe une **influence réciproque** entre les blastes leucémiques et le microenvironnement thymique et que ces interactions supportent la progression leucémique *in fine* via l'interaction IGF1/IGF1R (Triplett et al., 2016) et IL7/IL7 (Scupoli et al., 2003).

#### *iv. Le microenvironnement de la MO*

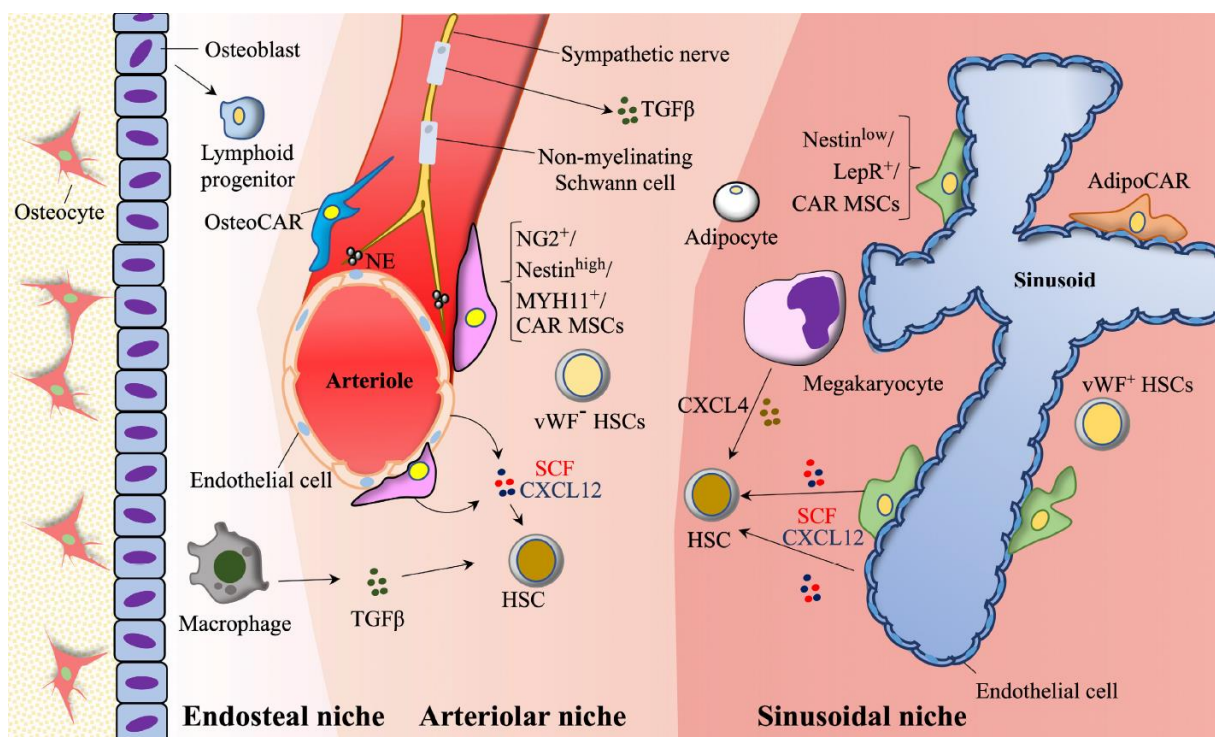
Le microenvironnement de la MO est très étudié car il permet de comprendre de nombreux mécanismes dans l'hématopoïèse normale et pathologique. En effet, l'étude de cette niche permet d'une part de caractériser les cellules qui la compose et de connaître les interactions cellulaires et moléculaires qui permettent aux CSH de garder leur potentiel. Dans un second temps, comprendre comment la niche interagit avec les blastes de LAL-T et comment les blastes réagissent en retour permet d'envisager de nouvelles stratégies permettant d'éliminer les cellules hématopoïétiques anormales et de restaurer l'hématopoïèse normale (Sánchez-Aguilera and Méndez-Ferrer, 2017).

#### Composition cellulaire de la niche médullaire :

Dans le compartiment médullaire, il existe 2 types de zone, la zone vasculaire (à proximité des artérioles et des sinusoides qui convergent vers la veine centrale des os de la moelle osseuse) et la zone endostéale à proximité du tissu osseux (Sánchez-Lanzas et al., 2022). On retrouve dans la MO les CSH et progéniteurs hématopoïétiques qui vont pouvoir se différencier et produire les cellules matures du sang. En parallèle des cellules hématopoïétiques, la niche médullaire contient de nombreux types cellulaires contribuant à une régulation complexe de processus physiologiques ou pathologiques associés à chaque zone. Dans les zones vasculaires, par définition on retrouve les cellules endothéliales qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins sinusoidaux ou artériolaires mais également les cellules stromales qui confèrent un échafaudage tri-dimensionnel composé de cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) qui, grâce à leur potentiel multipotent peuvent se différencier en ostéoblastes, adipocytes, et chondrocytes (Prockop, 1997). Différents types de CSM existent en fonction du type de vaisseau dont elles sont proches. A proximité des artérioles on retrouve les cellules NG2<sup>+</sup>, les cellules Nestin<sup>high</sup>, les cellules MYH11<sup>+</sup>, les CAR pour « CXCL12-abundant reticular cells » (ou cellules réticulaires exprimant abondamment le CXCL12) alors que les CSM périsinguoidales expriment entre autre, le récepteur de la Leptine (LepR<sup>+</sup>) ou faiblement la Nestine (Nestin<sup>low</sup>) (Morrison and Scadden, 2014; Tikhonova et al.,



2019). On détecte des cellules neuronales sympathiques ainsi que des cellules de Schwann non-myélinisées à proximité des artérioles et des mégacaryocytes à proximité des sinusoides. Généralement, les macrophages, les ostéoblastes et les ostéoclastes prennent part à la niche endostéale où la production du tissu osseux est régulée (Figure 10). Le potentiel des CSH sont différents selon leur localisation dans le microenvironnement médullaire (Itkin et al., 2016) et selon l'homéostasie. Les CSH les plus quiescentes se trouveraient plus proches de l'endoste, alors que les plus actives se trouvent plus proches des sinusoides dans une région moins hypoxique de l'environnement médullaire.



**Figure 10 :** Composition cellulaire et organisation du microenvironnement médullaire. On retrouve dans la niche endostéale les ostéocytes et ostéoblastes capables d'interagir avec les progéniteurs lymphoïdes et les macrophages qui par la sécrétion de TGF-β peuvent activer les CSH. Les niches vasculaires sont plus complexes avec l'interaction entre les cellules endothéliales artériolaires, cellules neuronales, les CSM (dont dérivent les OsteoCAR à proximité de la niche endostéale, les CAR) qui peuvent interagir par la sécrétion de CXCL12 ou de SCF avec les CSH. On peut également retrouver certains progéniteurs lymphoïdes à proximité des CAR (Mourcin et al. 2011). La niche sinusoidale composée de cellules endothéliales des sinusoides avec lesquels peuvent interagir d'autres types de CSM dont dérivent les AdipoCAR également responsables de la sécrétion de CXCL12, et d'adipocytes. Cette niche comprend également des mégacaryocytes sécrétant du CXCL4 à proximité des HSC (de Sánchez-Lanzas et al., 2022).



## Rôle des niches médullaires dans les LAL-T

### Interaction directe par contact cellulaire

**DLL1-DLL4/NOTCH1** : Bien que l'on retrouve des mutations activatrices de NOTCH dans 50% des LAL-T, l'activation extracellulaire de cette voie de signalisation par le microenvironnement peut aider la progression leucémique. En effet, la fixation des ligands principaux de NOTCH1, DLL1 et DLL4, favorise l'expansion leucémique indépendamment du statut mutationnel de NOTCH1 (Armstrong et al., 2009; Minuzzo et al., 2015). De plus, les cellules ostéoblastiques de la MO expriment fortement DLL4 pour induire la production de TSP dans la MO (Yu et al., 2015) ce qui pourrait créer une niche de soutien aux blastes leucémiques via l'activation de la voie NOTCH1. Le séquençage de transcriptome sur cellule unique a montré que les cellules endothéliales de MO expriment fortement DLL1 et DLL4 (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019). Cependant, le rôle de soutien des cellules endothéliales par contact cellulaire direct avec les LAL-T et l'activation de la voie NOTCH n'a pas encore été validé fonctionnellement.

**Niche adipocytaire** : L'interaction directe entre les cellules du microenvironnement tumoral et les blastes de LAL-T peut influencer la progression leucémique, notamment du fait de la composition cellulaire de la MO. Dans certaines conditions, notamment après un traitement chimiothérapeutique, ou avec le vieillissement, la niche médullaire peut être enrichie en adipocytes (J B Vogler and Murphy, 1988). Il apparaît qu'une MO riche en adipocytes induit un état particulier aux blastes leucémiques. Chez la souris, la composition de la MO des vertèbres caudales est fortement enrichie en adipocytes (MO dite "jaune"). En récupérant les blastes leucémiques logés dans la MO de ces vertèbres caudales, il s'est avéré que cette niche riche en adipocytes confère un phénotype particulier aux blastes leucémiques avec une modification de l'expression de marqueurs de surface, comme une augmentation de l'expression de la protéine CD44, ainsi qu'un arrêt de la progression du cycle cellulaire (accumulation en phase G0 du cycle cellulaire) les rendant quiescentes. Cette quiescence favorise la résistance aux molécules utilisées en chimiothérapie et donc un avantage de survie des blastes face aux traitements dans ce microenvironnement adipocytaire (Cahu et al., 2017). Cependant, la nature de cette empreinte du microenvironnement sur les blastes leucémiques ainsi que le risque de rechute qu'elle induit restent encore à définir pour déchiffrer de nouveaux mécanismes impliqués dans la chimiorésistance.

## Interaction avec les facteurs solubles

De la même façon, l'étude du dialogue entre les molécules sécrétées par la niche médullaire et la LAL-T est primordiale afin de comprendre les mécanismes de régulation de cette hémopathie. Plusieurs axes de signalisation ont fait l'objet d'études intenses grâce à l'utilisation de modèle murins de LAL-T, de PDX ou en culture cellulaire *ex vivo*.

**CXCL12/CXCR4** : En effet, l'axe CXCR4/CXCL12 (aussi nommée SDF-1) joue un rôle majeur dans le chimiotactisme et le maintien des blastes leucémiques dans la MO. Deux études publiées simultanément montrent que CXCL12, sécrété dans la MO par les CAR ou les cellules endothéliales, promeut le maintien et le soutien du développement leucémique. Inhiber expérimentalement cet axe empêche le nichage des blastes leucémiques dans la MO diminuant ainsi la charge tumorale médullaire et améliorant la survie des souris (Passaro et al., 2015; Pitt et al., 2015). Pour montrer que cette interaction est spécifique, les chercheurs ont utilisé une petite molécule antagoniste spécifique du récepteur CXCR4, l'AMD3465 similaire à l'AMD3100 utilisée en clinique pour mobiliser les cellules CSH de la MO dans la circulation de donneurs de CSH (Laroche et al., 2006). La molécule peut ainsi être repositionnée et donner de nouvelles pistes thérapeutiques de traitements des LAL-T.

**IL-7/IL-7R** : Une voie de signalisation majeure qui soutient la progression leucémique est la voie de signalisation IL7/IL7R. Cette voie de signalisation est primordiale pour la lymphopoïèse T normale dans le thymus (Mazzucchelli and Durum, 2007) et peut être mutée dans les LAL-T induisant une sur-activation de la voie et la prolifération des cellules (Oliveira et al., 2022). Les cellules stromales de la MO comme les cellules stromales du thymus peuvent sécréter de l'IL-7 et il a été montré que les blastes leucémiques qui exprimaient l'IL7R étaient sensibles à l'IL-7 sécrété dans le microenvironnement (Ballesteros-Arias et al., 2019; Barata et al., 2001; González-García et al., 2019; Silva et al., 2011). Cette cytokine est sécrétée dans la MO par les CSM (Baryawno et al., 2019; Tikhonova et al., 2019). Bien que le soutien apporté par cette voie sur la progression des LAL-T ait été démontré dans le thymus, il existe une récurrence de son activation en fonction du microenvironnement étudié. Par ailleurs, les cellules de LAL-T peuvent également être à l'origine de sécrétion d'IL7 et par activité autocrine, induire leur propre prolifération (Buffière et al., 2019).

**IL-18/IL-18R** : Il a été démontré que la cytokine pro-inflammatoire Interleukine 18 (IL-18) sécrétée par les cellules stromales de MO joue un rôle pro-prolifératif sur les blastes de LAL-T.

En effet, plusieurs techniques *ex vivo* et *in vivo* ont permis de confirmer le rôle de cette interleukine. Les cellules leucémiques co-cultivées avec le stroma MS5 dans lequel on a aboli l'expression de l'IL-18 par ARN interférence ont une croissance diminuée par rapport à un stroma contrôle non modifié. De même, en injectant les blastes leucémiques avec une expression diminuée pour le récepteur à l'IL-18 (l'IL18-R $\alpha$ ) en souris immunodéficientes on observe un décalage dans le temps de la progression leucémique accompagnée d'une amélioration significative de la survie des souris leucémiques démontrant ainsi l'importance de cette molécule sécrétée par le microenvironnement sur la progression leucémique (Uzan et al., 2014).

### Rôle des contraintes biophysiques du microenvironnement

L'étude du microenvironnement leucémique prend également en compte l'effet des contraintes biophysique du microenvironnement dans lequel elles évoluent et notamment les concentrations en oxygène. Les niches leucémiques ont des concentrations physiologiques très basses en O<sub>2</sub> entre 1 à 6% dans la MO et entre 0,2 à 3% dans le thymus (Chow et al., 2001; Hale et al., 2002). Or l'**hypoxie** induit l'état de quiescence des blastes de LAL-T via l'inhibition de la voie mTORC1 par HIF1 $\alpha$ , favorisant ainsi une chimiorésistance notamment à la vincristine (Fahy et al., 2021a). L'hypoxie induite par le microenvironnement dans lesquelles les LAL-T évoluent peut donc induire la chimiorésistance des blastes de LAL-T et promouvoir les risques de rechute.

### Impact de la LAL-T sur le tissu médullaire sain

Les exemples précédemment cités montrent que la niche médullaire peut impacter la LAL-T par contact cellulaire direct ou par activation paracrine. Cependant, le microenvironnement médullaire est également fortement impacté par la leucémie. Plusieurs études montrent l'impact des leucémies sur le microenvironnement médullaire notamment dans les LAL-B et les LAM (Battula et al., 2017; Krause and Scadden, 2015; Kumar et al., 2018; Méndez-Ferrer et al., 2020) et l'influence qu'elles peuvent avoir sur l'hématopoïèse normale. La même question a été adressée dans le cadre des LAL-T, et il s'avère qu'une signalisation NOTCH aberrante dans la MO perturbe le soutien que les ostéoblastes prodiguent aux CSH (Wang et al., 2016). Il a également été démontré que les blastes de LAL (B et T) humains sécrètent des vésicules extracellulaires contenant l'HSP70, une protéine chaperonne qui en retour induit l'épuisement des CSH murines *in vivo* et compromet la quiescence des CSH

murines *ex vivo*. Malgré ces quelques études sur l'impact de la LAL-T sur le microenvironnement de la MO, il reste des interrogations concernant l'impact la leucémie sur les cellules de l'environnement médullaire qui mériteraient de plus amples recherches.

#### *v. Le microenvironnement de la rate*

La rate est le plus gros organe lymphoïde secondaire entouré d'une capsule rigide situé sous le diaphragme et connecté à l'estomac. L'un de ces rôles est de filtrer et recycler par phagocytose les globules rouges non fonctionnels dans la structure anatomique appelée pulpe rouge et son autre rôle est la maturation de lymphocytes B et T dans la pulpe blanche (Den Haan et al., 2012; Mebius and Kraal, 2005).

#### Composition cellulaire de la rate

Cet organe jouant un rôle primordial dans la maturation des Lymphocytes B et T, on y retrouve de nombreuses cellules hématopoïétiques, y compris des cellules myéloïdes et notamment des cellules présentatrices d'antigènes. Au sein des leucocytes, on retrouve par analyse en cytométrie de flux des neutrophiles (5-20%), des monocytes (1-5%), des cellules dendritiques (0.4%), des macrophages (0.2%), des Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (15-20%), des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (10-15%), des lymphocytes B (30-40%), des Natural killers (5-10%) et Natural killer T (1-5%) et une très faible quantité des CSH (moins de 0.1%). On retrouve également 80% globules rouges matures et 1% de réticulocytes parmi les splénocytes totaux du fait du rôle de filtration des globules rouges de la rate (Gualdrón-López et al., 2021). En plus des cellules hématopoïétiques, la rate est composée d'un ensemble complexe de cellules stromales comme des cellules fibroblastiques réticulaires, et les cellules réticulaires marginales qui maintiennent les structures fonctionnelles tridimensionnelles de la rate et les cellules endothéliales composant la paroi des vaisseaux permettant notamment la circulation des cellules hématopoïétiques (Den Haan et al., 2012).

#### Rôle de la niche de la rate dans les LAL-T

##### *Interactions par contact cellulaire*

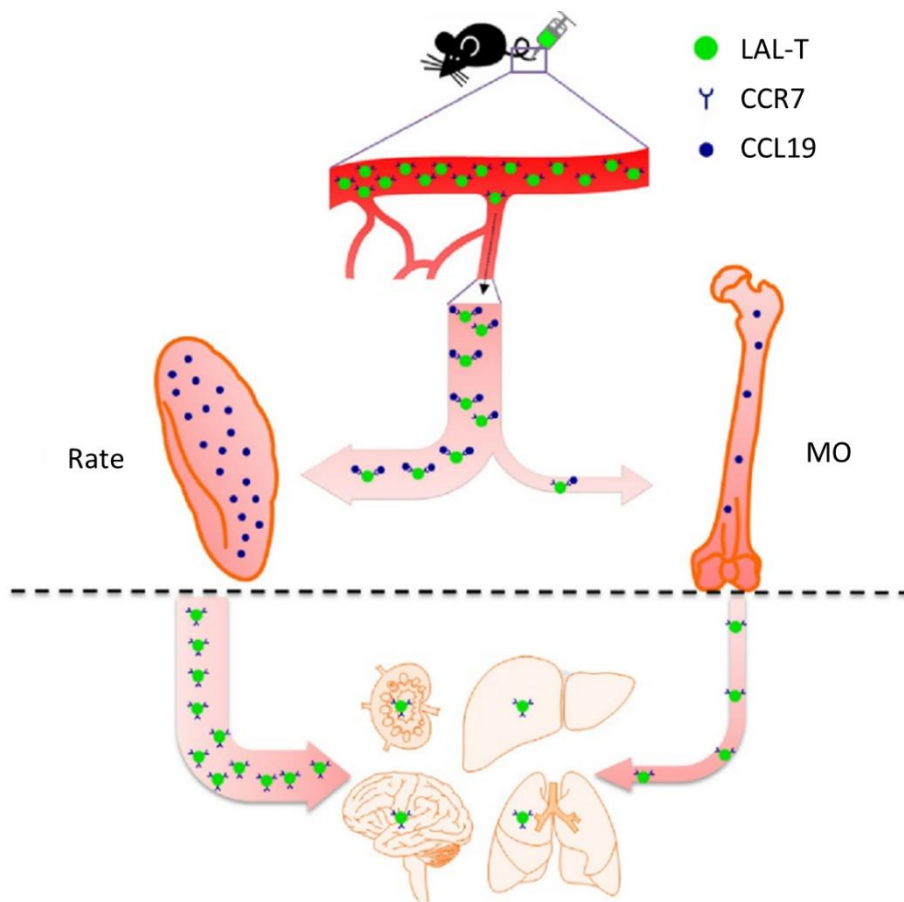
**Les cellules myéloïdes :** Il a précédemment été démontré que les cellules dendritiques du thymus jouaient un rôle de support dans la progression des LAL-T notamment grâce à la sécrétion d'IGF1 induisant la prolifération des blastes (Triplett et al., 2016). Il s'est alors posé la question du support des autres cellules myéloïdes. Contrairement au thymus qui ne contient principalement que des cellules dendritiques pour le versant myéloïde, la rate en comprend un

plus grand nombre. Lyu et collègues se sont donc penchés sur le rôle de ces cellules et ont remarqué que la coculture de blastes leucémiques et de cellules myéloïdes de la rate favorisait fortement la croissance cellulaire. Par ailleurs, en éliminant les cellules phagocytaires de façon systémique grâce à l'injection de liposomes de clodronate, la progression leucémique est fortement réduite (Lyu et al., 2020). Ils détaillent ensuite les mécanismes par lesquels les cellules myéloïdes soutiennent les blastes leucémiques en identifiant l'activation de la voie IGF1/IGF1R dans les blastes leucémiques en contact avec les cellules myéloïdes. En 2022, cette même équipe s'est intéressée plus précisément sur les mécanismes d'activation des blastes leucémiques par les cellules myéloïdes et ont identifié qu'en plus du support par la voie IGF1/IGF1R, les cellules myéloïdes favorisaient la croissance des cellules leucémiques par interaction directe via la voie des intégrines (Lyu et al., 2022).

#### Interactions avec les facteurs solubles

**CCL19-CCL21/CCR7** : Le microenvironnement de la rate est à l'origine de la sécrétion de cytokines et chimiokines. Les cellules dendritiques de la rate sécrètent du CXC-chemokine ligand 13 (CXCL13), une chimiokine se fixant sur le CXC-Receptor 5 (CXCR5) à la surface des lymphocytes B, et les cellules stromales produisent du CCL19 et du CCL21, qui se fixent sur le récepteur CCR7 à la surface des lymphocytes T. En condition physiologique, ces productions permettent le recrutement, l'activation et la maturation des lymphocytes. Il a été identifié que l'expression de CCR7 est augmentée en réponse à la signalisation NOTCH dans les LAL-T (Buonamici et al., 2009). Ainsi, l'augmentation de l'expression de ce récepteur sensibilise les blastes leucémiques au rôle chimiotactique des ligands sécrétés notamment CCL19. Cette signalisation favorise le nichage des blastes de LAL-T dans la rate, qui en retour augmente la sécrétion de CCL19. Cette signalisation recrute de plus en plus de blastes leucémiques CCR7 exprimant le CCR7. De plus, les blastes de LAL-T cocultivés en présence de cellules du microenvironnement de la rate ont des capacités de mobilisation accrues en test de mobilisation en chambre de culture transwell comparé aux blastes cultivés en présence de cellules de la MO. De surcroît, les souris secondaires injectées avec des blastes issus de la MO montrent un délai survie comparé aux cellules injectées avec les blastes de la rate. L'étude conclue que le microenvironnement de la rate promeut la prolifération des blastes de LAL-T, induit leur expression de CCR7, favorise leur capacité de migration et supporte l'agressivité de la LAL-T (Ma et al., 2014).

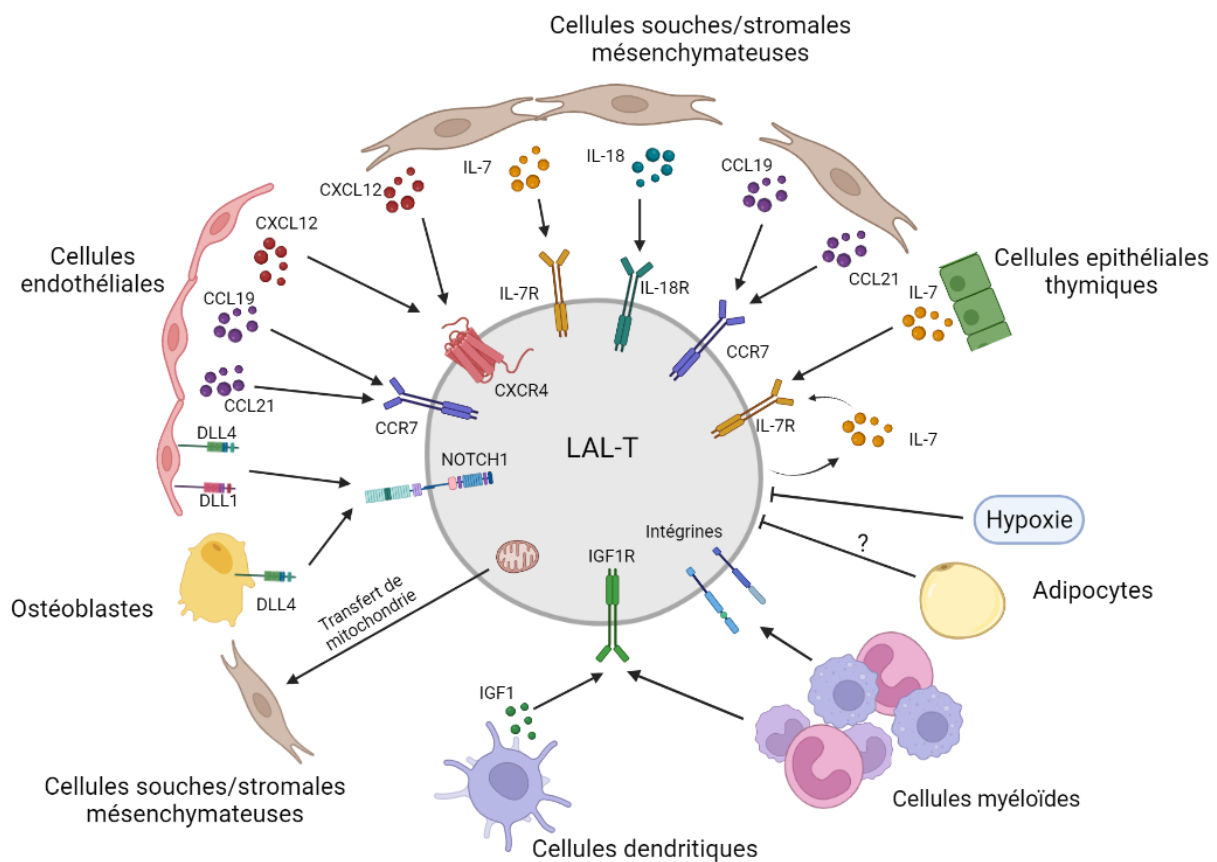
Par ailleurs il a également été démontré que la sécrétion de CCL19 et CCL21 par les cellules endothéliales du système nerveux central favorisait l'adressage des blastes vers cette niche (Buonamici et al., 2009). Les atteintes au système nerveux central sont observées dans 10% des cas de LAL-T (Marks et al., 2009) et leur pronostic sont particulièrement défavorables (Lazarus et al., 2006). Ainsi, cibler cet axe de signalisation dépendant de l'expression de CCR7 à la surface des blastes leucémiques représente une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement des LAL-T.



**Figure 11 :** Rôle de la signalisation la signalisation CCL19/CCR7 dans les modèles syngéniques de LAL-T. La rate sécrète en grande quantité la chimiokine CCL19 capable d'attirer les blastes de LAL-T en se fixant à leur récepteur CCR7. Ce recrutement de cellules leucémique favorise la sécrétion de CCL19 par le microenvironnement de la rate et les blastes issus de cet organe ont des capacités de migration supérieures aux blastes provenant de la MO. Grâce à cette signalisation, la rate constitue un réservoir de blastes leucémiques avec des capacités accrues de mobilisation favorisant l'agressivité leucémique (de Ma et al, 2014).

vi. Conclusion sur les interactions LAL-T et microenvironnements

Les microenvironnements interagissant avec les blastes de LAL-T sont multiples et l'ensemble des interactions qui peuvent impacter la progression leucémique est très complexe (Figure 12), notamment selon l'organe envahi par la leucémie. Même au sein d'un organe donné, il peut exister différentes niches (Cahu et al., 2017; Calvo et al., 2019). L'identification des interactions LAL-T et microenvironnements pourrait permettre de découvrir de nouvelles voies qui peuvent être ciblées en thérapie.



**Figure 12 :** Schéma récapitulatif des interactions entre les acteurs cellulaires et moléculaires du microenvironnement et des LAL-T (adapté de Armstrong et al., 2009; Ballesteros-Arias et al., 2019; Barata et al., 2001; Baryawno et al., 2019 ; Buffière et al., 2019 ; Buonamici et al., 2009; Cahu et al., 2017; Fahy et al., 2021; González-García et al., 2019; Lyu et al., 2020-2022; Ma et al., 2014; Minuzzo et al., 2015; Passaro et al., 2015; Pitt et al., 2015; Scupoli et al., 2003; Silva et al., 2011; Tikhonova et al., 2019; Triplett et al., 2016; Uzan et al., 2014; Wang et al., 2018; Yu et al., 2015).

## 5. Les modèles d'étude des LAL-T

Il existe plusieurs moyens d'étudier les LAL-T et souvent le modèle d'étude dépend de la question posée et de la disponibilité du matériel biologique. Pour se rapprocher le plus possible de la réalité physiologique, l'utilisation d'échantillons primaires de patients est conseillée. De plus, il existe une variabilité d'origine des cellules de LAL-T au sein d'un même patient : il peut s'agir généralement de cellules issues de sang périphérique, ou de prélèvement de MO. Ces cellules peuvent être prélevées au moment du diagnostic, après le traitement ou lors de la rechute. Pour étudier l'interaction entre les cellules de patients et le microenvironnement, plusieurs options sont envisageables : les blastes leucémiques peuvent être cultivés *in vitro* dans un milieu approprié avec ou sans la présence d'un stroma capable d'interagir avec les blastes par contact direct ou de façon paracrine. Dans un second temps, si la question du rôle du microenvironnement leucémique est plus complexe et a besoin de l'ensemble des cellules des microenvironnements, il est encore actuellement d'usage d'utiliser des modèles murins.

### *i. Utilisation d'échantillons primaires de patients*

#### Modèles de souris immunodéficientes et PDX (Patient Derived Xenograft)

Avant d'étudier l'hématopoïèse maligne, les chercheurs se sont concentrés sur l'étude de l'hématopoïèse humaine non pathologique et sur l'identification la plus précise des CSH en mettant à l'épreuve leur capacité d'auto renouvellement et d'hématopoïèse à long terme. Après 20 ans de recherche, le modèle de référence pour l'étude de l'hématopoïèse humaine utilise des souris immunodéficientes **NSG** (Non Obese Diabetic / Severe Combined ImmunoDeficiency /  $\gamma$  chain receptor of IL-2), ayant subi une myéloablation (irradiation, busulfan), transplantées par des cellules CD34+, contenant des CSH et des CPH, de diverses origines (sang de cordon, MO, produit de cytophérèse, etc...) ce qui a permis de mieux caractériser les CSH humaines (Doulatov et al., 2012). Le fond génétique **NOD/ShiLtJ** (pour Non Obese Diabetic) comprends des mutations caractéristiques du diabète de type 1 auto-immun conduisant à la diminution du système immunitaire innée avec la perte du système hémolytique du complément, une réduction de l'activité des cellules dendritiques et des macrophages (Shultz et al., 1995). La mutation **Prkdc<sup>SCID</sup>** plus connue sous le nom "SCID" (pour Severe Combined Immunodeficiency ou Immunodéficiencie Combinée Sévère). Le gène Prkdc muté dans ce modèle code la sous-unité catalytique de la DNA-PK qui participe à l'activité ligase



de l'ADN nécessaire au cours de la réparation des cassures double-brin de type NHEJ. Dans les lymphocytes en formation, l'activité de la DNA-PK est cruciale pour le succès de la recombinaison V(D)J (Kirchgessner et al., 1995). Cette mutation entraîne une déficience totale en lymphocytes B et T, du fait de réarrangements Ig/TCR non productifs, et une sensibilité augmentée aux irradiations (Bosma et al., 1983; Fulop and Phillips, 1990). Cependant, le modèle souffre de fuite et la déficience en lymphocytes T n'est pas toujours totale dans certaines souris, entraînant des rejets de greffon ou des transformations leucémiques T (Shultz et al., 1995). Ce problème a été résolu grâce à l'ajout de la mutation **Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>** ou l'abolition de son expression par technique génétique ("knock-out"), supprime la chaîne commune gamma du récepteur à l'IL-2, abroge l'activité de ce récepteur impliqué dans la maturation des lymphocytes T, NK et NKT, qui contribuent à la réponse immunitaire dirigée contre les cellules du « non soi » (Ito et al., 2002; Shultz et al., 2005). Il est donc possible de greffer un système hématopoïétique humain normal et/ou des cellules humaines pathologiques (leucémies, entre autre) dans ces souris immunodéficientes ; on nomme ces expériences de transplantation inter-espèce "xénogreffes" et l'injection de cellules de patients permet d'obtenir des « Patient-Derived Xenograft » (PDX).

Ces modèles permettent d'étudier différents axes de l'hématopoïèse pathologique, comme les mécanismes moléculaires et cellulaires de la leucémogénèse, de tester l'effet de nouvelles molécules anticancéreuses, ou d'étudier le rôle de différents microenvironnements. Les premiers résultats significatifs de développement de cellules hématopoïétiques humaines en modèle PDX réalisés avec des échantillons primaires, nécessitaient notamment avec l'injection de cytokines humaines pour stimuler les cellules injectées (IL-3, GM-CSF et SCF) (Kamel-Reid and Dick, 1988; Lapidot et al., 1992).

Ces résultats ont posé la base des PDX, montrant que des cellules primaires de patients peuvent être injectées par voie intraveineuse, ou par injection intra-os/fémorale (Mazurier et al., 2003). Ces modèles ont été adaptés pour greffer des échantillons primaires de LAL-T (Armstrong et al., 2009). Toutefois, toutes les LAL-T ne progressent pas à la même vitesse, voire ne se greffent pas dans l'environnement des souris immunodéficientes. On observe notamment que les LAL-T à phénotype immature se développent moins rapidement que les LAL-T à phénotype plus mature. Par ailleurs, la vitesse de progression des LAL-T est souvent associée avec l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Poglio et al., 2015).

## Modèles de souris dites "humanisées"

### Modèles murins de sécrétion de cytokines et facteurs de croissance humains en modèles murins

Comme décrit dans la partie rôle du microenvironnement, la signalisation par l'interaction entre les cytokines et leur récepteur peut jouer un rôle primordial dans la leucémogénèse. Cependant, pour les modèles de xénogreffe, étant donné qu'il s'agit d'un modèle chimère entre des cellules humaines et un organisme receveur murin, on s'attend à ce que l'ensemble de la signalisation ne soit pas active. En effet, certaines cytokines sécrétées par la souris peuvent par réactivité croisée se fixer sur le récepteur humain des cellules injectées dû à des homologies entre les 2 espèces mammifères. Cependant, certains facteurs de souris ne sont pas actifs sur les cellules humaines. Les souris immunodéficientes ont donc été génétiquement améliorées pour exprimer des cytokines humaines, comme la Trombopoïétine (TPO) (Rongvaux et al., 2011), ou le SCF « Stem Cell Factor » combiné à l'Interleukine 3 (IL-3), et le GM-CSF « Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor » qui permettent de mieux mimer l'environnement humain en modèle murin (Wunderlich et al., 2018).

### Reconstruction de niches hématopoïétiques humaines médullaires *in vivo*

Pour modéliser le microenvironnement médullaire humain plus proche de la réalité physiologique, les chercheurs se sont concentrés à recréer une niche médullaire humaine dans la souris. Pour ce faire, ils ont isolé des CSM de donneurs sains ou de patients, et les ont injectées par voie sous cutanée avec un substrat semi liquide (matrigel) enrichi en facteurs de croissance dont des facteurs de croissance ostéogéniques. L'injection des CSM induit la formation de mini-os sous la peau de souris appelés « **ossicules** ». Les chercheurs ont ensuite injecté par voie intraveineuse des progéniteurs hématopoïétiques humains ou des blastes de LAM et ont observé que ces ossicules forment une niche hématopoïétique vascularisée, ayant une structure typique de MO humaine, dans laquelle une hématopoïèse humaine normale ou pathologique peut se développer (Reinisch et al., 2016). Cette technique permet de modéliser la niche hématopoïétique médullaire humaine et d'y modifier l'expression de gènes. En modifiant le gène souhaité dans les CSM originales avant la formation des ossicules, on peut modéliser l'impact que la modification de l'expression de ce gène dans le microenvironnement peut avoir sur l'hématopoïèse normale ou dans notre cas, l'expansion leucémique de LAL-T.

## ii. Utilisation de modèles de LAL-T murines

### Modèles génétiques de LAL-T de novo

Il est possible de modifier génétiquement des souris immunocompétentes pour qu'elles expriment les oncogènes souhaités dans des populations cellulaires d'intérêt afin qu'elles développent une LAL-T de novo sans nécessité de greffe cellulaire. Par exemple, il est bien connu que les facteurs de transcription peuvent collaborer dans les mécanismes oncogéniques des LAL-T. Le croisement de modèles murins transgéniques pour les FT TAL1 (pSil-TSCL (SCL<sup>tg</sup>) (Aplan et al., 1997) et LMO1 (Lck-LMO1<sup>tg</sup>) (McGuire et al., 1992) permettent d'obtenir des souris exprimant 2 oncogènes dans des cellules hématopoïétiques, ce qui induit une leucémogénèse T murine (Tremblay et al., 2010). Les blastes leucémiques peuvent être ensuite transplantés en souris C57BL/6 pour étudier la LAL-T dans des receveurs syngéniques ou congéniques. D'autres oncogènes que TAL1 et LMO2/LMO1, peuvent être exprimés pour générer des LAL-T *de novo* en modèle murin, notamment les modèles de surexpression de la protéine TLX1 sous contrôle du promoteur *Lck* dans les progéniteurs T murins (De Keersmaecker et al., 2010) et d'autres mutations comme le KO de la protéine IKAROS suppresseur de tumeur dans la lymphopoïèse T, permettant notamment d'étudier les mécanismes oncogéniques associés aux protéines de la famille NOTCH dans les LAL-T (Dumortier et al., 2006; Jeannet et al., 2010). Pareillement, une autre fusion oncogénique identifiée chez les patients LAL-T TEL-JAK2 induit une LAL-T lorsque son expression est introduite dans les souris sous contrôle du promoteur/enhancer lymphoïde E $\mu$ SR $\alpha$  (Carron et al., 2000; Takebe et al., 1988).

### Modèles syngéniques murins de LAL-T

Certaines problématiques de recherche requièrent que l'espèce receveuse ait un système immunitaire intact, notamment dans le cadre de l'étude de la réaction immunitaire ou inflammatoire. Dans ce cas, l'utilisation de modèles immunodéficients n'est pas adaptée à la question et l'utilisation de modèles syngéniques de LAL-T sera préférée. Par exemple, l'équipe du docteur Warren S. Pear a élaboré un modèle de LAL-T murine avec une activation constitutive de la voie NOTCH, grâce à la transduction de progéniteurs hématopoïétiques ou lymphocytaires T de souris C57BL/6 avec un rétrovirus portant les séquences codantes de la forme tronquée et constitutivement active de *Notch1*, appelée ICN1 (Pui et al., 1999). Ces cellules après transduction peuvent être injectées en souris receveuses immunocompétentes

à fond génétique identique, dans lesquelles elles vont développer une LAL-T sans être rejetées par le système immunitaire. Ces blastes leucémiques peuvent également être maintenus en co-culture avec un support stromal murin approprié (Catherinet et al., 2021).

### iii. *Modèles d'études in vitro de LAL-T*

Les LAL-T primaires (murines et humaines) peuvent être maintenues en culture *in vitro*. Cette croissance est favorisée par la présence de cellules stromales médullaires. Ce support va pouvoir par la sécrétion de facteurs soluble ou par contact direct avec les LAL-T supporter les cellules leucémiques et favoriser leur croissance.

Par exemple, on sait que par la sécrétion d'IL-7, les cellules de l'épithélium de thymus (TEC) support la lymphopoïèse T, ainsi que les LAL-T *in vivo*. Scupoli et collègues ont montré que l'on pouvait utiliser les TEC comme stroma cellulaire pour soutenir la croissance de cellules primaires de LAL-T de patients (Scupoli et al., 2003). La présence de cellules dendritiques a le même effet sur la croissance des cellules leucémiques *in vitro* notamment grâce à l'IGF1 sécrété par les cellules dendritiques (Triplett et al., 2016).

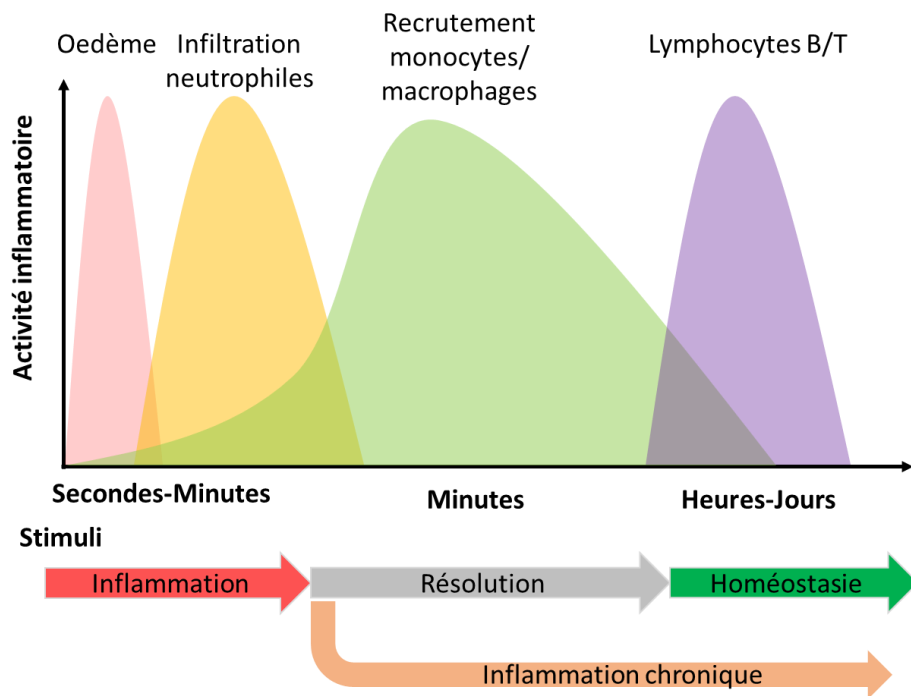
Les cellules stromales présentes dans le thymus et la MO jouent un rôle de soutien dans le développement des LAL-T notamment de par la sécrétion de CXCL12 activant le récepteur CXCR4 à la surface des blastes leucémiques ou de par la sécrétion d'IL-18 en se fixant à son récepteur. Ainsi, il est possible d'utiliser des lignées cellulaires stromales humaines (Human Stromal 5, **HS5**), ou murines (Murine Stromal 5, **MS5**) afin d'étudier les interactions entre les LAL-T et le microenvironnement. Par exemple, le laboratoire d'encadrement de ma thèse a induit la surexpression de DL1 humain, un des ligands de NOTCH1, à la surface de cellules MS5 (lignée appelée MS5-DL1). Cette surexpression de DL1 a induit une activation de la voie dans les blastes leucémiques de patients favorisant leur croissance *in vitro*, ce qui a permis de confirmer le rôle de cette voie dans la croissance/propagation leucémique et proposer un modèle intéressant d'étude des LAL-T (Armstrong et al., 2009). De plus, en prenant avantage des découvertes faites sur le rôle des molécules sécrétées dans le microenvironnement, il est possible voire nécessaire d'ajouter des cytokines et facteurs de croissance comme IL-7, l'insuline, le SCF (Stem Cell Factor) ou le FLT3L pour la culture cellulaire de LAL-T (Armstrong et al., 2009; Cahu et al., 2017).

## B. Le microenvironnement inflammatoire

### 1. Généralités

L'inflammation est la réponse rapide et robuste du système immunitaire qui sert de mécanisme de défense en réponse aux stimuli provenant de molécules du « soi » (lésions tissulaires, cancers) ou du « non soi » (infection bactérienne, virale, ou composés toxiques...) pour limiter la progression d'un pathogène, minimiser les dommages physiques et stimuler la réparation des tissus. La réponse inflammatoire se caractérise par 2 parties majeures : l'étape d'inflammation et l'étape de résolution (Figure 13). La phase inflammatoire est définie par l'ensemble des réactions cellulaires et moléculaires permettant de contenir et d'éliminer l'agent infectieux. Cette réaction est caractérisée par 4 signes cliniques incluant la douleur, la chaleur, le rougissement et le gonflement conduisant à la formation d'un œdème. Ces signes cliniques résultent de la réponse vasculaire caractérisée par une augmentation de la perméabilisation des vaisseaux et l'augmentation de l'afflux sanguin caractéristique de l'œdème. Cette réaction favorise une réponse inflammatoire locale, puis systémique grâce au recrutement de cellules immunitaires en réponse à la signalisation moléculaire pathologique. Ces cellules immunitaires sont responsables de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires nécessaires à l'élimination du pathogène. Une fois l'ensemble des agents pathogènes éliminés, l'arrêt de la phase inflammatoire est indispensable pour retourner à un état homéostatique. Si cette phase de résolution n'est pas accomplie, elle conduit à une inflammation chronique qui peut être à l'origine de différentes pathologies comme des maladies auto-immunes ou contribuer à l'apparition de cancers (Deng et al., 2016; Pikarsky et al., 2004) (Figure 13). En résumé, la réaction inflammatoire est une réaction biologique naturelle de protection de l'intégrité tissulaire indispensable à la survie qui peut être à l'origine de pathologie lorsqu'elle n'est pas précisément régulée dans l'organisme.

En effet, Les cliniciens ont identifié que la présence de tumeurs s'accompagne souvent d'une inflammation (Balkwill and Mantovani, 2001). Qu'elle soit à l'origine ou en réponse à la tumorigénèse, l'inflammation dans les cancers peut favoriser la prolifération des cellules tumorales et leur dissémination (Greten and Grivennikov, 2019; Liu et al., 2015). Cependant, l'impact du microenvironnement inflammatoire a été identifié au cours du développement de tumeurs solides et l'invasion du microenvironnement tumoral par les cellules immunitaires



**Figure 13 :** Intensité de l'activité inflammatoire en fonction du temps et du recrutement des populations immunitaires. La première étape de l'inflammation est caractérisée par la formation d'un œdème en réponse à une stimulation. Les cellules immunitaires innées vont rapidement infiltrer le site inflammatoire en commençant par les neutrophiles qui vont phagocyter les cellules infectées ou de pathogènes puis entrer en apoptose. Les corps apoptotiques vont être phagocytés par les macrophages, recrutés par les signaux inflammatoires. Ces macrophages vont ensuite initier la phase de résolution en sécrétant des molécules pro-résolutives. Vient ensuite le recrutement de cellules pro-résolutives et de cellules mémoires du système immunitaire adaptatif. Si l'inflammation aiguë n'est pas résolue, la phase inflammatoire se changera en inflammation chronique qui peut être à l'origine de différentes pathologies (adapté de Serhan et al., 2005 ; Serhan, 2014 et Fullerton et al., 2016).

peut être bénéfique ou néfaste pour la progression tumorale en fonction des cellules immunitaires du microenvironnement et du type cellulaire cancéreux (voir paragraphe sur la description des populations cellulaires immunitaires). La leucémogénèse est différente, notamment par la nature des cellules tumorales et par les niches dans lesquelles elles évoluent. Il se pose donc la question de l'existence et du rôle la réponse inflammatoire suite à la progression leucémique et de son impact sur cette progression. Pour étudier ces interactions, il est important de définir les acteurs qui peuvent contribuer à l'inflammation dans le microenvironnement leucémique.

## 2. Rôles des cellules immunitaires myéloïdes dans l'inflammation et dans les cancers

Les cellules qui interviennent en premier sur le site de l'inflammation sont les cellules immunitaires innées comme les monocytes ou les granulocytes neutrophiles. Le recrutement des cellules immunitaires innées est facilité grâce à la sécrétion de d'histamines, prostaglandines et leucotriènes par les cellules impactées qui activent les cellules endothéliales favorisant ainsi la vasodilatation. Les cellules immunitaires sont recrutées par les cellules résidentes comme les macrophages résidents ou les cellules non immunitaires endommagées qui sécrètent des molécules inflammatoires. Les cellules immunitaires innées expriment à leur surface les PRR « Pattern Recognition Receptors » qui leur permettent de reconnaître les signaux moléculaires associés au danger issus du soi en détectant les DAMPs « Damage Associated Molecular Patterns » ou du non soi en détectant les PAMPs « Pathogene Associated Molecular Patterns » (Jeannin et al., 2008; Takeuchi and Akira, 2010).

Les DAMPS sont des molécules issues de la dégradation des cellules du soi qui peuvent être reconnues par les PRR. Dans les cancers, on retrouve dans ce groupe l'HMGB1 (High group box 1 protein), les HSP (Heat shock protein) ou encore l'ATP (Adenosine triphosphate) qui vont activer les cellules immunitaires comme les cellules dendritiques via les PRR (Abu et al., 2021). Les PAMPs sont des molécules issues de pathogènes comprenant notamment les acides nucléiques microbiens ou les LPS « Lipopolysaccharides ». Les PRR comme les TLR « Toll Like Receptors » ou les CLR « C type Lectin Receptors » sont des récepteurs transmembranaires. Leur l'activation induit la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire notamment par la voie NF- $\kappa$ B, conduisant à la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires à l'origine de l'amplification de la réaction immunitaire (Takeuchi and Akira, 2010). La régulation de ces signalisations est primordiale pour générer une réaction inflammatoire transitoire pouvant être résolue. Les mutations dans les PRR ou modifiant l'expression de leurs ligands peuvent conduire à une réaction inflammatoire accrue à l'origines de pathologies (maladies auto-immunes, cancers) (de Koning et al., 2012; Nagi et al., 2014).

Les tumeurs solides sont souvent envahie par les cellules immunitaires y compris les cellules myéloïdes qui peuvent créer un environnement immunosuppresseur ou immuno-activateur (Deng and Fleming, 2022). Les cellules myéloïdes comprennent les monocytes, les

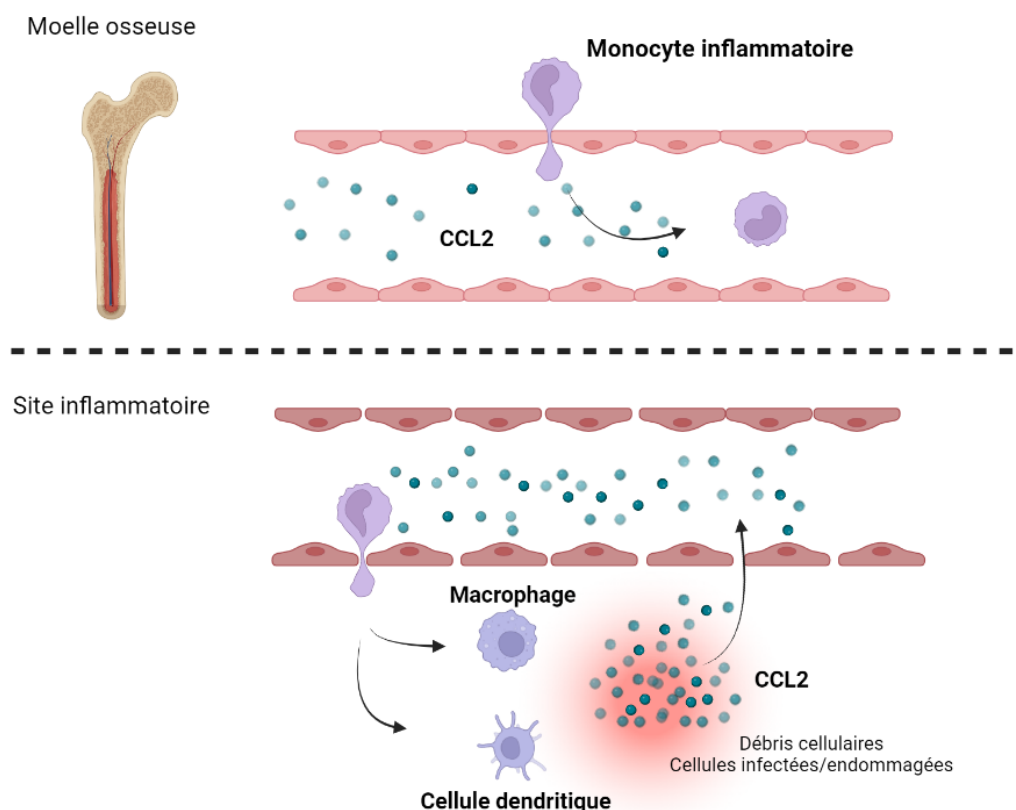
macrophages, les granulocytes et les cellules dendritiques d'origine myéloïde. Leurs rôles dans la réaction inflammatoire immunitaire ainsi dans les cancers sont décrits dans la partie suivante.

### i. *Monocytes*

Les monocytes prennent origine dans la MO, à partir de progéniteurs myéloïdes engagés CMP « Common Myeloid Progenitors » (Akashi et al., 2000) et représentent 2-8% des leucocytes dans la circulation sanguine humaine et 2% chez la souris. Il existe 2 principaux types de monocytes qui remplissent différentes fonctions que l'on peut identifier grâce à l'expression de marqueurs de surface. Comme la majorité des cellules myéloïdes, les 2 types de monocytes expriment le CD11b, mais on peut différencier les monocytes inflammatoires (CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, CD115<sup>+</sup>, CCR2<sup>+</sup>, CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>) des monocytes circulants ou également appelés monocytes résidents ou monocytes non classiques (CD11b<sup>+</sup>, Ly6C<sup>-</sup>, CD115<sup>+</sup>, CCR2<sup>-</sup>, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>) par l'expression de marqueurs de surface, notamment des récepteurs aux chimiokines comme CCR2 et CX3CR1 chez la souris (Geissmann et al., 2003).

Le rôle des monocytes inflammatoires Ly6C<sup>+</sup> est de se rendre sur le site d'infection primaire en réponse aux signaux inflammatoires pour ensuite se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques. Ils participent à la réaction inflammatoire et à la réaction immunitaire antimicrobienne (Geissmann et al., 2003; Serbina et al., 2008). Les signaux majoritairement identifiés dans la signalisation des monocytes inflammatoires sur le site d'infection sont CCL2 et CCL7 (également connu sous le nom de MCP-1 et MCP-3 respectivement, pour monocyte chemoattractant protein 1 et 3) se fixant sur le récepteur CCR2. La chimiokine CCL2 « Chemokine (C-C motif) Ligand 2 » est exprimée par un grand nombre de types cellulaires en réponse à une infection ou à une signalisation inflammatoire facilitant l'adressage des monocytes à de nombreux sites différents (Deshmane et al., 2009) (Figure 14). Si aucune signalisation moléculaire ne les active, les monocytes inflammatoires retournent dans la MO où ils pourront être redifférenciés en monocytes circulants Ly6C<sup>-</sup>, notamment par la régulation de la voie NOTCH activée par l'expression de DLL1 à la surface de cellules endothéliales spécialisées dans la rate et la MO (Gamrekelashvili et al., 2016).





**Figure 14 :** Mécanismes de recrutement des monocytes au cours de l'inflammation. Les monocytes inflammatoires sont produits dans la MO osseuse où ils peuvent être recrutés via la détection de CCL2 pour se retrouver dans la circulation (partie supérieure du schéma). Une fois dans la circulation, les monocytes inflammatoires vont être recrutés vers le site inflammatoire via la signalisation de CCL2 où ils vont pouvoir se différencier en macrophages ou cellules dendritiques pour phagocyter les cellules du tissu endommagé (partie inférieure) (adapté de Serbina et al., 2008).

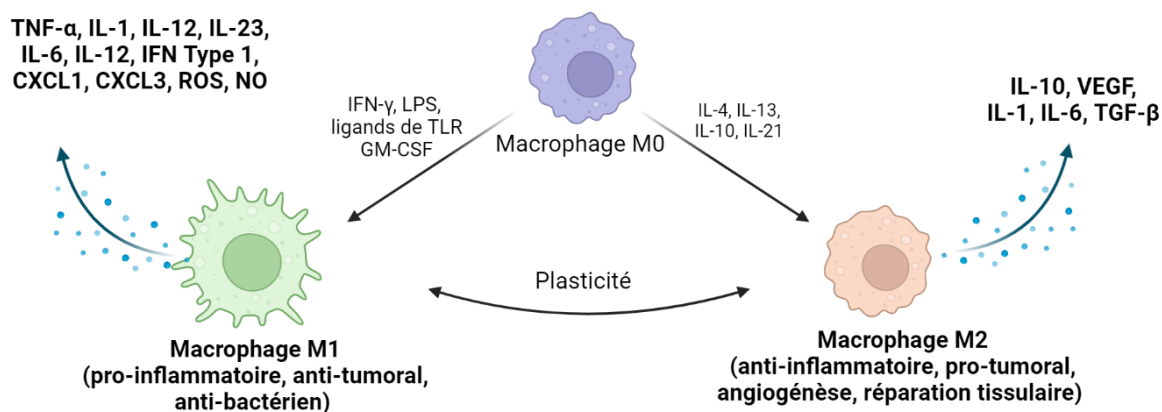
Bien que l'un des rôles des monocytes résidents  $Ly6C^-$  soit d'infiltrer les tissus indépendamment de la signalisation inflammatoire pour reconstituer les cellules dendritiques et les macrophages endommagés pour reconstituer l'homéostasie tissulaire (Nahrendorf et al., 2007), ils peuvent également être recrutés au cours de l'inflammation et participer à la sécrétion de molécules inflammatoires comme le TNF (Tumor Necrosis Factor) et d'autres chimiokines de la famille à motif CC comme CCL6, CCL7 CCL12, CCL22 ou à motif CXC comme CXCL1, CXCL9, CXCL10 et cytokines inflammatoires comme  $IL1-\beta$  (Auffray et al., 2007). Cependant, la signalisation précise de recrutement de ces monocytes vers les sites reste inconnue.

## Rôle des monocytes dans les cancers

Dans les cancers, les monocytes sont majoritairement adressés au microenvironnement tumoral via CCL2 (Qian et al., 2011). Il a également été montré que les monocytes inflammatoires exposés à l'IFN $\alpha$  ou à l'IFN $\gamma$  pouvaient sécréter la protéine TRAIL et induire l'apoptose de cellules cancéreuses (Griffith et al., 1999). Cependant, la principale caractéristique associée aux monocytes est qu'ils vont pouvoir se différencier en macrophages une fois arrivés sur le site tumoral (Macrophages Associés aux Tumeurs) où ils vont favoriser la croissance tumorale grâce à leur capacité immunomodulatrice (voir partie macrophages) (Franklin et al., 2014).

### ii. *Macrophages*

Les macrophages peuvent soit être d'origine foetale et présents dans les tissus pour réguler l'homéostasie tissulaire, soit provenir de l'adressage des monocytes (Epelman et al., 2014). Une fois arrivés sur le site inflammatoire, les monocytes inflammatoires peuvent se différencier en macrophages notamment grâce au « Macrophage- Colony Stimulating Factor » M-CSF (CSF1) qui se fixe au son récepteur CD115 (également CSF1-R) (Ushach and Zlotnik, 2016). Leur premier rôle est la dégradation des débris cellulaires, des cellules apoptotiques ou des pathogènes pour maintenir l'intégrité tissulaire. Les macrophages (comme les cellules dendritiques et les lymphocytes B) sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et peuvent reconnaître les DAMPs et les PAMPs grâce à leurs PRR. Ils présentent ensuite à leur surface, après phagocytose et dégradation des cellules, des antigènes du « non soi » combinés au Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type 2 (CMH2) aux lymphocytes T CD4 dits « helper » qui vont induire la réponse immunitaire humorale par les lymphocytes B, ou l'activation de lymphocytes T CD8 cytotoxiques par la sécrétion d'Interleukine 2 (IL-2). On reconnaît les macrophages murins grâce à l'expression de marqueurs de surface et leur faible granulosité identifiable en cytométrie en flux, Gr1<sup>-</sup>, F4/80<sup>+</sup>, CD115<sup>-</sup> et SSC faible (Chow et al., 2011) mais ils ont une grande versatilité intrinsèque et émettent un large éventail de réponses en fonction de l'organe dans lequel ils se trouvent et des stimuli qui peuvent les activer (Chow et al., 2011; Gordon et al., 2014). Les macrophages ont une plasticité phénotypique et peuvent être réversiblement polarisés en 2 types (M1 et M2) identifiés grâce à des marqueurs de surface, leur profil transcriptomique, et leur activité immunitaire pro ou anti-inflammatoire (Yang et al., 2018). Les macrophages de type M1 sont pro-inflammatoires et expriment CD80, CD86 et



**Figure 15 :** Mécanismes de polarisation des macrophages en type M1 ou M2. Les macrophages vont se polariser préférentiellement en M1 sous l'influence d'une stimulation pro-inflammatoire (LPS, IFN- $\gamma$ , ligands des TLR, GM-CSF) et vont adopter un phénotype pro-inflammatoire. En revanche, l'IL-4, l'IL13, l'IL10 et l'IL21 contribuent à la polarisation des macrophages de type M2 avec un phénotype anti-inflammatoire, favorisant entre autre la réparation tissulaire (adapté de Yunna et al., 2020 ; Wang et al. 2014).

CD16/32, alors que les macrophages de type M2 ont des propriétés anti-inflammatoires et expriment Arg-1 et CD206 (Yunna et al., 2020). La polarisation des macrophages M1 ou M2 est dictée par les signaux du microenvironnement. Les macrophages M1 sont activés par le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou par le Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating factor (GM-CSF) et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. En revanche, la signalisation immunosuppressive de type Th2 caractérisée notamment par la sécrétion d'IL-4, d'IL10 et d'IL-13 polarise les macrophages vers un phénotype de type M2 (Figure 15).

### Rôle des macrophages dans les cancers

Les macrophages représentent la majorité des cellules immunitaires qui envahissent le microenvironnement tumoral. Ce microenvironnement induit un phénotype particulier aux macrophages que l'on appelle alors MAT « Macrophages Associés aux Tumeurs » (ou TAM pour « Tumor Associated Macrophage »). Bien que l'on puisse retrouver des macrophages de type M1 dans le microenvironnement tumoral, la majorité des MAT a un phénotype proche des macrophages M2 (Pan et al., 2020). Ils favorisent l'immunosuppression des cellules cancéreuses et contribuent ainsi à la progression tumorale. Ils participent notamment à l'inhibition du recrutement des lymphocytes T cytotoxiques anti tumoraux et contribuent au processus métastatique en favorisant l'angiogenèse (Qian and Pollard, 2010). Du fait de leur plasticité phénotypique, une partie de la recherche en immunothérapie se concentre sur la réversion du

phénotype M2 des MAT en M1 pour contribuer à l'activité immunitaire anti-tumorale (Pan, 2012).

### iii. *Cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques représentent un groupe hétérogène de cellules immunitaires myéloïdes. Ce sont des CPA et contribuent donc à l'activation du système immunitaire acquis après avoir phagocyté les cellules pathologiques ou les pathogènes. Elles peuvent émerger de différents progéniteurs de la MO comme les cellules dendritiques pré-conventionnelles (pre-cDC) ou des monocytes qui vont migrer vers les organes lymphoïdes comme la rate ou les ganglions lymphatiques, ou vers des tissus non lymphoïdes comme la peau, les poumons ou les intestins via la circulation sanguine (Randolph et al., 2008). Le type majeur de cellule dendritique est appelé les cellules dendritiques conventionnelles (cDC), elles sont d'abord immatures et jouent un rôle de sentinelle et reconnaissent un grand nombre de signaux de danger issus de pathogènes par leur PRR. Contrairement aux macrophages, les cDC une fois activées vont phagocyter les agents pathogènes et exprimer CCR7 ce qui les sensibilise à la signalisation de CCL21 et CCL19. Cette signalisation les adresse vers les organes lymphoïdes comme les ganglions lymphatiques et la rate où les cDC vont pouvoir activer les lymphocytes T naïfs et induire la réponse lymphocytaire (Braun et al., 2011; Gunn et al., 1999). Il existe également un autre type de cellule dendritique, les cellules dendritiques issues de monocytes (moDCs). Comme décrit dans le paragraphe sur les monocytes, les monocytes inflammatoires Ly6C<sup>+</sup> en réponse à la signalisation CCL2 vont migrer vers le site d'inflammation, ils vont ensuite se différencier en moDC et pouvoir induire la réponse Th1 des lymphocytes T helper (León et al., 2007) qui cible les infections bactériennes ou virales. Le troisième type de cellule dendritique est les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui sont retrouvées dans le sang périphérique et sécrètent de l'Interféron de type 1 (IFN-I), primordiale pour l'immunité anti virale. En conclusion, les cellules dendritiques forment l'une des premières lignes de défense en réponse aux infections et sont indispensables à la signalisation immunitaire (Liu et al., 2021).

#### Rôle des cellules dendritiques dans les cancers

Les DC peuvent également être recrutées dans les cancers et jouer un rôle ambivalent sur la progression tumorale (Wylie et al., 2019). L'envahissement du microenvironnement tumoral par les pDC est corrélé avec un mauvais pronostic notamment par l'inhibition de leur sécrétion d'IFN-I, l'activation de la sécrétion de cytokine anti-inflammatoires comme l'IL-10 et

le TGF- $\beta$ , et leur expression de récepteurs de l'inhibition du checkpoint immunitaire comme PD-L1 ce qui inhibe l'activité cytotoxique antitumorale des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Bruchhage et al., 2018; Labidi-Galy et al., 2011; Sisirak et al., 2012). Les cDC sont présentes en faible quantité dans les microenvironnements tumoraux mais leur présence est corrélée avec un bon pronostic (Böttcher et al., 2018; Broz et al., 2014). Elles contribuent à l'activation des Lymphocytes T cytotoxiques et à l'augmentation de leur activité immunitaire antitumorale (Wylie et al., 2015) notamment par la sécrétion de CXCL10 un chemoattractant des lymphocytes T (Spranger et al., 2017). Finalement, la présence et le rôle des moDC dans le microenvironnement tumoral n'est pas bien définie.

#### *iv. Granulocytes neutrophiles*

Bien que les granulocytes neutrophiles soient des cellules myéloïdes à durée de vie courte (entre 6 à 8 heures chez l'Homme et 12.5 heures chez la souris), ils représentent 40 à 60% des leucocytes dans la circulation sanguine chez l'Homme et 10% chez la souris, indiquant une production permanente à partir de progéniteurs médullaires. Ce sont les cellules de l'immunité innée qui sont recrutées le plus rapidement sur le site de l'infection (Liew and Kubes, 2019). On les détecte en cytométrie en flux grâce à leur phénotype CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>, Ly6C<sup>mid</sup> chez la souris. Ils jouent principalement un rôle dans l'immunité antibactérienne, par leur capacité de phagocytose, par la sécrétion de granules contenant d'enzymes antibactériennes, par la production de ROS, ou par la formation d'un filet extra cellulaire constitué d'ADN et de protéines associées appelé "Neutrophil Extracellular Trap" (NET) qui après la lyse de la cellule permettant l'inhibition de la propagation bactérienne (Mantovani et al., 2011). Les neutrophiles sont attirés sur le site de l'inflammation notamment grâce à l'un de leurs récepteurs qui reconnaît spécifiquement les protéines spécifiques des bactéries et mitochondries, le récepteur FPR1. Ils expriment également de nombreux PRR, comme les TLR, qui leur permette de répondre à un large panel de signaux inflammatoires détectés (Hayashi et al., 2003). Les neutrophiles peuvent sécréter de très nombreuses molécules avec des activités extrêmement variées comme le recrutement d'autres cellules immunitaires (chimiokines), une activité pro-inflammatoire, ou anti-inflammatoire, ou de facteurs de croissance (Mantovani et al., 2011).

## Rôle des neutrophiles dans les cancers

Les neutrophiles sont recrutés vers le microenvironnement tumoral en réponse à la sécrétion de CXCL2 et CXCL5 par les macrophages. Une fois recrutés les NAT « Neutrophiles Associés à la Tumeur » (ou TAN « Tumor Associated Neutrophiles ») contribuent à la réaction inflammatoire antitumorale notamment en recrutant les lymphocytes T CD8 cytotoxiques anti-tumoraux (Fridlender et al., 2009). Il a également été montré que la signalisation TGF- $\beta$  dans les cancers inhibe le recrutement des neutrophiles au site tumoral et induit un phénotype N2 anti-inflammatoire ce qui contribue à la progression tumorale. On peut alors identifier 2 populations NAT qui diffèrent au niveau de leur profil transcriptomique: les N1 pro-inflammatoires qui inhibent la progression tumorale, et les N2 anti-inflammatoires qui la stimulent (Shaul et al., 2016).

### *v. Les Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)*

Le terme MDSC est utilisé pour définir une population cellulaire hétérogène d'origine myéloïde survenant au cours de l'apparition de pathologies. Cette population est définie chez la souris par l'expression des antigènes CD11b et Gr-1, et des niveaux plus ou moins élevés d'autres marqueurs de cellules myéloïdes matures. Ces cellules ont une expression génique augmentée soit de gènes impliqués dans le métabolisme d'acides aminés soit dans la production de ROS ou de « Reactive Nitrogen Species » (RNS); mais leur caractéristique principale est qu'elles peuvent supprimer la réponse immunitaire des lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* (Condamine et al., 2015; Gabrilovich et al., 2012; Marigo et al., 2008). On en distingue 2 types : les MDSC monocytiques (MO-MDSC) avec une expression de marqueurs de surface proche des monocytes inflammatoires (CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>-</sup>, Ly6C<sup>+</sup>) et les MDSC granulocytiques (G-MDSC) avec une expression de marqueurs de surface proche des granulocytes (CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, Ly6C<sup>-</sup>).

## Rôle des MDSC dans les cancers

Dans le contexte tumoral, les MO-MDSC présentent un phénotype immunosuppresseur différent des phénotypes conventionnels observés dans un contexte non cancéreux. Par la sécrétion de CCL5, elles recrutent les lymphocytes T régulateurs (Treg) producteurs d'IL-4, IL-10 et IL-13 qui favorisent la polarisation des macrophages en M2 immunosuppresseurs stimulant la progression tumorale (Pommier et al., 2013; Schlecker et al., 2012; Tiemessen et

al., 2007). De même, grâce à leur capacité immunomodulatrice, les G-MDSC supportent la progression tumorale (Kramer and Abrams, 2020; S. Li et al., 2020).

#### *vi. Conclusion sur les cellules myéloïdes dans l'inflammation et les microenvironnements tumoraux*

Un grand nombre de cellules immunitaires myéloïdes participe à la réaction inflammatoire ou à sa résolution notamment par la signalisation moléculaire en sécrétant des cytokines, des facteurs de croissance ou des chimiokines. Ce système immunitaire capable de résoudre les infections par les pathogènes et les dommages tissulaires a été sélectionné au fil de l'évolution, conduisant à une régulation fine et complexe du processus inflammatoire et de sa résolution. Cependant, l'inflammation résultant du cancer représente un type différent de stimulation du système immunitaire. Le microenvironnement tumoral permet le recrutement de cellules immunitaires et peut modifier les caractéristiques de ces cellules et ainsi complexifier l'identification du rôle qu'elles peuvent jouer. Ainsi, la réaction de ces cellules immunitaires dans les microenvironnements tumoraux est complexe et variable en fonction des signaux du le microenvironnement et des types de tumeurs.

### **3. L'inflammation dans les leucémies aiguës Lymphoblastiques.**

Les patients leucémiques développent souvent des infections dues au déficit en production de cellules immunitaires normales comme les neutrophiles, ou en réponse aux traitements chimiothérapeutiques. Ces infections sont accompagnées d'une inflammation et sont à l'origine d'un pronostic défavorable (Inaba et al., 2017; O'Connor et al., 2014). Cependant, dans les cancers on peut identifier une inflammation dite stérile caractérisée par l'activation de cellules immunitaires impliquée dans la réaction inflammatoire et la sécrétion de molécules inflammatoires indépendamment de la présence d'agents infectieux (Chen and Nuñez, 2010). Cette réaction inflammatoire stérile a été observée chez les patients leucémiques, de la même façon que l'on observe une réaction inflammatoire en microenvironnement de tumeurs solides (Grivennikov et al., 2010; Pérez-Figueroa et al., 2016). Il existe un fort impact de l'inflammation sur les leucémies et inversement notamment observé dans le cadre des LAM (Binder et al., 2018; Lasry et al., 2022; Luciano et al., 2022; Récher, 2021). Dans la partie suivante je m'intéresserai aux études se concentrant sur le rôle de l'inflammation (stérile ou en réponse à une stimulation infectieuse) dans les LAL-B pour finir avec l'inflammation dans les LAL-T.

Une étude sur des patients atteints de LAL pédiatriques (âge moyen 7.5 ans) a montré qu'il existait une inflammation stérile en réponse à la progression leucémique. Dans cette cohorte de 99 patients (dont 64 LAL-B, 14 LAL-T, 3 biphénotypiques et 18 non classées) comparée à des contrôles non leucémiques sans infection, les chercheurs ont identifié une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2; une augmentation de chimiokines comme IL-8 et MCP-1; une augmentation de molécules signant la réponse Th1 comme Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-12 et IL2 ; une absence de la réponse Th2 IL-4 , IL-13 ; et finalement une augmentation d'IL-10 , et une diminution du TGF- $\beta$ , cytokines anti-inflammatoires dans le plasma des patients (Pérez-Figueroa et al., 2016). Cependant, bien que cette modulation de molécules inflammatoires soit observée, aucun lien n'est établi entre ces molécules et le rôle qu'elles pourraient avoir sur la progression leucémique. De plus, la variabilité du type de leucémies au sein des patients (LAL-B, LAL-T, biphénotypique, ou indéterminée) peut être à l'origine d'une diversité de sécrétion dissimulée par le regroupement de ces échantillons dans cette analyse.

#### *i. Rôle du microenvironnement inflammatoire dans les LAL-B*

##### Rôle de l'inflammation sur l'initiation de LAL-B

L'existence d'acteurs extrinsèques qui pourraient jouer un rôle dans l'initiation des leucémies aigües pédiatriques est une question posée depuis au moins deux décennies. Le professeur Melvin F. Greaves propose l'hypothèse selon laquelle la leucémogénèse et plus particulièrement la LAL-B chez les patients pédiatriques se déclarerait en réponse à une réaction inflammatoire exacerbée, en se basant sur des données étiologiques biologiques et génétiques (Greaves, 2018). En sachant qu'il existe des clones pré-leucémiques prénataux arborant des premières mutations nécessaires à l'initiation leucémique mais insuffisantes à sa progression chez les patients, il propose un modèle selon lequel une réaction inflammatoire aigüe chez les jeunes enfants serait à l'origine d'un stress permettant la sélection de cellules ayant accumulé des mutations secondaires indispensables à la progression leucémique. Cette réaction inflammatoire exacerbée serait la conséquence de l'amélioration des conditions hygiéniques au cours des années et de la révolution industrielle. Les jeunes enfants seraient moins en contact dès leur première année de vie avec des pathogènes induisant un manque d'éducation du système immunitaire précoce. Lorsque les enfants sont ainsi en contact avec des pathogènes plus tardivement dans leur vie, ils subissent une réaction inflammatoire



exacerbée qui induirait la prolifération des clones préleucémiques favorisant l'émergence de clones arborant de nouvelles mutations nécessaires à l'initiation leucémique.

Cette théorie est soutenue expérimentalement par l'utilisation de modèles murins. Dans cette étude de 2015, les chercheurs utilisent un modèle génétique de prédisposition au développement d'une LAL-B qui présente une haploinsuffisance du gène *Pax5*<sup>+/-</sup> (Martín-Lorenzo et al., 2015). Ce modèle murin ne développe pas de pathologie lymphoïde de façon spontanée en condition d'élevage EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) donc en absence de contexte infectieux. Cependant, en les maintenant dans un environnement infectieux, les souris *Pax5*<sup>+/-</sup> développent des LAL-B *de novo* entre 5 et 15 mois d'âge avec une accumulation de lymphoblastes B dans les organes hématopoïétiques, typiques des LAL-B (Martín-Lorenzo et al., 2015). De fait, maintenir les souris dans un environnement comprenant des agents pathogènes (comme le norovirus murin, le virus de l'hépatite murine, des *helicobacter* et des parasites) incite une réponse immunitaire chez les animaux, qui stimule la mutagenèse et favorise *in fine* la progression leucémique. Les blastes leucémiques accumulent des mutations dans différents gènes comme dans la version sauvage de *Pax5*, ou des gènes de la voie Jak/Stat (*Jak1* ou *Jak3*). En somme, ce modèle murin d'induction de LAL-B, est en faveur de l'hypothèse du rôle primordial de l'inflammation dans la progression leucémique. Bien que le maintien des souris en milieu infectieux soit indispensable au développement leucémique dans ce modèle, les mécanismes sous-jacents inflammatoires moléculaires ou cellulaires conduisant à la leucémogénèse n'ont pas été identifiés.

#### Transcriptome des cellules du microenvironnement des LAL-B et rôle des monocytes.

L'équipe de Iannis Aifantis s'est intéressée au microenvironnement médullaire dans les LAL-B. L'étude du transcriptome à cellules uniques de MO de patients de LAL-B (avec 2 différentes mutations) a montré que les monocytes non conventionnels CD16<sup>+</sup> (l'équivalent des monocytes Ly6C<sup>-</sup> chez la souris (Shi and Pamer, 2011)) étaient augmentés dans la MO des patients et qu'ils exprimaient une signature transcriptomique associée à une interaction avec les cellules endothéliales (comme l'expression de PECAM1) (Witkowski et al., 2020). Ils se sont ensuite intéressés au rôle des cellules immunitaires dans la rechute en réalisant la même expérience sur les prélèvements des mêmes patients après traitement chimiothérapeutique (en rémission ou en rechute). Ils ont remarqué que la population de monocytes non conventionnels était à nouveau augmentée avec la même signature transcriptomique qu'au diagnostic (adhésion aux

cellules endothéliales) dans les prélèvements de patients en rechute indépendamment du type de LAL-B considéré. Cette population monocytaire est également augmentée dans le sang périphérique au diagnostic. De plus, grâce à une cohorte de 568 patients pédiatriques, ils ont montré que la présence de ces monocytes sanguins est corrélée avec un mauvais pronostic de survie. L'étude d'un modèle murin de LAL-B leur a permis d'observer l'équivalent murin de cette population monocytaire (Ly6C<sup>-</sup>) dans le sang. Les chercheurs ont également remarqué qu'inhiber la maturation de ces monocytes résidents Ly6C<sup>-</sup> grâce à l'utilisation d'anticorps ciblant CSF1-R (CD115) (MacDonald et al., 2010) en combinaison avec des ITK qui ciblent la LAL-B étudiée, augmentait considérablement la survie des souris. Cette expérience démontre ainsi le rôle de soutien de soutien qu'apporte cette population de monocytes résidents Ly6C<sup>-</sup> à la progression leucémique des LAL-B notamment via la résistance aux traitements anti-leucémiques (Witkowski et al., 2020).

#### Rôle de l'infection au cours de la progression de la LAL-B.

Pour démontrer le rôle de l'inflammation sur la progression leucémique au cours de l'évolution de la pathologie, les chercheurs ont remarqué dans un premier temps que traiter des souris dans un modèle syngénique de LAL-B comportant la fusion oncogénique BCR-ABL1 avec des LPS augmentait la vitesse de progression leucémique (Zhang et al., 2022). En effet, le LPS est un composé chimique constitué de lipides et de saccharides issus la paroi des bactéries GRAM-, utilisé en expérimentation animale pour induire un phénotype représentatif d'une inflammation systémique (Seemann et al., 2017) en se fixant sur le récepteur TLR4 et en activant la voie NF-κB. Stimuler les blastes de LAL-B avec le LPS *in vitro* augmente la prolifération, la survie et diminue la sensibilité des blastes leucémiques à l'Imatinib, un ITK spécifique de la fusion BCR-ABL1. De plus, l'injection de LPS aux souris au cours de la leucémie favorise la progression et l'initiation leucémique caractérisée par une diminution de la survie des souris et une augmentation du pourcentage de blastes leucémiques dans les organes. L'initiation leucémique et la prolifération des blastes de LAL-B BCR-ABL1<sup>+</sup> traités au LPS sont régulées par la protéine « Activation-Induced Deaminase » (AID) qui joue un rôle de mutagenèse nécessaire à l'initiation de la recombinaison homologue dans la physiologie des lymphocytes B (Methot and Di Noia, 2017). En somme, cette étude démontre que l'inflammation induite par le LPS *in vivo* favorise la progression leucémique des LAL-B BCR-ABL1 par l'activation de la voie NF-κB (Zhang et al., 2022). A ce jour, aucune publication ne montre

l'effet de l'injection d'agents inflammatoires comme le LPS sur la progression ou l'initiation des LAL-T.

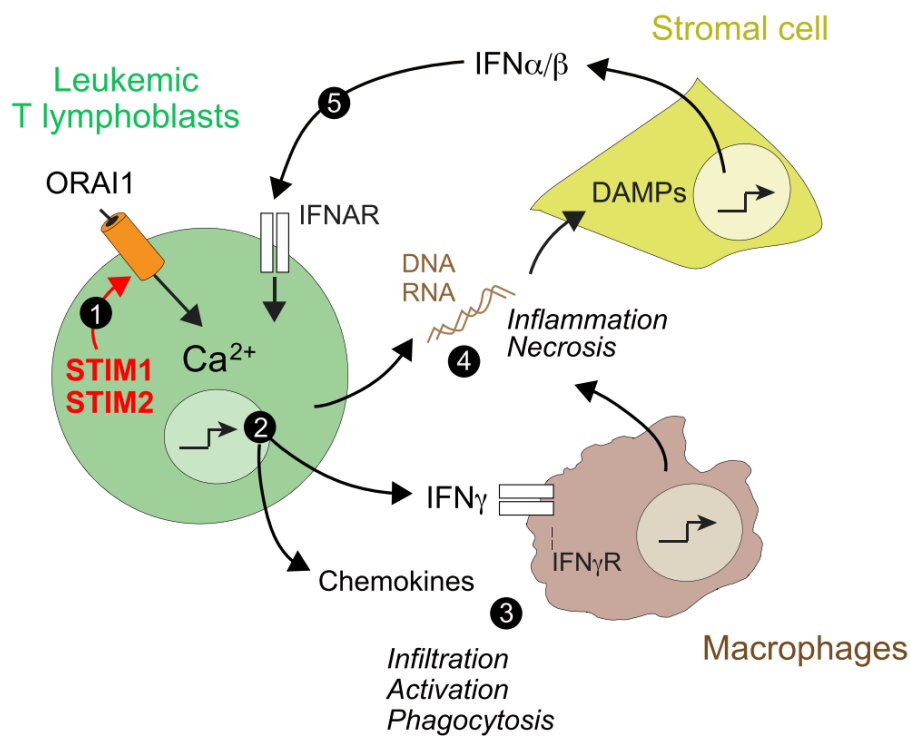
## ii. Rôle du microenvironnement inflammatoire dans les LAL-T

### Modifications intrinsèques des LAL-T impactant le microenvironnement inflammatoire et la progression leucémique.

#### Stim1 et Stim2

Dans une publication de 2018, les auteurs ont identifié que la voie SOCE (Store-Operated Calcium Entry) régulant l'influx d'ions Calcium grâce à l'expression des gènes **Stim1** et **Stim2** supportait l'inflammation induite dans les LAL-T. Cette voie de régulation du flux des ions calciques est dérégulée dans de nombreux cancers notamment dans les lignées cellulaires de LAL-T (Saint Fleur-Lominy et al., 2018). Pour comprendre l'effet de cette régulation des ions calciques sur les cellules de LAL-T, les chercheurs ont introduit la construction oncogénique ICN1 (activation constitutive de la voie NOTCH induisant la LAL-T (Aster et al., 2011; Pui et al., 1999)) dans des progéniteurs hématopoïétiques murins issus de souris C57Bl/6 sauvages (WT) ou mutées *Stim1/2<sup>-/-</sup>* puis les ont injectés à des souris receveuses WT ou *Stim1/2<sup>-/-</sup>*. Les souris injectées avec les cellules ICN1/*Stim1/2<sup>-/-</sup>* montrent un délai dans la progression leucémique, ainsi qu'une amélioration de leur survie indépendamment du statut mutationnel de la souris receveuse. L'amélioration de cette survie des souris est accompagnée d'une meilleure viabilité des cellules de la MO ainsi qu'une diminution de l'inflammation. De plus, ils ont observé une diminution de la sécrétion de cytokines pro inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-17 dans le plasma de souris leucémiques *Stim1/2<sup>-/-</sup>* ainsi qu'une diminution du nombre de macrophages dans la MO et la rate. Pour comprendre les mécanismes sous-jacents à ce retard de progression leucémique, les chercheurs ont identifié une augmentation de l'expression de gènes associés à la réponse inflammatoire dans les blastes sauvages comparés aux blastes *Stim1/2<sup>-/-</sup>* comme ceux impliqués dans la signalisation IFN- $\gamma$  et d'autres cytokines comme IL-16, IL-22, IL-34, CSF-1, et chimiokines comme CCL6, CCL9, CXCL9, et CXCL10. En conclusion, l'import d'ions  $Ca^{2+}$  intra cellulaire par la voie SOCE dans les blastes de LAL-T ICN1 entretient une réponse inflammatoire qui stimule la progression leucémique et favorise l'apoptose des cellules du microenvironnement leucémique, corrélée à une diminution de la survie des souris. Cette étude de *Stim1/2* contribue à la compréhension de l'effet des LAL-T sur l'induction d'un microenvironnement soutenant la progression leucémique. Cependant, les mécanismes précis

de réponse du microenvironnement sur les blastes de LAL-T ne sont pas décrits. Bien qu'ils observent une activation transcriptionnelle de gènes associés à l'inflammation dans les blastes leucémiques exprimant *Stim1/2*, ils ne démontrent pas une interaction fonctionnelle entre les molécules sécrétées et leur effet sur l'expansion leucémique, la croissance cellulaire ou la survie des souris (Figure 16).



**Figure 16 :** Mécanismes de la voie SOCE « Store Operated Calcium Entry » médiée par les gènes *Stim1* et *Stim2* dans les LAL-T sur l'induction d'un microenvironnement inflammatoire. 1) Les gènes *Stim1* et 2) favorisent l'influx d'ions calciques dans les blastes leucémiques 2) dont la signalisation est nécessaire pour la sécrétion d'acteurs moléculaires de l'inflammation. 3) Ces sécrétions activent les cellules du microenvironnement 4) et favorisent la nécrose et la sécrétion d'acteurs pro-inflammatoires moléculaires 5) qui peuvent interagir avec la LAL-T (de Saint Fleur-Lominy et al., 2018).

## NF- $\kappa$ B

La voie **NF- $\kappa$ B** est une voie de signalisation complexe intervenant dans de nombreux processus cellulaires et qui est considérée notamment comme un centre majeur de la régulation de l'inflammation (Hoesel and Schmid, 2013). Il a été démontré que la rapidité avec laquelle les échantillons primaires de LAL-T sont capables de se développer en modèle PDX et la vitesse à laquelle les cellules leucémiques proliféraient *in vitro* était corrélés avec l'activation

de la voie NF- $\kappa$ B dans les blastes leucémiques de patients (Poglio et al., 2015). De plus, la voie NOTCH1 active la voie NF- $\kappa$ B et cette activation de est primordiale dans les mécanismes oncogéniques associés aux LAL-T mutées pour la protéine NOTCH1 (Espinosa et al., 2010). Il est donc envisageable que dans un contexte indépendant de l'activation de la voie NOTCH1 dans les LAL-T, la signalisation inflammatoire induite par le microenvironnement puisse activer la voie NF- $\kappa$ B et soutenir la progression leucémique.

### IL-7/IL-7R

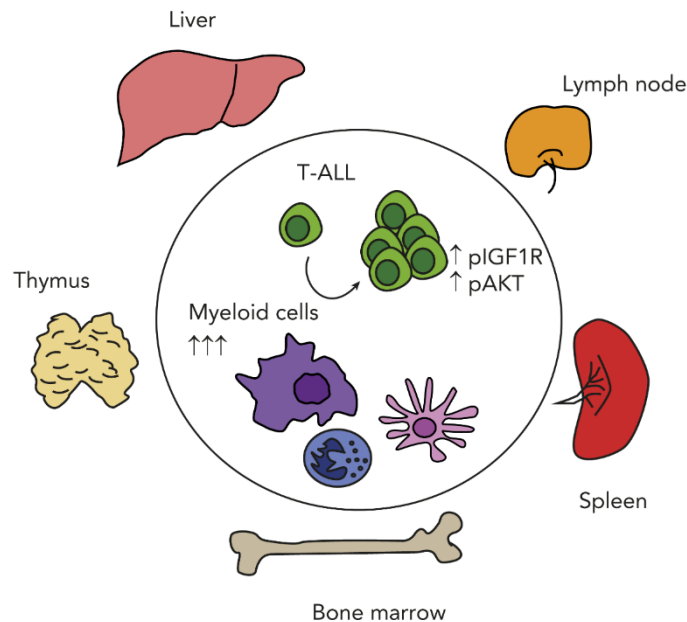
A ce jour, la signalisation **IL-7/IL7R** est la seule à avoir été identifiée dans l'activation autocrine des LAL-T (Buffière et al., 2019). Cependant, la variabilité de méthylation de l'ADN au niveau du promoteur de l'IL7 des blastes leucémiques, conduit à des niveaux d'expression et donc d'activation autocrines variables entre les échantillons de patients de LAL-T. Cette étude, en plus de celles réalisées sur l'identification du rôle de l'IL-7 sécrété dans le microenvironnement supporte les thérapies visant l'axe IL-7/IL-7R comme les inhibiteurs de la voie JAK/STAT en aval de la signalisation ou PI3K/AKT.

### Rôles des acteurs cellulaires immunitaires sur les LAL-T.

#### Cellules myéloïdes

Plusieurs sous-types de cellules myéloïdes peuvent stimuler la progression leucémique. En effet, cultiver les blastes de LAL-T provenant de souris leucémiques en présence ou non de cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup> (monocytes, macrophages, granulocytes neutrophiles, cellules dendritiques) issues de différents organes (rate, foie, MO) montre que ces cellules aident la croissance des LAL-T *in vitro* (Lyu et al., 2020). De plus, la déplétion de l'ensemble des cellules phagocytaires (monocytes, cellules dendritiques et macrophage), grâce à l'injection de liposomes de clodronate qui ciblent les cellules phagocytaires, diminue la progression leucémique dans la majorité des organes envahis (le foie, la rate, les reins, les poumons, la MO, le thymus et les ganglions) (Lyu et al., 2020). Les expériences de coculture de cellules myéloïdes ont également été reproduites avec des échantillons primaires humains de LAL-T et l'on obtient la même conclusion en utilisant des monocytes, cellules dendritiques et macrophages dérivés de monocytes de sang périphérique. Ce soutien de la progression leucémique par les cellules myéloïdes du microenvironnement est expliqué en partie par l'activation de la voie de l'IGF1R dans les blastes leucémiques, notamment par la phosphorylation du récepteur et la cascade d'activation en aval. Par ailleurs, cette même équipe a identifié que le soutien des cellules

myéloïdes aux LAL-T nécessite un contact cellulaire entre les 2 populations. Ainsi ils ont pu identifier qu'en plus de de l'activation de la voie IGF1R, les cellules myéloïdes stimulent la croissance leucémique par l'activation de la voie des intégrines (Lyu et al., 2022) (Figure 17).



**Figure 17 :** Rôle de soutien des cellules myéloïdes systémique à la LAL-T. Au cours de l'expansion leucémique, les organes envahis sont accompagnés d'un recrutement de cellules immunitaires myéloïdes (monocytes, macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques). Les analyse des blastes leucémique ont montré que l'activation signalisation IGF1R (puis en aval AKT) pouvait expliquer le mécanisme de support des cellules myéloïdes sur la LAL-T (de Passaro et al, 2020).

### Les macrophages

Les macrophages jouent un rôle primordial dans l'inflammation et dans le processus de défense immunitaire. Dans la majorité des tumeurs solides, les Macrophages Associés aux Tumeurs (MAT) se rapprochant du phénotype M2 ont un rôle néfaste puisqu'ils favorisent l'invasion tumorale, l'angiogenèse, l'apparition de métastases et augmentent l'immunosuppression associée aux cellules tumorales (partie macrophages) (Noy and Pollard, 2014). Il a été identifié en modèle syngénique de LAL-T que les macrophages murins associés aux LAL-T ont des caractéristiques différentes des macrophages associés aux tumeurs solides. Ils ont montré que les macrophages étaient différents en fonction de leur localisation (MO ou rate) et au cours de la progression leucémique, en se basant sur l'expression de 5 gènes associés au phénotype M1 (*Cx19*, *Cxcl11*, *Il-1 $\beta$* , *Il-12 $\alpha$*  et *Nos1*) et 9 gènes associés au phénotype M2 (*Arg1*, *Ccl17*, *Ccl22*, *CD206*, *Il-10*, *Csf-1*, *Mmp-9*, *Tgf- $\beta$ 1* et *Vegf*). Les auteurs proposent un

nouveau type de macrophages qu'ils baptisent « macrophages associés à la leucémie » MAL (ou « Leukemia Associated Macrophages », LAM) avec un profil d'expression génique différent des profils M1 ou M2 classiques (expression de marqueurs de surface CD206 associés au M2 alors qu'ils expriment des gènes de la signature M1) (Chen et al., 2015). En revanche, il n'existe pas de corrélation entre l'identité M1 ou M2 des macrophages dans le microenvironnement leucémique et leur rôle sur la progression leucémique. Ces MAL éduqués par le microenvironnement leucémique de la rate et de la MO soutiennent la croissance cellulaire des LAL-T *ex vivo*. Cependant, les mécanismes cellulaires ou moléculaires de soutien aux blastes leucémiques ne sont pas détaillés dans cette publication (Chen et al., 2015). Dans une autre étude, on apprend que l'axe CSF-1/CSF-1R favorise l'activation de macrophages issus de MO (BMDM « Bone Marrow Derived Macrophages ») en MAL lorsqu'ils sont cultivés en présence de la lignée de lymphome T EL4 murine. Cette lignée peut générer une leucémie T en injection en souris immunocompétentes. Inhiber l'axe CSF-1/CSF-1R *in vivo* diminue la progression leucémique en restreignant le recrutement de macrophages, démontrant le rôle de soutien des MAL sur la progression leucémique (K. Li et al., 2020).

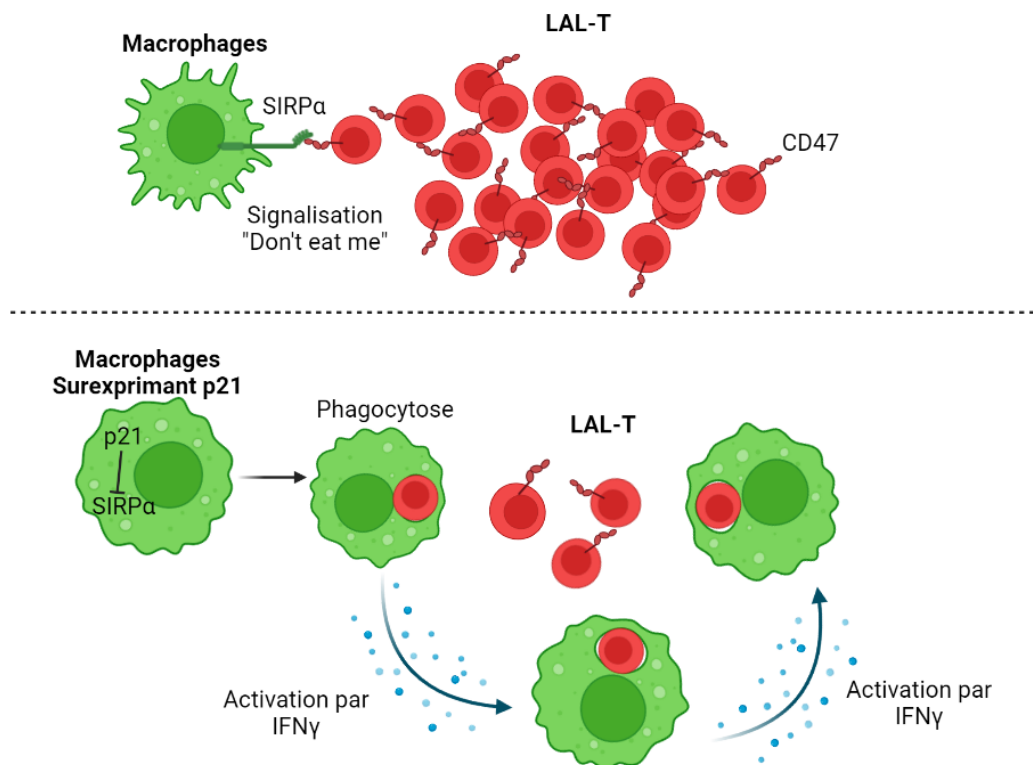
Une autre étude de 2020 étudie les MAL de la rate et du foie au cours de la progression des LAL-T. Les chercheurs identifient différentes sous populations de macrophages dans la rate et le foie en se basant sur l'expression de Ly6C et F4/80 et identifient les macrophages Ly6C<sup>+</sup> comme dérivés des monocytes. Ils montrent qu'inhiber la signalisation CCL2/CCR2 (modèle murin KO pour le récepteur CCR2) diminue le recrutement de macrophages Ly6C<sup>+</sup> associés à la leucémie injectée. L'inhibition de ce recrutement est accompagnée par une diminution de l'inflammation stérile (diminution de la sécrétion de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IFN- $\gamma$ ) dans les organes extra-médullaires notamment le foie et la rate, et par une diminution de l'envahissement de la rate et du foie par la leucémie mais pas de la MO. Ces résultats indiquent que les macrophages Ly6C<sup>+</sup> contribuent à la propagation des blastes de LAL-T dans les organes extramédullaires. Ils ont ensuite étudié les mécanismes de recrutement des cellules leucémiques et ont identifié que les MAL Ly6C<sup>+</sup> sécrètent les chimiokines CCL8 et CCL9 dont les récepteurs sont CCR2 et CCR1 respectivement. Ces récepteurs étant exprimés à la surface des cellules leucémiques, les chercheurs ont remarqué qu'inhiber cette interaction *in vitro* diminue la migration des blastes leucémiques et qu'injecter des inhibiteurs de ces récepteurs aux souris leucémiques *in vivo* diminue l'envahissement de la rate et du foie. Cette étude identifie donc les MAL dérivés de

monocytes inflammatoires comme une population cellulaire contribuant à l'invasion des blastes leucémiques vers les organes extramédullaires via la signalisation CCL8/CCR1-CCR2 et CCL9 CCL10/CCR1 (Yang et al., 2020).

Des équipes de recherche souhaitent identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques en se basant sur la plasticité des macrophages cette activité pro-tumorale des MAT en induisant une réversion vers un phénotype M1 anti-tumorale des macrophages (Pan, 2012). Cependant, les cellules cancéreuses contournent souvent le processus de phagocytose en induisant la signalisation « don't eat me » caractérisée par l'expression de protéines de surface comme CD47, PD-L1,  $\beta$ 2M et CD24 qui se fixent respectivement sur SIRP $\alpha$ , PD-1, LILRB1 et Siglec-10 sur les macrophages. Dans cette étude de 2022, Allouch et ses collègues démontrent que les macrophages dérivés de monocytes de sang périphérique humains sont capables d'activité phagocytaire des blastes de LAL-T *in vivo*, contournant la signalisation « don't eat me » en exprimant p21, un inhibiteur transcriptionnel de SIRP $\alpha$  (Figure 18). Ces macrophages phagocytent les blastes de LAL-T, diminuent la progression leucémique et améliorent la survie des souris (Allouch et al., 2022). Cette phagocytose induit une activation pro-inflammatoire des macrophages, caractérisée par une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, SERPIN E1, GM-CSF, IL-23, Gro- $\alpha$ , IL1-ra, MIF, IL-27, et surtout l'IFN- $\gamma$  qui est décrit comme une cytokine permettant l'activation des macrophages en macrophages proinflammatoires de type M1 (Müller et al., 2017). Allouch et ses collègues ont démontré que l'IFN- $\gamma$  sécrété par les macrophages activés par la phagocytose de cellule leucémique polarise les macrophages immunosuppresseurs non phagocytaires *in vitro* et *in vivo* en macrophages pro-inflammatoires phagocytaires (Figure 18). L'injection d'anticorps dirigés contre l'IFN- $\gamma$  induit la perte de l'amélioration de la survie prodiguée par l'injection de macrophages surexprimant p21 soulignant le rôle primordial de la signalisation IFN- $\gamma$  dans l'éducation des macrophages du microenvironnement des LAL-T.



En conclusion, cette étude propose une stratégie thérapeutique cellulaire innovante par l'injection de macrophages dérivés de monocytes modifiés exprimant p21 et induire leur activité phagocytaire anti-tumorale en complément des traitements chimiothérapeutiques actuels. Cependant, bien que des stratégies thérapeutiques modifiant les macrophages soient en cours d'essai pour d'autres pathologies que les LAL-T, le modèle comporte quelques contraintes comme la complexité de la transduction des cellules myéloïdes primaires humaines avec des vecteurs viraux dans un cadre thérapeutique. De plus, bien que cette stratégie soit très efficace en modèle PDX, les macrophages jouent un rôle de soutien de la progression leucémiques dans les modèles syngéniques de LAL-T (Chen et al., 2015). Il faut donc être vigilant sur le risque potentiel que les macrophages injectés puissent stimuler la progression leucémique plutôt que d'induire la phagocytose de leurs blastes.



**Figure 18 :** Activité phagocytaire anti-tumorale dépendante de p21 des macrophages dans les LAL-T. L'absence d'expression de p21 dans les macrophages induit la signalisation « don't eat me » médiée par la présence de CD47 à la surface des cellules leucémique et SIRPα à la surface des macrophages. Induire la surexpression de p21 dans les macrophages inhibe l'expression de SIRPα et permet l'activité phagocytaire antitumorale des macrophages dans la LAL-T. Les macrophages activés sécrètent de l'IFN-γ induisant l'activation des macrophages avoisinant dans le microenvironnement tumorale (adapté de Allouch *et al.*, 2022).

## Rôles des acteurs moléculaires inflammatoires sur les LAL-T.

A ce jour, il n'existe que quelques molécules sécrétées dans le microenvironnement des LAL-T qui ont été identifiées pour soutenir la progression ou l'initiation leucémique. Ces molécules sont souvent impliquées dans des réactions immunitaires. Cette dernière partie a pour but de répertorier les facteurs extrinsèques sécrétés impliqués dans l'inflammation et leur rôle sur la LAL-T.

Par exemple, l'**IGF1** est impliquée dans l'immunité pour potentialiser la réponse pro-inflammatoire des cellules du sang périphérique (Arikan et al., 2009; Higashi et al., 2014; Weigent, 2013). Cette molécule a premièrement été décrite dans le microenvironnement thymique des LAL-T et sécrétée par les cellules dendritiques (Triplett et al., 2016). Plus tard, il a été décrit qu'une diversité plus large de cellules myéloïdes incluant les monocytes, macrophages et cellules dendritiques soutenaient la progression leucémique par l'induction de la voie de l'IGF1 (Lyu et al., 2020) (voir partie rôles des acteurs cellulaires immunitaires sur les LAL-T).

L'**IL-18** est une cytokine pro inflammatoire. En se fixant à son récepteur IL-18R, la signalisation qu'elle induit provoque la sécrétion d'IFN- $\gamma$  pour notamment réguler l'activité des lymphocytes Th1 et Th2 (Dinarello, 2000; Nakanishi et al., 2001; Xu et al., 1998). Cette cytokine est exprimée constitutivement par de nombreux types cellulaires hématopoïétiques comme les cellules mononucléées du sang périphérique, les macrophages, les cellules dendritiques (Lorey et al., 2004). Par ailleurs, il a été démontré que les cellules mésenchymateuses dans la MO sécrètent de l'IL-18 au cours de la progression leucémique et que cette sécrétion soutient la progression leucémique (Uzan et al., 2014).

D'autres acteurs moléculaires impliqués dans l'inflammation ou dans la signalisation comme l'**IL-7** soutiennent la LAL-T. Il peut être sécrété par les cellules stromales de la MO ou les cellules épithéliales thymiques. Son expression est primordiale dans la lymphopoïèse B et T (Ceredig and Rolink, 2012). Le microenvironnement supporte la progression leucémique via à la sécrétion d'IL7 (Barata et al., 2001; Scupoli et al., 2003; Silva et al., 2011). Cependant, en plus de la sécrétion par le microenvironnement, les blastes leucémiques peuvent également sécréter de l'IL7 et jouer un rôle autocrine (Buffière et al., 2019).

Les chimiokines **CCL19** et **CCL21** sont toutes les 2 impliquées dans l'adressage des progéniteurs hématopoïétiques exprimant le récepteur CCR7 au thymus et sont également très fortement sécrétés dans le microenvironnement de la rate pour recruter les lymphocytes T et contribuer à leur éducation en contexte infectieux (Chauveau et al., 2020; Lo et al., 2003; Yan et al., 2021). Cette signalisation est impliquée dans le recrutement de blastes de LAL-T dans la rate et au SNC (Buonamici et al., 2009; Ma et al., 2014) (voir partie microenvironnement de la rate).

L'interaction **IL-15/IL-15R** est importante dans l'homéostasie des lymphocytes T CD8 mémoires, des lymphocytes NKT « Natural Killer T » et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  notamment dans le thymus (Stonier and Schluns, 2010; Tao et al., 2021). Une équipe de recherche a identifié qu'en modèle murin de fond génétique NOD/SCID, l'ajout du KO de la cytokine IL-15 conduit à l'initiation d'une LAL-T. Ces expériences démontrent que dans un modèle d'abrogation de l'induction de la cassure double brin nécessaire au NHEJ « Non homologous End Joining » pour le réarrangement du TCR (mutation *SCID*) la signalisation IL-15/IL-15R empêche la leucémogénèse (Bobbala et al., 2016; Nandi et al., 2023).

## C. Conclusion générale

L'étude de l'impact du microenvironnement sur la progression des LAL-T est complexe du fait de la diversité 1) des cellules leucémiques, 2) des niches tumorales, 3) des cellules qui composent ces niches et de leurs interactions avec les blastes de LAL-T, 4) d'acteurs moléculaires sécrétés par ces cellules et des divers rôles qu'ils peuvent avoir sur la progression leucémique. Cette introduction a passé en revue les interactions identifiées à ce jour entre les cellules de LAL-T et le microenvironnement. Bien que le rôle du microenvironnement inflammatoire sur l'initiation, l'induction de métastase et la progression des tumeurs solides soit largement étudié, cet aspect du microenvironnement n'est pas encore très connu dans les LAL-T. Ainsi, ce travail de thèse cherche à compléter le savoir actuel des mécanismes cellulaires et moléculaires du microenvironnement inflammatoire qui peuvent impacter la progression leucémique avec l'idée à long terme d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des LAL-T.

## Objectifs de la thèse

---

Bien que les traitements actuels aient considérablement permis d'améliorer la survie des patients atteints de LAL-T, quand il y a rechute ou que la leucémie est réfractaire aux traitements peu de possibilités thérapeutiques sont envisageables. Ce travail de thèse se place dans une démarche d'amélioration de la compréhension des mécanismes extra-cellulaires qui influent sur le développement leucémique, avec le but à long terme d'améliorer la survie de patients souffrant de LAL-T. Etudier cette hémopathie maligne permet de mieux comprendre les causes de l'évolution de la maladie et potentiellement de proposer de nouvelles approches thérapeutiques innovantes.

L'objectif de ce travail est de caractériser les acteurs du microenvironnement inflammatoire induit par la LAL-T et tester leur rôle dans la progression de la leucémie. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles murins de LAL-T.

Le premier objectif de ce travail a été d'identifier les acteurs cellulaires et moléculaires du microenvironnement inflammatoire induit par la LAL-T. L'impact de la leucémie a été évalué en particulier sur les cellules myéloïdes. Nous avons souhaité également déterminer l'activité de ce microenvironnement notamment par la sécrétion de cytokines pro inflammatoires, de molécules impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires ou de facteurs de croissance.

Le deuxième objectif a été d'identifier si les populations immunitaires inflammatoires modifiées par la LAL-T influencent la progression de la maladie. Pour cela, nous avons utilisé in vivo des anticorps ciblant et supprimant de manière spécifique les cellules myéloïdes identifiées ou un modèle pharmacologique, par injection de liposomes de clodronate pour cibler les cellules phagocytaires.

Le dernier objectif s'est concentré sur les acteurs moléculaires sécrétés indépendamment de l'identification des populations immunitaires. En inhibant spécifiquement la sécrétion de molécules inflammatoires par le microenvironnement avec l'utilisation d'un agoniste des récepteurs à l'adénosine (NECA), nous avons souhaité identifier de nouveaux candidats moléculaires impliqués dans la progression leucémique.

J'ai choisi de présenter la description des résultats produits ainsi que la partie décrivant les matériels et méthodes utilisés au cours de la thèse sous un format de publication scientifique, en anglais.

Les résultats obtenus sont ensuite débattus dans une partie discussion de la thèse, en français, et n'a pas encore été mise sous la forme demandée pour un article.

La publication intitulée « Hypoxia favors chemoresistance in T-ALL through an HIF $\alpha$ -mediated mTORC inhibition loop » publiée dans le journal « Blood advances » en 2021, dans laquelle je suis auteur pour ma contribution à la correction du manuscrit se trouve dans la partie annexe.

### **Inflammatory microenvironment provides critical support for T-cell acute lymphoblastic leukaemia progression**

Charly Le Maout<sup>1,3</sup>, Lucine Fahy<sup>1,3</sup>, Caroline Devanand<sup>4</sup>, Charlotte Duwat<sup>4</sup>, Vilma Barroca<sup>4</sup>, Morgane Le Gall<sup>5</sup>, Julien Calvo<sup>1,3</sup>, Benjamin Uzan<sup>1,3,6</sup>, Pflumio Françoise<sup>1,3#\*</sup>, Vanessa Petit<sup>2,3#\*</sup>

<sup>1</sup> Université Paris Cité, Inserm, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Laboratoire des cellules Souches Hématopoïétiques et des Leucémies (LSHL), Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (iRCM), Institut de Biologie François Jacob (IBFJ)  
F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup> Université Paris Cité, Inserm, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Laboratoire Réparation et Transcription dans les cellules Souches (LRTS), Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (iRCM), Institut de Biologie François Jacob (IBFJ)  
F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>3</sup> Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, iRCM/IBFJ, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>4</sup> CEA, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (iRCM), Institut de Biologie François Jacob (IBFJ), Plateforme d'expérimentation animale, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>5</sup> Inserm U1016-Institut Cochin, Plateforme Protéomique 3P5-Service Analyses Fonctionnelles, Paris, France

<sup>6</sup> Université Paris Cité, CNRS, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, F-75013, Paris, France

# authors contributed equally to this work

\* Co-corresponding authors: francoise.pflumio@cea.fr ; vanessa.petit@cea.fr

## ABSTRACT

**Background:** T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a malignant hematological disorder characterized by an increased proliferation of immature T lymphocytes precursors. T-ALL treatment is based on chemotherapy with strong side effects, and patients that undergo relapse display poor prognosis. Although cell-intrinsic oncogenic pathways are well-studied, the tumor microenvironment, such as inflammatory cellular and molecular components is less explored in T-ALL. Thus, we sought to determine the composition of inflammatory microenvironment induced by T-ALL, and the role of the inflammatory molecules secreted on T-ALL progression.

**Methods:** Two different mouse T-ALL cell models were injected intravenously into immunocompetent C57Bl/6 mice. We used anti-Ly6G neutrophils depleting antibody, and clodronate liposomes to suppress neutrophils and phagocytic cells, respectively. NECA, an agonist of adenosine receptors, was used to decrease inflammatory molecules secretion and study their implication in T-ALL growth.

**Findings:** We show that T-ALLs enhance blood neutrophils and resident monocytes, accompanied with an acute secretion of inflammatory molecules in the plasma. Depleting neutrophils or resident monocytes does not modulate plasmatic inflammatory molecule secretion and mice survival. However, inhibition of inflammatory molecule secretion by the microenvironment using NECA diminishes T-ALL progression resulting in enhanced mouse survival. Focusing on the most decreased molecule in the plasma with NECA treatment, we uncover Hepatocyte Growth Factor (HGF), a common regulator of proliferation and migration of tumor cells as a potential therapeutic target in T-ALL.

**Interpretation:** Altogether, we identified a signature of inflammatory molecules that can potentially be involved in T-ALL evolution and uncovered HGF as a new potential therapeutic target.

**Fundings:** The work was supported by CEA, Inserm, Université Paris Saclay and Université Paris Cité. The LSHL team is labelled by Ligue Nationale Contre le Cancer.

## INTRODUCTION

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a hematologic malignancy that arises from T-cell precursors in the thymus <sup>1</sup>. Current treatments have improved survival rates for up to 90% of pediatric patients, whereas survival rates for adults remain at 50% <sup>2,3</sup>. However, the intensified multiagent chemotherapy regimens are associated with significant long-term morbidity, including neurotoxicity, secondary cancers, and cardiopathies <sup>4,5</sup>. Furthermore, frontline therapy refractory or relapsing T-ALL patients have poor outcomes and few alternative therapeutic options are available.

Earliest research on T-ALL has been focused on the identification of cell-intrinsic genetic alterations that promote tumor growth such as activating mutations in NOTCH1 pathway and aberrant expression of the transcription factors like T-cell acute lymphocytic leukemia 1 (TAL1/SCL) or LIM domain only 1/2 (LMO1/2) <sup>6-9</sup>. Although oncogenic subgroups of T-ALL are identified and correlate with assorted prognosis, T-ALL relapse and refractory patients can occur in various types of T-ALL subgroups supporting a role of the niches to generate differential growth and treatment response of T-ALL cells in patients <sup>10,11</sup>. Despite our deeper understanding of these cell-intrinsic alterations, we have yet to develop successful, possibly more targeted, therapeutic approaches to improve patient outcomes, suggesting the need to broaden our understanding of other factors affecting T-ALL.

Tumor progression is not only driven by cell-intrinsic alterations but also by dynamic interactions between cancer cells and the surrounding tumor microenvironment (TME). Notably, neither primary mouse nor human T-ALL cells survive when cultured in the absence of cytokines or cellular support suggesting that TME provides critical support for T-ALL growth <sup>12-14</sup>. In addition to TME cells, molecular actors interact with leukemic blasts in a paracrine way, including cytokines, chemokines or growth factors. Multiple cell types in the TME have been shown to support T-ALL survival and progression, including vascular endothelial cells through a C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4)-CXCL12 axis in the Bone Marrow (BM) <sup>15,16</sup>, BM-derived stromal cells by pro-inflammatory cytokine IL-18 production <sup>17</sup> and thymic epithelial cells (TECs) through release of interleukin 7(IL-7) and expression of NOTCH1 ligands <sup>18</sup>.

Biological features, such as inflammation can also participate in cancer progression, particularly in the case of hematological malignancies <sup>19</sup>. The inflammatory microenvironment

of cancers is a complex network in which cellular and molecular immune infiltration can contribute to the development, spread of cancer, metastasis and the onset of resistance to anticancer therapies <sup>20,21</sup>. Cytokines are essential for BM niche homeostasis, and the first studies on B-ALL reported a higher expression of these molecules when compared with healthy BM samples, suggesting an autocrine/paracrine regulation of leukemic cells and cytokines <sup>22</sup>. More recently, studies have demonstrated that inflammation can drive progression of BCR-ABL1 B-ALL <sup>23</sup>. The composition and the contribution of the inflammatory microenvironment in T-ALL still remains poorly explored. The deletion of stromal interaction molecule (STIM1/2) regulating store-operated Ca<sup>2+</sup> (SOCE) mechanism improves T-ALL mouse survival in relation with reduced inflammation <sup>24</sup>. Also, tumor-associated myeloid cells, in particular dendritic cells, support T-ALL growth via insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) activation <sup>25</sup>. These results suggest that inflammatory microenvironment comprising myeloid cells and soluble factors help T-ALL growth, and the cellular and molecular features of inflammatory response induced by the T-ALL in the microenvironment as well as its impact on leukemic progression still call for better characterization.

In the present work, we investigated the role of the inflammatory microenvironment induced by leukemia using NOTCH1 and TAL1/LMO1-driven mouse T-ALL models. We found that T-ALL favors the recruitment of myeloid cells like neutrophils and resident monocytes accompanied with acute secretion of inflammatory molecules in the plasma. The depletion of specific myeloid cells was not sufficient to decrease inflammatory molecule secretion and increase T-ALL mice survival, even though leukemic burden could be impaired. Besides, inhibiting inflammatory molecule secretion in the plasma by a nonselective adenosine receptor agonist, 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine (NECA) treatment drastically decreased T-ALL progression and prolonged mouse survival. Our findings demonstrate the importance and the composition of inflammatory factor microenvironment in T-ALL progression and identifying HGF as a new putative driver of T-ALL, and serve as opportune therapeutic target.



## RESULTS

### **T-ALL spreads to multiple organs, increases blood neutrophils and resident monocytes infiltration that correlate with high inflammatory molecules in the plasma**

Previous studies have shown that even though leukemic cells become the most dominant cell population in the hematopoietic organs as leukemia develops, a supportive microenvironment is important for its establishment and rapid dissemination<sup>26</sup>. Our goal being to better characterize the impact of the microenvironment on T-ALL progression, we first used a NOTCH1-induced mouse T-ALL model (further noted as T-ALL#1), NOTCH1 being a major actor in T-ALL pathology<sup>27</sup>. In this model intracellular NOTCH1 (ICN1), the active form of NOTCH1, expression is constitutively expressed in T cell progenitors through a MIGR retrovirus vector that includes a GFP tracer<sup>28</sup>. Phenotypic analysis showed that GFP<sup>+</sup> T-ALL#1 express mature cortical T lymphoid progenitor markers CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCR- $\beta$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> associated with this T-ALL model<sup>29</sup> (Figure 1A). T-ALL#1 cells are detectable in the blood, BM and spleen 7 days after the injection of T-ALL#1 cells in non-irradiated C57BL/6 wild type (WT) mice and remain low until day 12. The highest levels of leukemia are observed at day 14 triggering a 14 days median survival time of leukemic mice (Figure 1B and Supp. Figure 1A). Survival curves and dynamic distribution of T-ALL cells suggested that day 7 and 14 were interesting time points to define early and late stages of leukemia, respectively. At 14 days post T-ALL#1 mouse transplant, a 2.3- and 1.6-fold increase of spleen and liver weight was observed respectively, in comparison with control mice (Figure 1C). Representative size of spleen and liver are illustrated in Figure 1C (right panels).

Extramedullar organ infiltration is a common clinical feature of leukemia and is observed in many T-ALL models<sup>30</sup>. Because immune cells are part of the leukemic cell microenvironment in those organs, we followed the evolution of several immune cell populations among the normal cells (i.e. GFP<sup>-</sup> cells) including neutrophils (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>), inflammatory monocytes (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup>), resident monocytes (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup>) and lymphoid cells including B lymphocytes (CD11b<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>) and T lymphocytes (CD11b<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>) (Supp. Figure 1B). We observed that the progression of T-ALL was correlated only with the increase of blood neutrophils and resident monocytes with a 3.4-fold for neutrophils and 2.0-fold for resident monocytes at day 14 (Figures 1D-E and Supp. Figure 1C).

To verify that these observations were independent of *ICN1*-T-ALL model, we performed identical experiments with a second T-ALL model in which *TAL1* and *LMO1* oncogenes were combined<sup>31</sup>. Mice developed T-ALL with CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> immature progenitor phenotype (further entitled T-ALL #2) (Supp. Figure 1E). When T-ALL#2 cells were injected in CD45.1.2<sup>+</sup> non irradiated C57BL/6 recipient mice, the spreading of T-ALL#2 cells in several hematopoietic organs was observed 34 days post injection, mouse death deadline (Supp. Figure 1F). Similarly to T-ALL#1, T-ALL#2 infiltrated mice exhibited a 2-fold and 10-fold increase of blood neutrophils and resident monocytes respectively (Figure 1G). The observations made with these two T-ALL models suggest that T-ALL induces a cellular inflammatory microenvironment with increased neutrophils and resident monocytes in the peripheral blood.

To further characterize the inflammatory response associated with T-ALL, we tested the presence of chemokine and cytokine in the plasma with relative quantification cytokine array. As shown in Figures 1F and 1H, an increase of different class of inflammatory molecules was observed in the plasma of both T-ALL models such as growth factors, cytokines, chemokines and metalloprotease (Supp. Figures 1D and 1G). Notably, enhanced and significant levels of plasmatic hepatocyte growth factor (HGF) were observed in T-ALL#1 mice (20-fold) and in T-ALL#2 mice (3-fold) as well as a significant increase of Serpin E1, CXCL13 and Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) compared to healthy mice (Figure 1F and 1H).

Altogether, these results describe actors of the blood microenvironment that are stimulated by and may interact with T-ALL cells, thus providing a favorable milieu to leukemic expansion. This environment includes increased blood neutrophils, resident monocytes and inflammatory molecules.

### **T-ALL progression is independent of neutrophils *in vivo***

Since the increase of blood neutrophils is correlated with T-ALL growth *in vivo*, we investigated whether neutrophils could contribute to generalized inflammation and in turn, support T-ALL progression. To test this hypothesis, we assessed leukemic invasion in T-ALL#1 mice treated with anti-Gr1 antibody or isotype to deplete neutrophils. Anti-Gr1 recognizes Ly6G, the most widely used marker of mouse neutrophils, and Ly6C also expressed on inflammatory monocytes<sup>32</sup>. When blood T-ALL burden reached 0.1-1%, anti-Gr1 was administrated to half of the cohort with 3 intraperitoneal injections from day 7 to day 13 and T-ALL burden was

followed up (Figure 2A). As expected, data extracted from flow cytometry analysis indicated a selective decrease of myeloid cells including inflammatory monocytes and neutrophils mostly in blood and spleen in anti-Gr1-treated mice (Figure 2B and Supp. Figure 2A). Despite this reduction, no difference in T-ALL burden in the BM and even a slight increase was noted in blood and spleen (Figure 2C).

Unlike anti-Gr1, anti-Ly6G has the advantage to target neutrophils specifically<sup>33</sup>. Anti-Ly6G has commonly been associated with a lower efficiency but higher specificity than anti-Gr1 to deplete neutrophils<sup>34</sup>. When applying the same protocol as for anti-Gr1 treatment (Figure 2D), a selective decrease (2-fold) of blood and spleen neutrophils was observed after anti-Ly6G treatment (Figure 2E and Supp. Figure 2B). Consistently with anti-Gr1 results, neutrophils depletion did not impact T-ALL burden in the blood, BM and spleen (Figure 2F). Furthermore, neutrophil depletion neither modified the inflammatory molecules secreted in the plasma of anti-Ly6G-treated mice (Figure 2G and Supp. Figure 2C).

Since neutrophil depletion was not complete with 3 injections of anti-Ly6G antibody, we evaluated the effect of a daily treatment with anti-Ly6G over 5 days from day 7 to day 11 on T-ALL burden and survival of mice. We found that greatest neutrophil depletion did not modify the survival of anti-Ly6G-treated mice that succumbed of T-ALL at similar time and with identical T-ALL burden compared to isotype-treated mice (Figure 2H and data not shown).

These results demonstrate that neutrophils are dispensable for T-ALL progression *in vivo* and suggest that other cell types such as resident monocytes and/or macrophages, likely contribute to T-ALL growth.

### **Phagocytic myeloid cells support T-ALL progression without modulating the molecular plasma microenvironment and mice survival**

Based on our previous findings that the increase of blood resident monocytes was correlated with the T-ALL growth *in vivo*, we hypothesized that resident monocytes would contribute to T-ALL progression. Hence, we used clodronate liposomes that are known to deplete all phagocytic cells including resident monocytes and macrophages<sup>35</sup>. The same protocol as anti-Ly6G treatment was applied and T-ALL#1 burden was assessed after clodronate or vehicle treatment (Figure 3A). In clodronate-treated mice, resident monocytes and macrophages significantly decreased without affecting inflammatory monocytes and neutrophils levels in

blood, BM and spleen (Figure 3B and Supp. Figure 3A). Macrophages and resident monocytes depletion strikingly diminished T-ALL#1 burden in all tested cell compartment (Figure 3C). Nevertheless, depleting specific phagocytic cells from mice with established T-ALL was not sufficient to decrease molecular plasma secretions or to impact mice survival (Figures 3D-E and Supp. Figure 3B). These results demonstrate that leukemia associated resident monocytes and macrophages support established T-ALL progression *in vivo*. However, the phagocytic cell-mediated decreased T-ALL burden was not sufficient to decrease the molecular plasma microenvironment and the mice survival was unchanged, indicating that they play significant but not major role in supporting T-ALL.

### **NECA targets the cellular microenvironment and prevents leukemia-associated inflammation**

Experimental studies have shown that adenosine receptor (AR) agonists are promising pharmacological modulators of disease-associated inflammation and immune responses<sup>36</sup>. Adenosine is known to mediate anti-inflammatory effects via the adenosine A2a receptor (A2aR)<sup>37</sup>. Based on our results, it appears that mice injected with T-ALL#1 and T-ALL#2 significantly increase blood neutrophils and inflammatory molecules. However, targeted depletion of neutrophils or resident monocytes does not significantly impact inflammatory molecule levels or confer a survival benefit to the leukemic mice. To uncouple the effects of inflammatory factors induced by leukemia from the inflammatory cells on T-ALL progression, we treated T-ALL-transplanted mice with 5'-(N-ethyl-carboxamido)adenosine (NECA), a non-selective adenosine receptor agonist, known to decrease inflammatory factors secretion<sup>38-40</sup>. To exclude a direct interaction between NECA treatment and T-ALL, we first treated T-ALL#1 or T-ALL#2 cells *in vitro* with increasing NECA doses. T-ALL#1 and T-ALL#2 cells were counted by FACS analysis at different time points. Overall, similar T-ALL growth were obtained with or without NECA treatment suggesting that NECA may not act directly on T-ALL cells growth (Figure 4A and Supp. Figure 4D), although we cannot exclude that MS5 stromal cells, used in this co-culture assay, had captured NECA, limiting its effects on T-ALL. We also measured the expression levels of A2aR in T-ALL#1 from transplanted mice compared to BM and blood cells and observed that A2aR levels were extremely low on T-ALL#1 cells compared to control total BM cells especially compared to myeloid cells (Figure 4B and Supp. Figure 4A), further suggesting leukemic cells may not be targeted directly by NECA. Next, we applied a similar

injection protocol as previously used with antibody experiments and treated mice transplanted with T-ALL with NECA (Figure 4C).

As expected from the fact that A2aR stimulation inhibits the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B subsequently suppressing the expression of pro-inflammatory cytokines<sup>37</sup>, NECA-treated mice exhibited a strong reduction of the inflammatory molecular response observed in T-ALL models (Supp. Figures 1D and 1G). In particular HGF was firmly decreased (12.3-fold) as were Serpin E1 (6.3-fold), CXCL13 (3.5-fold) and MMP-9 (6-fold) (Figure 4D and Supp. Figure 4B). In NECA-treated mice after T-ALL#2 injection, we also observed a decrease in several inflammatory molecules, though it was much more limited, with a 2-fold decrease of HGF for instance and not clearly significant decrease of Serpin E1, CXCL13 and MMP-9 (Figure 4E and Supp. Figure 4E). On the cellular level, NECA treatment induced a decrease of blood and spleen percentage of neutrophils and a slight not significant decrease of blood monocytes (Supp. Figure 4C).

Collectively these data show that NECA slightly modifies the cellular microenvironment of T-ALL and inhibits the molecular inflammatory environment induced by the leukemia *in vivo*.

### **Effect of NECA on T-ALL progression**

To understand the impact of NECA on T-ALL growth *in vivo*, we analyzed T-ALL cells levels and viability in the blood, BM and spleen. NECA treatment of T-ALL#1 mice significantly diminished the weight of spleen associated with a decrease of T-ALL#1 burden in blood, BM and spleen at day 14 (Figures 5A-C). Furthermore, NECA treatment (4 injections between day 7 and day 15) conferred a low but significant survival benefit, as NECA-treated mice succumbed from leukemia 3 days after the last NECA injection (day 18) with T-ALL invasion in blood, BM and spleen (Figure 5D and Supp. Figure 5A). Interestingly, transplantation of BM T-ALL cells from NECA-treated T-ALL or control mice showed that all secondary recipient mice died at the same time, regardless of the leukemic cell origin, on average after 14 days (Supp. Figure 5D). It suggests that NECA treatment did not induce specific intrinsic modifications on T-ALL cells but rather triggered a transient response of leukemic cells to the microenvironment changes.

To validate that the impact of NECA treatment was not specific to the NOTCH1-driven T-ALL#1 model, mice injected with T-ALL#2 were also treated with NECA, starting when the first T-ALL#2 cells were detected in the blood until sacrifice (day 36). In this model NECA also induced a reduction of T-ALL burden although, and maybe in accordance with the lowest decrease in

the molecule production (Figure 4E and Supp. Figure 4E), this was only significant in the BM compartment (Supp. Figure 5E).

To understand the NECA-induced loss of T-ALL cells in treated mice, we investigated the proliferation and apoptosis of T-ALL#1 cells after NECA treatment in BM and spleen. In both organs, T-ALL#1 cells were less activated in NECA-treated mice, with lower proliferating Ki-67<sup>+</sup> cells and conversely higher leukemic cells in the G0 cell cycle phase (Figure 5E and Supp. Figure 5B). Besides, higher levels of apoptotic Annexin V<sup>+</sup> leukemic cells were measured although only significant in the spleen (Supp. Figure 5C).

Altogether, these findings utilizing NECA treatment in two T-ALL model demonstrate that targeting the inflammatory microenvironment triggers a decrease of T-ALL cells by reducing their proliferation and blocking them in G0 phase allowing a survival benefit of T-ALL mice.

#### **NECA treatment decreases inflammatory pathways activation in T-ALL cells and identifies HGF as a potential molecular actor in T-ALL.**

To gain insight into the molecular regulation of NECA dependent inflammation in T-ALL, we investigated gene expression in T-ALL cells isolated from BM of NECA or vehicle-injected mice on day 14 of disease. Principal component analysis (PCA) showed that NECA treatment induced transcriptional difference between samples. In the PCA score plot, the two groups were well separated with 89.2% total variances including principal component (PC) 1 (84.4%) and PC 2 (4.8%) indicating that NECA treatment induces the alteration of various gene panels in T-ALL cells (Figure 6A) similarly indicated in the heatmap showing at least 2-fold differentially expressed genes in both condition (Figure 6B). Gene set enrichment analysis (GSEA) revealed overrepresentation of genes associated with KRAS signaling, type I (interferon alpha), and type II (interferon gamma) responses in vehicle-treated mice (Figure 6C). Several studies showed KRAS as a pro-inflammatory tumor microenvironment modulator and interferons response are well identified in several inflammatory pathways<sup>41–43</sup>. The transcriptional decrease of inflammatory response in NECA-treated T-ALL cells is consistent with the reduced inflammatory environment and T-ALL progression observed in NECA-treated mice (Supp. Figure 4D and Figure 5C). We found canonical pathways associated with the inflammatory response and cell cycle using ingenuity pathways analysis (IPA) system with a threshold of  $-\text{Log}(P\text{-value}) > 2,110$  and a Benjamini-Hodgberg corrected p-value  $< 0,05$  (Supp. Figure 6A). Interestingly, pathway analysis showed that HGF signaling was among the top

pathways preferentially inhibited in T-ALL#1 from NECA-treated mice (Figure 6D). This result was associated with a major decrease of HGF in the plasma of NECA-treated mice by cytokine array (Figure 4D). Consistent with this, quantification analysis of HGF in the mouse plasma showed that HGF was increased by 68-fold with T-ALL disease and decreased by 22-fold after NECA treatment (Figure 6E). Experiments were then performed to test if the HGF signaling pathway could be a major actor to activate T-ALL cells. Flow cytometry analysis and western blot showed that T-ALL cells express cMet, the HGF receptor, indicating that this growth factor could interact with T-ALL#1 cells (Figure 6F and Supp. Figure 6B).

To determine the eventual clinical impact of circulating HGF levels, cytokine array analysis was performed on plasma of T-ALL patients compared to healthy donors. Interestingly, HGF was detected among the 20 most increased inflammatory molecules in plasma of T-ALL patients compared to controls (Figure 6G), although its increase was not major.

Collectively, these studies indicated that diminishing the inflammatory microenvironment with NECA treatment in T-ALL mice regulates several pathways associated with cancer-induced inflammation including HGF/cMet signaling interrogating on the role of this pathway in T-ALL progression.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics statements**

#### ***Mice***

All mice were housed and bred in CEA, Fontenay-aux-Roses, France, in a conventional animal facility (registration number C9203202) and handled in compliance with French Ministry of Research. Experimental procedures were performed in accordance with the European Community Council Directive (EC/2010/63) and were approved by the Ethics Committee (APAFIS#20682-2019051615369428 v2). All experiments were performed on 8 to 16 week-old-female mice with a C57BL/6 background.

#### ***Human T-ALL***

4 primary T-ALL cell samples were collected after obtaining informed consent by the patients or the patient's relatives in accordance with the Declaration of Helsinki and French ethics regulations. Blood cells were ficolled, plasma were collected and stored at -80°C. Authorization was obtained from the INSERM ethical committee (KGM-13-16).

### **T-ALL mouse models**

#### ***Notch1 induced T-ALL model (T-ALL#1)***

T-ALL#1 cells were generated as described in <sup>27,28,44</sup>. Hematopoietic progenitors from C57BL/6 BM had been genetically modified using retroviral expression vectors containing intracellular domain of NOTCH1 (ICN1) construct followed by an IRES GFP reporter. ICN1/T-ALL#1 cells were kindly provided by Dr J Ghysdael, Institut Curie, Orsay. To perpetuate T-ALL#1,  $1.5 \cdot 10^4$  T-ALL#1 GFP<sup>+</sup> cells were injected intravenously (i.v.) via retro-orbital injection into syngeneic immunocompetent wild type CD45.2 C57BL/6 littermates (weight, 18-25 g) after being anesthetized with isoflurane. The viability of T-ALL#1 cell suspension was assessed by flow cytometry with Zombie Aqua Viable dye (423102, BioLegend) prior to the injection. Mice were euthanized upon the detection of disease signs such as arched back, weight loss, disheveled hair, or at indicated timepoints by cervical dislocation. At sacrifice, up to 1ml of blood was recovered in Anticoagulant Citrate Dextrose (ACD-A, Macopharma), femurs were taken and flushed in PBS, spleens and livers were weighed, crushed and filtered to remove debris. Red cells from all samples were lysed with ACK Lysing Buffer (A10492-01, Gibco) following manufacturer's protocol and filtered with 80µm diameter nylon filters to remove debris.



Plasma was recovered after centrifugation of blood samples at 5000 rpm for 5 minutes at 4°C, and supernatant aliquots were frozen at -80°C.

### ***TAL1/LMO1 model (T-ALL#2).***

C57BL/6J mice harboring either the *pSIL/SCL* mutation inducing overexpression of human TAL1 oncogene<sup>31</sup> or the *lck<sup>Pr</sup> Ttg-1* resulting in the overexpression of human LMO1 oncogene<sup>45</sup> were bred in CEA mouse experimentation housing facility following ethic committee recommendation, in ventilated cages. Mice were provided by Pr. V. Asnafi, Necker Hospital, Paris, France. Genotyping of the mice were done using PCR with primers in Table 1. When mice developed T-ALL symptoms they were sacrificed and their BM, spleen, thymus, lymph nodes were collected, followed by surface marker phenotyping to characterize the T cell differentiation origin of the T-ALL cells. Cells (named T-ALL#2) were conserved in frozen vials, in 90% Fetal Calf Serum (FCS) and 10% DMSO solution (Sigma Aldrich), and injected into CD42.1.2 C57BL/6 recipient mice. At sacrifice, organs were collected and processed as described for TALL#1.

### **In vivo treatments of mice**

#### ***Neutrophils depletion***

Neutrophil depletion was performed using 100µg intraperitoneal (i.p.) injection of either anti-Gr1 (clone RB6-8C5, Bio X Cell) or anti-Ly6G (clone 1A8, Bio X Cell) depleting antibodies or the equivalent quantity of isotype control rat, IgG2b (clone: LTF-2, Bio X Cell, sham control) every 3 days, corresponding to a total of 3 injections/mouse, between day 7 and day 13 after T-ALL#1 injection. For the survival curve experiment, 100µg of anti-Ly6G depleting antibody was injected daily for 5 days between day 7 and day 11. Neutrophil depletion and T-ALL#1 progression were assessed at day 14.

#### ***NECA treatments***

5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosine (NECA) (E2387, Sigma Aldrich) adenosine receptor agonist was resuspended in DMSO at a concentration of 14mg/ml and aliquoted at -20°C following manufacturer's recommendation. 1µg/20g of mice of NECA or the equivalent quantity of DMSO was injected via i.p. route (diluted in 100µl PBS) every 3 days for a total of 3 injections between day 7 and day 13 after the T-ALL#1 injection. For the survival curve protocol, a 4<sup>th</sup> injection of NECA was done at day 15 in T-ALL#1 mice. Every mouse was sacrificed at day 14

for T-ALL#1. For T-ALL#2 model, NECA was injected 3 times a week from day 14 until day 35, providing a total of 10 injections. Mice were sacrificed at day 36.

### ***Phagocytes depletion***

Clodronate-liposomes and phosphate-buffered saline (PBS)-liposomes were purchased from LIPOSOMA (C-010). 200µl of a 5mg/ml liposome solution were injected i.p. every 3 days for a total of 3 injections between day 7 and day 13 after T-ALL#1 injection according to published study<sup>35</sup>. Mice were either sacrificed at day 14 or followed up for survival.

Both treated and vehicle-treated mice in each experiment were not kept after day 14 for T-ALL#1 model and day 36 for T-ALL#2 model and blood, BM, spleen and liver were then harvested. Leukemic progression and modulation of immune cell populations were assessed on Canto II (Beckton Dickinson) or LSR II (Beckton Dickinson) flow cytometers.

### **Secreted molecules level measurements**

#### ***Mice***

*Cytokine array analysis.* A pool of plasma from 2 to 4 mice was loaded on the membrane of the Proteome Profiler Mouse XL cytokine Array (ARY028, R&D systems) following the manufacturer's recommendations. Chemiluminescence signal was quantified using Gbox (Syngene) device. The analysis of the spots intensities and background noise removal was performed using ImageQuant TL software (Version 8.1, GE Healthcare). Each spot intensity was quantified as duplicates and the mean calculated. The relative levels were calculated dividing the intensity of the signal obtained for each tested molecule by the intensity of positive control pre-loaded spots. The fold increase/decrease was calculated by dividing the relative quantification of each molecule in every tested pool of plasma from treated mice by the relative quantification of each molecule in the pooled plasma of control mice.

*Multiplex analysis.* The Luminex Discovery assay Mouse premixed multi-analyte kit was utilized (LXSAMSM-03, R&D systems) for mouse plasma samples, delivering concentrations of murine HGF in ng/ul. HGF quantification of each samples was independently acquired using Bio-Plex 200 system (LX10016187401, BioRad) device. The monthly validation was successfully achieved using the Bio-Plex kit 4.0 (171203001, BioRad) and the calibration was set using Bio-Plex Calibration kit (17120360, BioRad) prior to sample quantification. Data were acquired and analyzed using the Bio-Plex Manager software (Version 6.1.1, BioRad).

## **Human**

*Cytokine array analysis.* The plasma of 4 T-ALL patients (age 6 to 14 years old) were collected by the Pediatric Hematology clinicians of Hôpital Armand Trousseau, Paris, France, providing informed consent by the patient or the patient's relatives in accordance with the declaration of Helsinki and French ethics regulation. Plasma from 2 healthy donors (age 25 and 27 years old) was obtained with informed consent. Each human plasma sample was loaded independently on a membrane of the Proteome Profiler Human XL Cytokine Array (ARY022B, R&D systems) following the manufacturer's recommendations and background noise removal.

## ***In vitro* co-culture of T-ALL cells**

MS5 BM-derived stromal cells were cultured in  $\alpha$ MEM (32561-029, Gibco) complemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (F9665, Sigma Aldrich), 1% Penicillin Streptomycin (15140-122, Gibco) and 1% L-Glutamine (25030-024, Gibco).  $1 \cdot 10^5$  T-ALL#1 or T-ALL#2 cells were seeded on a confluent layer of MS5 cells in RPMI 1640 (31870-025, Gibco, Life Technology, France) complemented with 10% FBS (F9665, Sigma Aldrich), 1% Penicillin Streptomycin (15140-122, Gibco) and 1% L-Glutamine (25030-024, Gibco) in a 24-well plate (3524, Corning). Culture medium was complemented with NECA (0.1, 1 and 10  $\mu$ M). Cell growth was assessed by counting T-ALL cells 2 and 5 days after culture initiation by flow cytometry.

## **Flow cytometry and cell sorting**

Blood, BM and spleen cells were stained with indicated antibodies at 4°C in the dark for 30 minutes. Every antibody was diluted at 1:500. Flow cytometry antibodies were listed in Table 2. Following staining, cells were washed in PBS and resuspended in 300 $\mu$ l PBS. Cells were characterized using Canto II or LSR II flow cytometers (both BD Bioscience).

*Cell sorting* was performed with BM cells stained with anti-CD45 APC antibody (clone 30-F11, eBioscience) and dead cells were removed using HOECHST staining. HOECHST<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> cells were sorted using Aria or Influx cell sorting cytometers (both BD Biosystem).

*Cell cycle analysis* was done using  $1-2 \cdot 10^6$  of T-ALL#1 cells from BM and spleen stained with anti-CD4 PerCP/Cyanine 5.5 (clone GK1.5, eBioscience) and anti-CD8a APC (clone 53-6.7, BD pharmingen) for 40 minutes at 4°C. Following surface marker staining, cells were washed and permeabilized using BD Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup> (BD Biosciences) according to the

manufacturer's protocol. Cells were then incubated with anti-Ki67 PE antibody (51-36525X, BD Bioscience) or with isotype PE (51-35405X, BD Bioscience) and with 40µg/ml HOECHT 33342 (H3570, Invitrogen) and cell cycle entry/ DNA content were measured.

*Apoptosis levels* were quantified in T-ALL#1 BM and spleen cells. Cell suspension was first washed with Annexin V binding buffer (51-66121E, BD Pharmingen) according to manufacturer's protocol, then incubated with APC-Annexin V (640920, BioLegend) for 15 min at room temperature (RT) and afterwards with HOECHST 33258 1,25 µg/ml final concentration (H3569, Invitrogen).

### **Microarray analysis.**

Up to  $2 \times 10^6$  T-ALL#1 GFP<sup>+</sup> cells were sorted from femurs of NECA or vehicle-treated T-ALL mice using the Influx cell sorter and mRNA was extracted directly after sorting using the RNeasy Plus Mini kit (74134, QIAGEN). The quality of the RNA was acquired using the RNA 6000 Pico Labchip Kit (5067-1513, Agilent) providing RNA Integrity Number (RIN) of 10 for each sample used for the microarray. Each sample RNA was then processed to micro-array analysis using GeneChip Whole Transcript Pico Reagent Kit expression array (902622, ThermoFisher) for amplification and Biotin incorporation and was further loaded onto Clariom D array Mouse Cartridge (520851, Applied Biosystem) for gene expression assessment. Data were then analyzed by Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) plot were generated using GSEA 4.0.3 software and identification of pathways with Ingenuity (Ingenuity Pathway Analysis, IPA).

### **Capillary electrophoresis immunoassay (Simple Western)**

Total proteins from T-ALL#1 cells were extracted with a RIPA buffer containing a cocktail of 1X protease inhibitors (11836145001, Roche) and 1X phosphatase inhibitors (P2850; P5726, Sigma-Aldrich). After 5 min denaturation at 95°C in the presence of 5X Fluorescent Master Mix (PS-FL01-8, ProteinSimple), samples were assayed on a ProteinSimple Wes automated capillary-based electrophoresis instrument with Wes Separation Module protocol (ProteinSimple). The 12-230 kDa Separation Module 8 x 25 capillary cartridges (SM-W004, ProteinSimple) and the Anti-Rabbit Detection Module (DM-001, ProteinSimple) were used. Proteins were detected using rabbit primary antibodies listed in Table 3. Results (peak area) were analyzed using Compass for SW software v5.0.1.

### **Statistical analysis**

Data are presented as Mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were performed with Mann-Whitney non-parametric test, in accordance with data distribution. Mouse survival curves were obtained using the Kaplan-Meier statistics and log-rank Mantel-Cox statistical test was applied comparing treated or untreated conditions. Correlation analysis was performed using Person's r correlation coefficient. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software,CA).

### **Acknowledgements**

We are grateful to the staff of the iRCM animal platform and to N. Dechamps and J. Baijer of the iRCM cytometry and cell sorting platform, for their help in experiments. The authors thank J. Ghysdael and C. Tran Quang for providing ICN1/T-ALL#1 cells and C. Smith and V. Asnafi for LMO1tg/ SIL-TAL1tg mouse models. We acknowledge Dr Aplan for giving his authorization to use the TAL1-LMO1 mice. The authors would like also to thank the human donors for allowing the use of their plasma in our research, and the clinical teams, in particular P. Ballerini and A. Petit, from the Pediatric Hematology Department of the Hôpital A Trousseau in Paris, for their continuous help in our projects. Microarray experiments were greatly facilitated by D. Lewandowski.

### **Author contributions**

CLM and LF performed experiments. CLM, LF, BU and VP analyzed data. CLM and MLG analyzed microarrays experiments. VB, CD and CD assisted with animal experiments. JC gave valuable advices during experiments. BU, VP and FP conceived and followed up the project. CLM, VP and FP wrote the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript.

### **Funding**

This work was supported by INSERM, CEA, Université Paris Cité and Université Paris Saclay, the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC, équipe labellisée) and Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). Manon Hope association also contributed to this work. CLM is a PHD student funded by the French Ministry of Research and LNCC.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

**Table 1:** List of PCR primers

	Primers for TAL1 and LMO1 constructions	
	Forward	Reverse
TAL1 transgene	5'-CACAGGGTCCTTGCCAGTC-3'	5'-CTACCCTGCAAACAGACCTC-3'
LMO1 transgene	5'-CGGGATCCGAGATGATGGTGCTGG-3'	5'-CCCAAGCTTACTGAACTTGGCATTCAAAGG-3'

**Table 2:** List of antibodies used in flow cytometry

Antigen	Clone	Source
B220-V500	RA3-6B2	BD Bioscience
CD115-PE	ASF98	BioLegend
CD115-PE/Cyanine 7	ASF98	BioLegend
CD11b-BV605	M1/70	BioLegend
CD11b-PECyanine 7	M1/70	BioLegend
CD25-BV421	PC61	BioLegend
CD3-PerCP/Cyanine5.5	145-2C11	BioLegend
CD44-APC/Cyanine 7	IM7	BioLegend
CD45.1-APC	A20	BioLegend
CD45.2-FITC	104	BioLegend
CD4-BV421	GK1.5	BioLegend
CD4-PerCP/Cyanine 5.5	GK1.5	BioLegend
CD8a-APC	53-6.7	eBioscience
CD8a-PE	53-6.7	BD pharmingen
cMet-PE	eBioclone 7	Invitrogen eBioscience
F4/80-AF700	BM8	BioLegend
Gr1-PerCP/Cyanine 5.5	RB6-8C5	BioLegend
Ly6C-APC	HK1.4	Invitrogen
Ly6C-BV711	HK1.4	BioLegend
Ly6G-BV421	1A8	BioLegend

**Table 3:** List of antibodies used in Simple Western

Antigen	Clone	Reference	Supplier
cMet	E4E4W	82202S	Cell Signaling Technology
GAPDH	14C10	2118	Cell Signaling Technology

**References:**

1. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577.
2. Patel AA, Thomas J, Rojek AE, Stock W. Biology and Treatment Paradigms in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Older Adolescents and Adults. *Curr Treat Options Oncol.* 2020;21(7):57.
3. Pui C-H, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2006;354(2):166–178.
4. Hefazi M, Litzow MR. Recent advances in the biology and treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Lymphat Cancer.* 2018;8:47–61.
5. McMahon CM, Luger SM. Relapsed T Cell ALL: Current Approaches and New Directions. *Curr Hematol Malig Rep.* 2019;14(2):83–93.
6. Aplan PD, Jones CA, Chervinsky DS, et al. An *scl* gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *The EMBO Journal.* 1997;16(9):2408–2419.
7. Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(8):494–507.
8. Gianni F, Belver L, Ferrando A. The Genetics and Mechanisms of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020;10(3):a035246.
9. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science.* 2004;306(5694):269–271.
10. Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood.* 2017;129(9):1113–1123.
11. Shiraz P, Jehangir W, Agrawal V. T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia—Current Concepts in Molecular Biology and Management. *Biomedicines.* 2021;9(11):1621.
12. Armstrong F, de la Grange PB, Gerby B, et al. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood.* 2009;113(8):1730–1740.
13. Scupoli MT, Vinante F, Krampera M, et al. Thymic epithelial cells promote survival of human T-cell acute lymphoblastic leukemia blasts: the role of interleukin-7. *Haematologica.* 2003;88(11):1229–1237.
14. Triplett TA, Cardenas KT, Lancaster JN, et al. Endogenous dendritic cells from the tumor microenvironment support T-ALL growth via IGF1R activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016;113(8):.
15. Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C, et al. CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* 2015;27(6):769–779.

16. Pitt LA, Tikhonova AN, Hu H, et al. CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance. *Cancer Cell*. 2015;27(6):755–768.
17. Uzan B, Poglio S, Gerby B, et al. Interleukin-18 produced by bone marrow-derived stromal cells supports T-cell acute leukaemia progression. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):821–834.
18. Silva A, Laranjeira ABA, Martins LR, et al. IL-7 Contributes to the Progression of Human T-cell Acute Lymphoblastic Leukemias. *Cancer Research*. 2011;71(14):4780–4789.
19. Giles FJ, Krawczyk J, O’Dwyer M, Swords R, Freeman C. The role of inflammation in leukaemia. *Adv Exp Med Biol*. 2014;816:335–360.
20. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539–545.
21. Liu J, Lin PC, Zhou BP. Inflammation Fuels Tumor Progress and Metastasis. *Curr Pharm Des*. 2015;21(21):3032–3040.
22. Kebelmann-Betzing C, Körner G, Badiali L, et al. Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor ALL. *Cytokine*. 2001;13(1):39–50.
23. Zhang P, Qin M, Wang Y, et al. Inflammation accelerates BCR-ABL1+ B-ALL development through upregulation of AID. *Blood Adv*. 2022;6(13):4060–4072.
24. Saint Fleur-Lominy S, Maus M, Vaeth M, et al. STIM1 and STIM2 Mediate Cancer-Induced Inflammation in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cell Reports*. 2018;24(11):3045–3060.e5.
25. Lyu A, Triplett TA, Nam SH, et al. Tumor-associated myeloid cells provide critical support for T-ALL. *Blood*. 2020;136(16):1837–1850.
26. Calvo J, Fahy L, Uzan B, Pflumio F. Desperately seeking a home marrow niche for T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Advances in Biological Regulation*. 2019;74:100640.
27. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269–271.
28. Pui JC, Allman D, Xu L, et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*. 1999;11(3):299–308.
29. Izon DJ, Punt JA, Xu L, et al. Notch1 Regulates Maturation of CD4+ and CD8+ Thymocytes by Modulating TCR Signal Strength. *Immunity*. 2001;14(3):253–264.
30. Annels NE, Willemze AJ, van der Velden VHJ, et al. Possible link between unique chemokine and homing receptor expression at diagnosis and relapse location in a patient with childhood T-ALL. *Blood*. 2004;103(7):2806–2808.
31. Aplan PD, Jones CA, Chervinsky DS, et al. An *scl* gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *The EMBO Journal*. 1997;16(9):2408–2419.
32. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol*. 1993;151(5):2399–2408.
33. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*. 2008;83(1):64–70.
34. Wojtasiak M, Pickett DL, Tate MD, et al. Gr-1+ cells, but not neutrophils, limit virus replication and lesion development following flank infection of mice with herpes simplex virus type-1. *Virology*. 2010;407(1):143–151.
35. Lyu A, Triplett TA, Nam SH, et al. Tumor-associated myeloid cells provide critical support for T-ALL. *Blood*. 2020;136(16):1837–1850.



36. Franco R, Rivas-Santisteban R, Navarro G, Reyes-Resina I. Adenosine Receptor Antagonists to Combat Cancer and to Boost Anti-Cancer Chemotherapy and Immunotherapy. *Cells*. 2021;10(11):2831.
37. Morello S, Sorrentino R, Pinto A. Adenosine A2a receptor agonists as regulators of inflammation: pharmacology and therapeutic opportunities. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*. 2009;
38. Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol*. 2005;174(2):1073–1080.
39. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood*. 2008;112(5):1822–1831.
40. Ondrackova P, Kovaru H, Kovaru F, et al. The effect of adenosine on pro-inflammatory cytokine production by porcine T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2012;145(1–2):332–339.
41. Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(5):817–822.
42. Kopitar-Jerala N. The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Front Immunol*. 2017;8:873.
43. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163–189.
44. Aster JC, Xu L, Karnell FG, et al. Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by notch1. *Mol Cell Biol*. 2000;20(20):7505–7515.
45. McGuire EA, Rintoul CE, Sclar GM, Korsmeyer SJ. Thymic overexpression of Ttg-1 in transgenic mice results in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Mol Cell Biol*. 1992;12(9):4186–4196.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Mouse syngenic models of T-ALL increase blood neutrophils, resident monocytes and inflammatory molecule secretion in the plasma.**

A) Flow cytometry analysis of T-ALL#1 recovered from bone marrow (BM) at sacrifice. B) Kinetic evolution of the T-ALL#1 cells percent in the blood, BM and spleen at day 7, 10, 11, 13 and 14 after T-ALL#1 injection (log scale). C) Weights of the spleen (left) and liver (right) and their representative size and morphology 14 days after T-ALL#1 injection compared to control mice. (31 spleens and 5 livers of control, 53 spleens and 22 livers of T-ALL#1 mice). D) Correlation between the percent of blood neutrophils (left) or resident monocytes (right) and the percent of blood T-ALL#1 cells. 60 mice are shown (Person's r correlation test was applied). (E) Percent of blood neutrophils (left) and resident monocytes (right) in T-ALL#1 injected mice compared to control mice at day 14. Shown are the mean  $\pm$  SEM of 19 control and 51 T-ALL#1 mice. Fold increase detection of mouse HGF, Serpin E1, CXCL13 and MMP-9 identified by cytokine array in plasma samples after (F) T-ALL#1 injection (day 14) or (H) T-ALL#2 injection (day 36) compared to control plasma. Each dot represents one cytokine array experiment. 2 plasma samples were pooled for controls in 2 independent experiments. 3 or 4 plasma samples were pooled for T-ALL#1 in 4 independent experiments and 2 plasma were pooled for T-ALL#2 in 1 experiment. (G) Percent of blood neutrophils (left) and resident monocytes (right) in T-ALL#2 (4 mice) injected mice compared to control mice (8 mice) (day 34). Data in C, E and G represent means  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.002$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (two-tailed Mann-Whitney U test).

### **Figure 2: Neutrophil depletion does not impact T-ALL progression, molecule secretion in the plasma or mice survival.**

A) Mice were treated for one week with 3 intraperitoneal injection of 100 $\mu$ g of anti-Gr1 depleting or isotype antibodies between day 7 and day 13 after T-ALL#1 injection and were sacrificed at day 14. B-C) Percentage of myeloid cells (CD11b<sup>+</sup>) B) and T-ALL#1 cells C) in the blood, BM and spleen from anti-Gr1 or isotype-treated mice. The dotted line represents the percentage of cells in non-leukemic control mice (9 control mice and 6 anti-Gr1 treated mice in 2 independent experiments). D) Similar protocol was performed with anti-Ly6G or isotype antibodies. E-F) Percentage of neutrophils E) and T-ALL#1 cells F) in blood, BM and spleen from

anti-Ly6G or isotype-treated mice (6 control mice and 5 anti-Ly6G treated mice in 1 experiment). G) Fold increase detection of HGF, Serpine E1, CXCL13 and MMP-9 in the plasma from anti-Ly6G and isotype-treated mice identified by cytokine array. Each dot represents one cytokine array experiment. 2 plasma samples were pooled for each condition. H) Kaplan-Meier survival curves of T-ALL#1 mice treated with anti-Ly6G or isotype. Intensified neutrophils depletion was performed for survival curves with a daily injection of 100µg anti-Ly6G or isotype antibodies for 5 days between day 7 and day 11 (11 controls and 11 anti-Ly6G treated mice in 2 independent experiments, log-rank Mantel-cox test was applied for statistical analysis). All values represent means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.02$ , \*\* $p < 0.002$ , \*\*\* $p < 0.001$  (two-tailed Mann-Whitney U test).

**Figure 3: Phagocytes depletion with clodronate liposomes decreases T-ALL progression but does not impact molecule secretion in the plasma or mice survival.**

A) Mice were treated for one week with 3 intraperitoneal injections of 1mg of clodronate liposomes or saline liposomes (vehicle) between day 7 and day 13 after T-ALL#1 injection and were sacrificed at day 14. B) Percentage of resident monocytes in the blood, BM and spleen (upper panels) and percentage of macrophages (Gr1<sup>-</sup> CD115<sup>-</sup> F4/80<sup>+</sup> SSC<sup>low</sup>) in the BM and spleen (lower panels) in clodronate or vehicle-treated mice. The dotted line represents the percentage of cells in non-leukemic control mice. C) Percentage of T-ALL#1 cells in clodronate or vehicle-treated mice. (B and C represent 10 mice in each treatment group in 2 independent experiments). D) Fold increase of plasma HGF, Serpine E1, CXCL13 and MMP-9 from clodronate or vehicle-treated mice identified by cytokine array. Each dot represents one cytokine array experiment. 3 plasma samples were pooled for each condition. E) Kaplan-Meier survival curves for T-ALL mice treated with clodronate or vehicle (10 mice in each treatment group in 2 independent experiments, log-rank Mantel-cox test was applied for statistical analysis). All values represent means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.02$ , \*\* $p < 0.003$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  (two-tailed Mann-Whitney U test).

**Figure 4 : NECA acts indirectly on T-ALL cells and decreases molecule secretion in the plasma.**

A) Growth curve of T-ALL cells cultured on MS5 stromal cells in the presence (TALL#1 + NECA) or absence (DMSO alone, T-ALL#1) of 10, 1 or 0,1 µM of NECA. B) Cell surface expression of Adenosine A2a receptor (A2aR) on T-ALL#1 cells, normal BM cells compared to unstained

negative control. C) Mice were treated for one week with 3 intraperitoneal injections of NECA between day 7 and day 13 after T-ALL#1 injection and were sacrificed at day 14. D) Fold decrease of HGF, Serpine E1, CXCL13 and MMP-9 in the plasma from NECA or vehicle-treated mice after T-ALL#1 injection (Each dot represents one cytokine array experiment, 3 or 4 plasma samples were pooled for each condition). Shown are the mean  $\pm$  SEM. E) Fold decrease of HGF, Serpine E1, CXCL13 and MMP9 in the plasma from NECA or vehicle-treated mice after T-ALL#2 injection. 2 plasma samples were pooled for each condition.

**Figure 5 : NECA decreases T-ALL progression and increases mice survival**

A) Spleen weight and representative sizes in NECA and vehicle-treated mice (16 vehicle and 19 NECA treated mice from 4 independent experiments). B) Flow cytometry plots before T-ALL#1 injection, 7 and 14 days after T-ALL#1 injection in the blood, BM and spleen of NECA and vehicle-treated mice. C) Percent of T-ALL#1 cells in the blood, BM and spleen of NECA and vehicle-treated mice (20 vehicle and 22 NECA-treated mice in 6 independent experiments for blood and BM). D) Kaplan-Meier survival curve of NECA and vehicle-treated mice after 4 intraperitoneal injections of NECA between day 7 and day 15 (13 vehicle and 15 NECA-treated mice in 3 independent experiments). Log-rank Mantel-Cox statistical analysis was applied. E) Percent of T-ALL#1 cells in G0 phase by flow cytometry in NECA and vehicle-treated mice (7 vehicle and 8 NECA-treated mice in 2 independent experiments). Data A to C represent means  $\pm$  SEM. Data E are represented with Min to Max box-and-whiskers. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.006$ , \*\*\* $p < 0.006$  (two-tailed Mann-Whitney U test).

**Figure 6 : NECA treatment decreases inflammatory pathways at the transcriptomic level and identifies HGF as a potential molecular actor in T-ALL.**

A) Principal component analysis (PCA) of the transcriptomic profile of T-ALL#1 cells from NECA (blue) or vehicle-treated (red) mice. Clusters are represented in circles. B) Heatmap of the genes expressed with a two-fold difference between NECA or vehicle condition. C) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) positively enriched for vehicle compared to NECA condition. The normalized enrichment score (NES), nominal p-value (NOM p-value) and False Discovery Rates q-value (FDR q-value) are indicated for each GSEA plot. D) HGF signaling pathway identified

significantly decreased in NECA condition by Ingenuity Pathway Analysis (p-value indicates the significance of the pathway and the negative sign of the z-score indicates that the pathway is decreased in the NECA-treated condition). E) Quantification of plasma HGF in control (non-leukemic mice), T-ALL#1 (vehicle-treated mice) or NECA-treated mice (plasma from 3 non-leukemic, 8 vehicle and 9 NECA-treated mice from 3 independent experiments each). F) Expression of cMet (HGF receptor) in T-ALL#1 by flow cytometry. G) Top 20 most increased inflammatory molecules measured by cytokine array in the human T-ALL patients (n=4) or healthy donors (n=2). Data E to G represent means  $\pm$  SEM. \*p<0.02, \*\*\*p<0.0003 (two-tailed Mann-Whitney U test).

## SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

**Supp Figure 1:** A) Kaplan-Meier survival curve of T-ALL#1 injected mice (n=36). 50% of mice deceased at day 14 (dotted line). B) Gating strategy performed by flow cytometry to identify T cells, B cells, neutrophils, inflammatory monocytes and resident monocytes. C) Correlation between the percent of either blood inflammatory monocytes, B cells and T cells and the percent of blood T-ALL#1 cells. The blood of 60 mice are shown (Person's r correlation test was applied). D) Top 20 most increased inflammatory molecules in T-ALL#1 mice plasma measured by cytokine array. 2 plasma samples were pooled for control in 2 independent experiments. 3 or 4 plasma were pooled for T-ALL#1 in 4 independent experiments. The fold increase of each molecule in leukemic mice compared to controls is represented in grey dotted line. E) Typical flow cytometry analysis of T-ALL#2 cells from BM T-ALL#2 injected mice. F) Percent of T-ALL#2 cells in the blood, BM and spleen of T-ALL#2 injected mice at sacrifice (4 or 5 mice). G) Top 20 most increased inflammatory molecules in T-ALL#2 mice plasma measured by cytokine array. Fold increase of each molecule in leukemic mice compared to controls is represented in grey dotted line. 2 plasma samples were pooled for controls in 2 independent experiments and 2 plasma samples were pooled for T-ALL#2 in 1 experiment. All values represent means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  (two-tailed Mann-Whitney U test).

**Supp. Figure 2:** A) Percent of neutrophils, inflammatory monocytes and resident monocytes in anti-Gr1 or isotype-treated mice in blood, BM and spleen (9 control mice and 6 anti-Gr1 treated mice in 2 independent experiments). B) Percentage of resident monocytes and inflammatory monocytes in anti-Ly6G or isotype-treated mice in blood, BM and spleen (6 control and 5 anti-Ly6G treated mice in 1 experiment). C) Top 20 most decreased inflammatory molecules measured by cytokine array in the plasma of anti-Ly6G or isotype-treated mice. Fold decrease of each molecule is represented in grey dotted line. Each dot represents one cytokine array experiment. 2 plasma samples were pooled for each condition in 1 experiment. All values represent means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.02$ , \*\* $p < 0.002$ , \*\*\* $p < 0.001$  (two-tailed Mann-Whitney U test).

**Supp. Figure 3 :** A) Percent of neutrophils and inflammatory monocytes in the blood, BM and spleen (10 mice in each group in 2 independent experiments). B) Top 20 most decreased

inflammatory molecules measured by cytokine array in the plasma of clodronate or vehicle-treated mice. Fold decrease of each molecule is represented in grey dotted line. Each dot represents one independent cytokine array experiment. 3 plasma samples were pooled for each condition. All values represent means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.02$  (two-tailed Mann-Whitney U test).

**Supp. Figure 4 :** A) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of Adenosine A2a receptor (A2aR) associated with blood and BM immune cells (inflammatory monocytes Ly6C<sup>+</sup>, resident monocytes Ly6C<sup>-</sup>, neutrophils, lymphoid cells) compared to T-ALL#1 cells. B-E) Top 20 most decreased inflammatory molecules measured by cytokine array in the plasma of NECA compared to vehicle-treated mice after T-ALL#1 (Each dot represents one independent cytokine array experiment. 3 or 4 plasma are pooled for each condition) (B) or T-ALL#2 injection (2 plasma pooled for each condition) (E). Fold decrease of each molecule is represented in grey dotted line. C) Percent of neutrophils, inflammatory monocytes and resident monocytes in NECA compared to vehicle-treated mice in blood after T-ALL#1 injection (7 control and 8 NECA-treated mice in 2 independent experiments). D) Growth curve of T-ALL#2 cells cultured on MS5 stromal cells in the presence (T-ALL#2 + NECA) or absence (DMSO alone, T-ALL#2) of 10, 1 or 0,1  $\mu$ M of NECA. All values represent means  $\pm$  SEM. \* $p < 0.03$  (two-tailed Mann-Whitney U test).

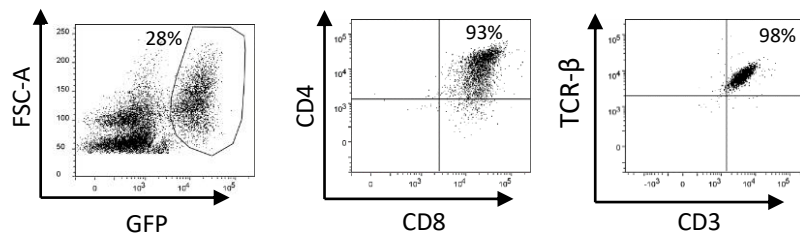
**Supp. Figure 5 :** A) Percent of T-ALL#1 cells 3 days after the last NECA injection (day 18) (related to Figure 5D) (3 NECA-treated mice in 1 experiment). B) Representative flow cytometry plot for cell cycle analysis (left panel) and percentage of proliferating Ki-67<sup>+</sup> T-ALL#1 cells in NECA and vehicle-treated mice (right panel) (7 vehicle and 8 NECA-treated mice in 2 independent experiments). C) Percentage of apoptosis Annexin V<sup>+</sup> T-ALL#1 cells by flow cytometry in NECA and vehicle-treated mice (7 vehicle and 8 NECA-treated mice in 2 independent experiments). D) Experimental procedure of secondary transplantation of BM T-ALL#1 cells (upper panel) and Kaplan-Meier survival curve of secondary transplanted mice from NECA treated or vehicle BM T-ALL#1 cells (lower panel) (8 from vehicle and 6 from NECA-treated mice in 2 independent experiments). E) Percentage of T-ALL#2 cells in blood, BM and spleen of NECA compared to vehicle-treated mice. Data A and E represent means  $\pm$  SEM. Data B and C are represented with Min to Max box-and-whiskers. \* $p < 0.03$ , \*\* $p < 0.003$  (two-tailed Mann-Whitney U test).

**Supp. Figure 6 :**

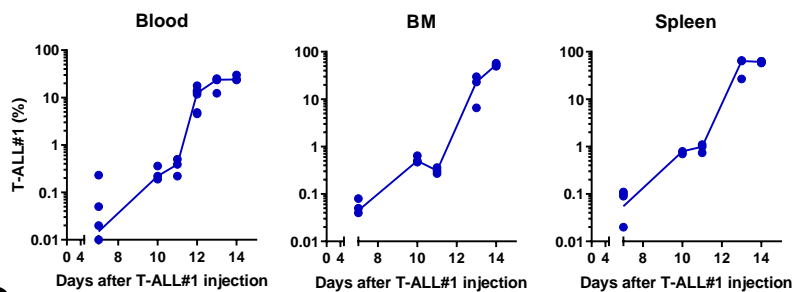
A) Pathways identified by IPA significantly decreased in NECA condition (left) or significantly increased in NECA condition (right). B) Representative western blot showing protein level of cMet in T-ALL#1 cells. GAPDH was used as internal control.



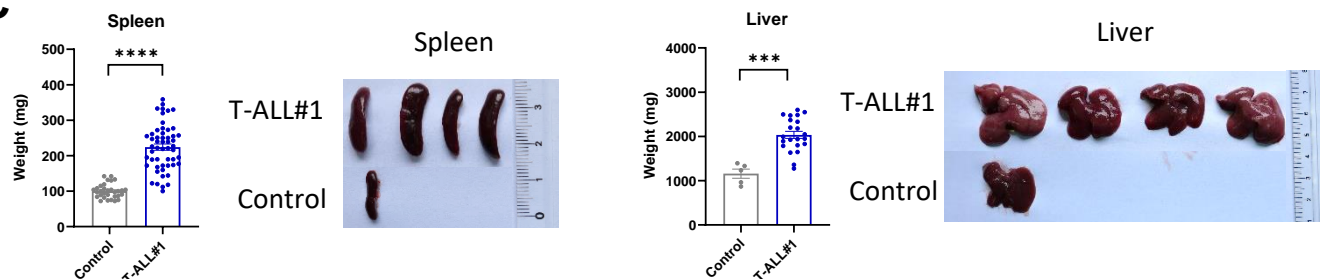
**A**



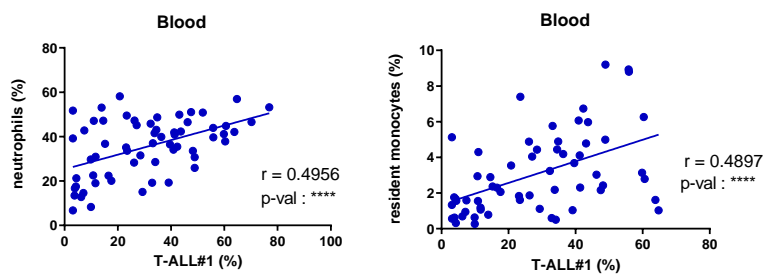
**B**



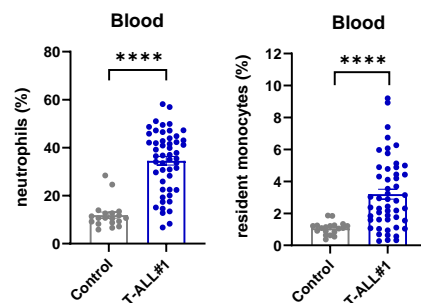
**C**



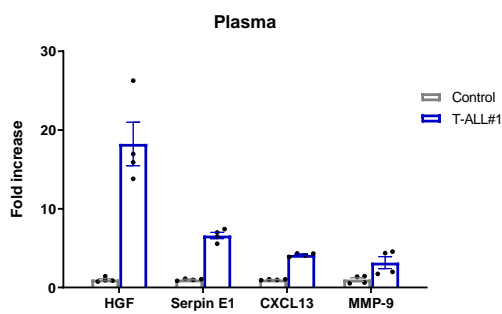
**D**



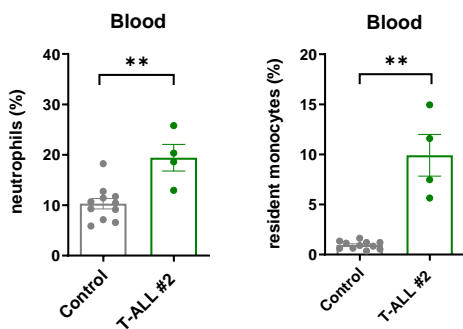
**E**



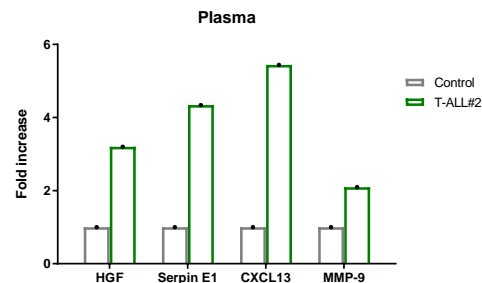
**F**



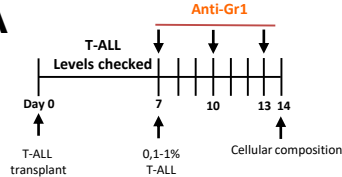
**G**



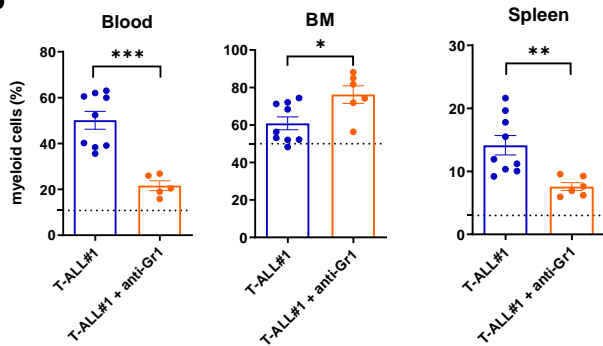
**H**



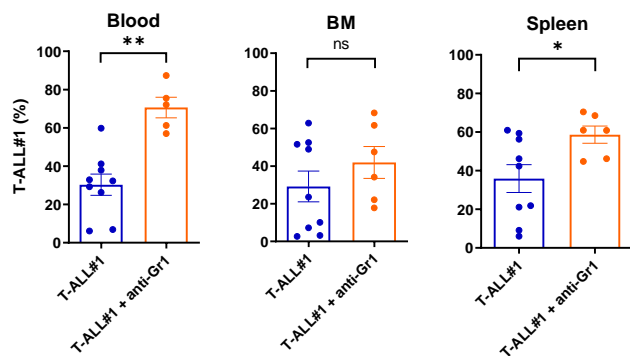
**A**



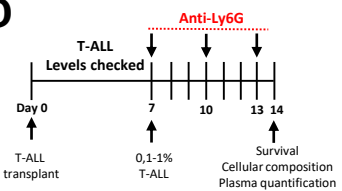
**B**



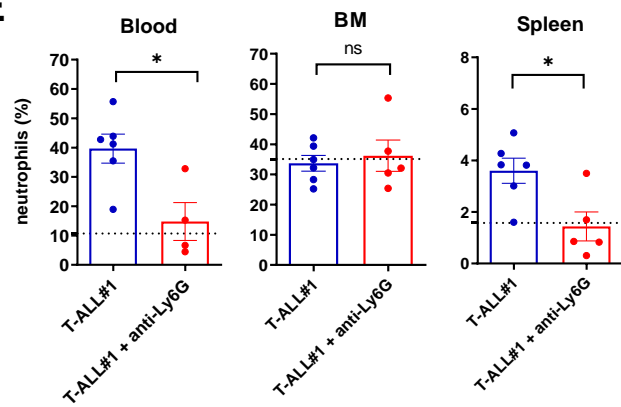
**C**



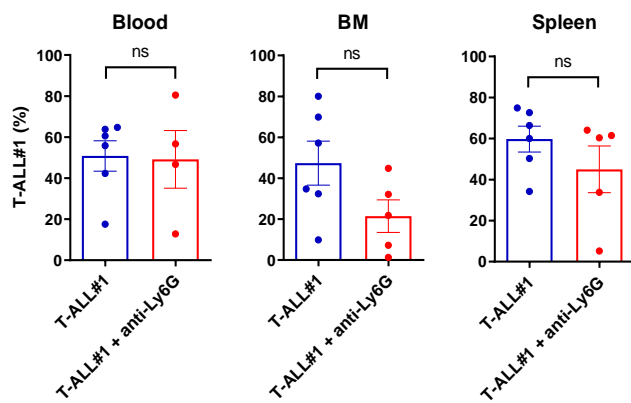
**D**



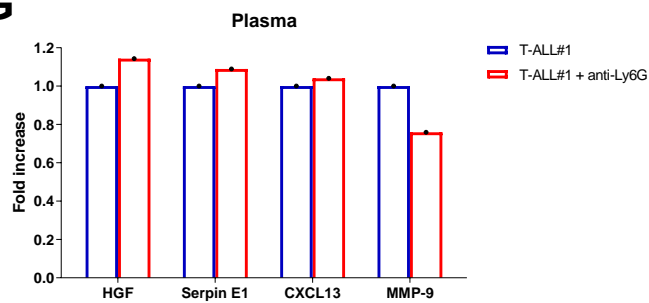
**E**



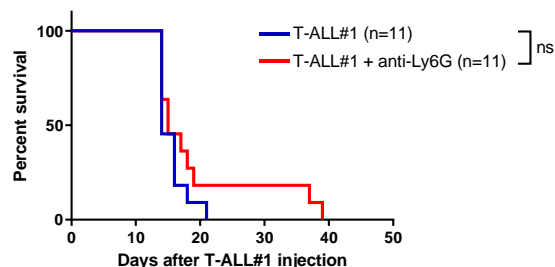
**F**



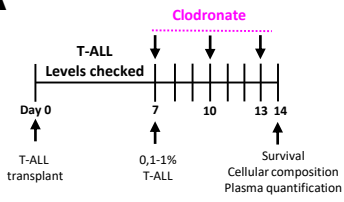
**G**



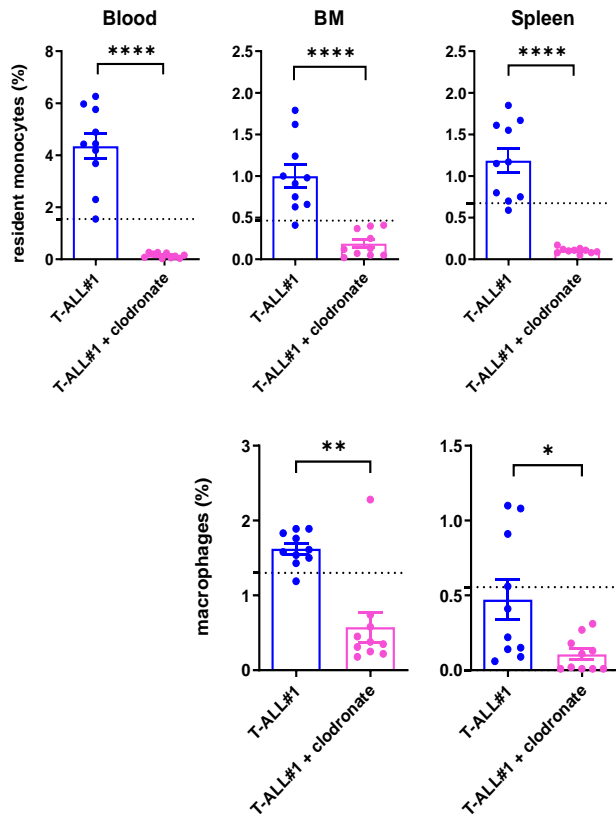
**H**



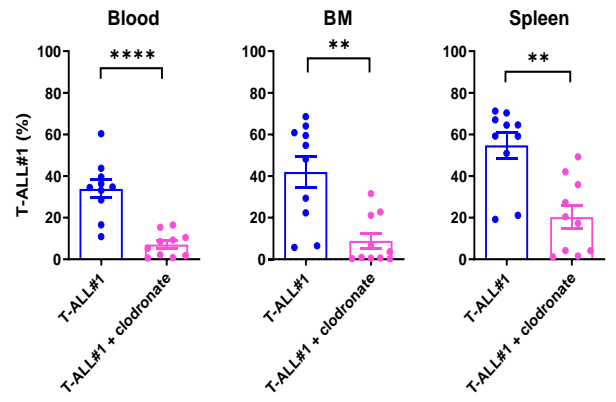
**A**



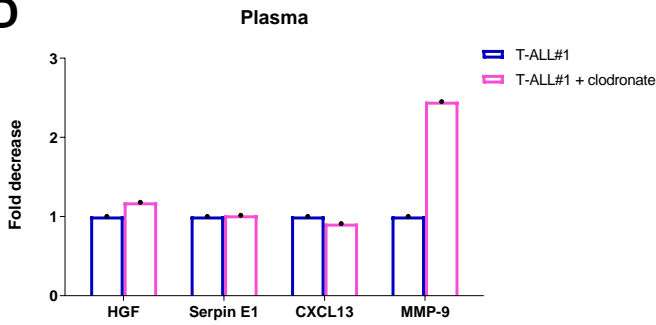
**B**



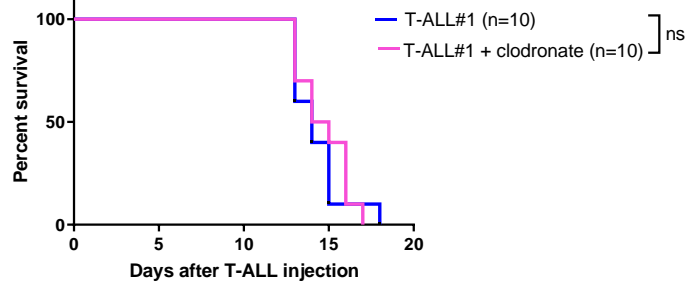
**C**



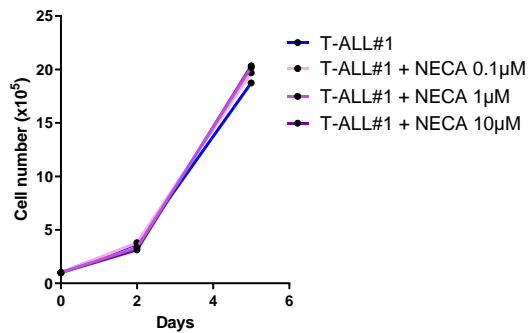
**D**



**E**

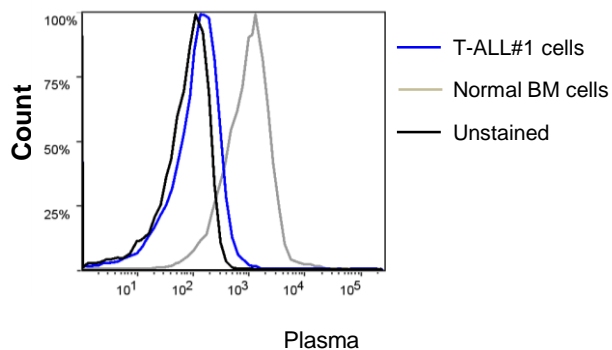


A

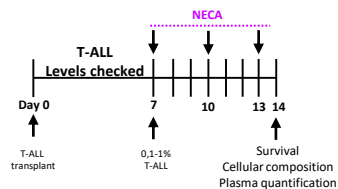


B

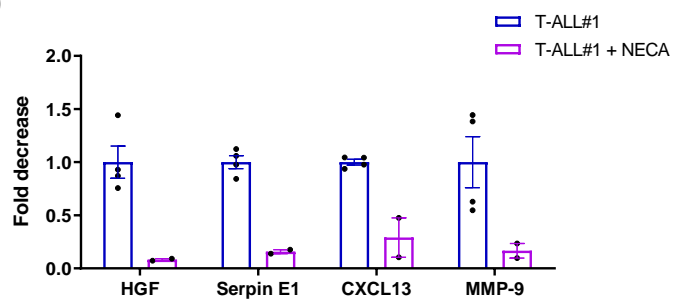
A2aR (Adenosine A2a receptor)



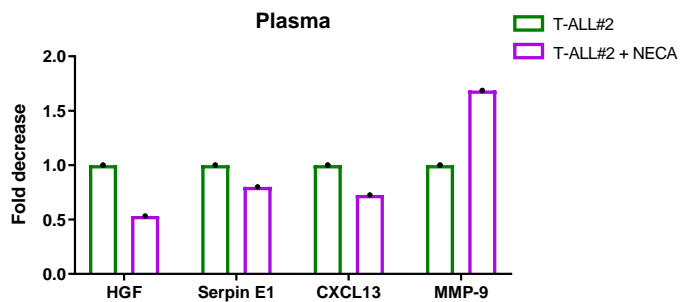
C



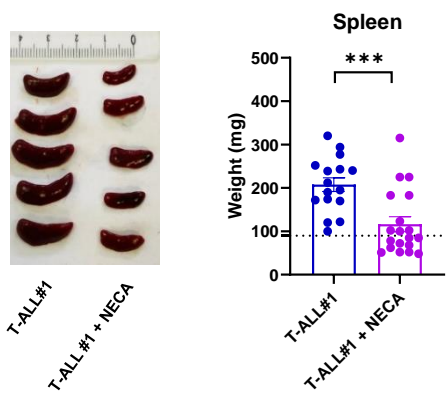
D



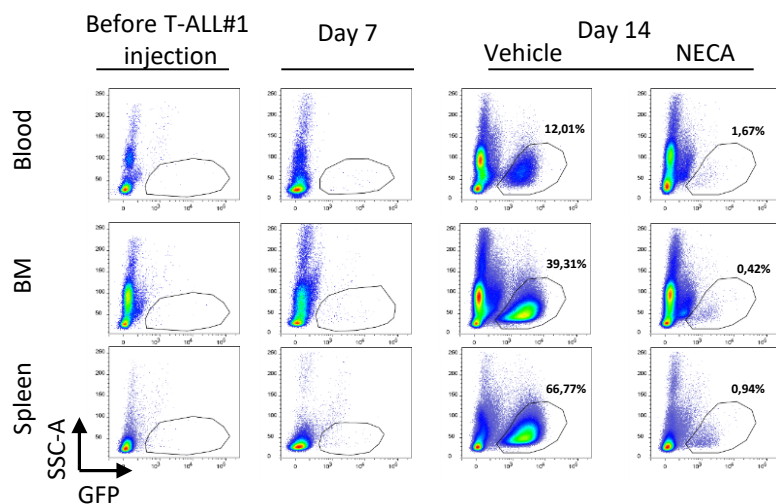
E



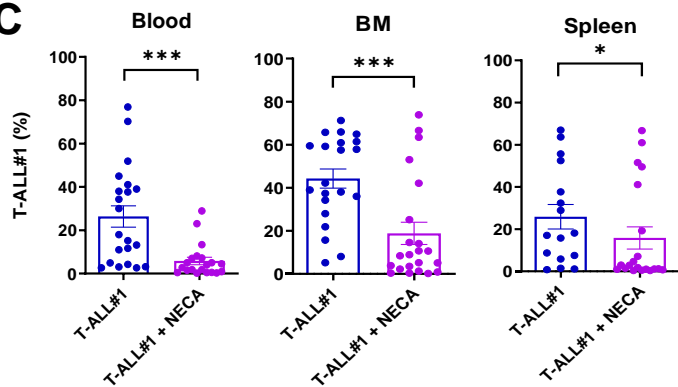
**A**



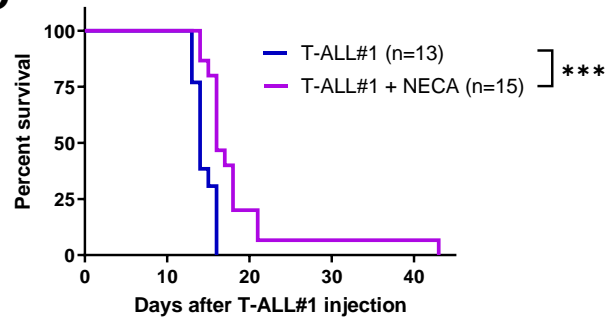
**B**



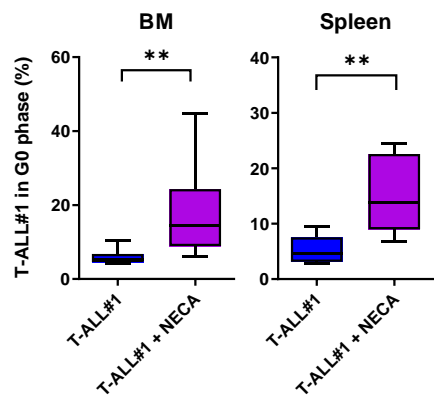
**C**



**D**

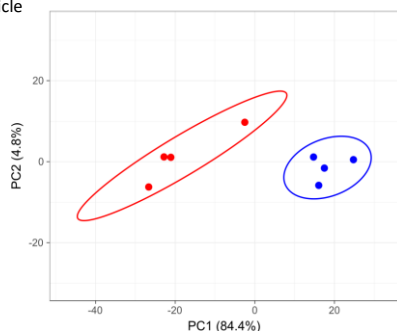


**E**



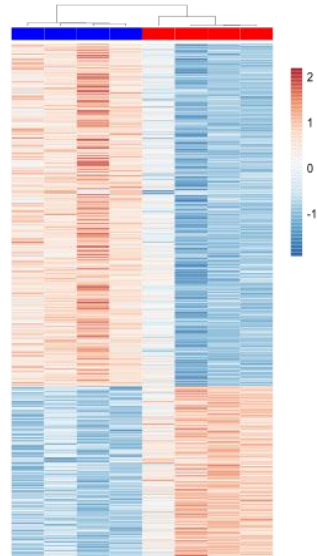
**A** Treatment

■ NECA  
■ Vehicle



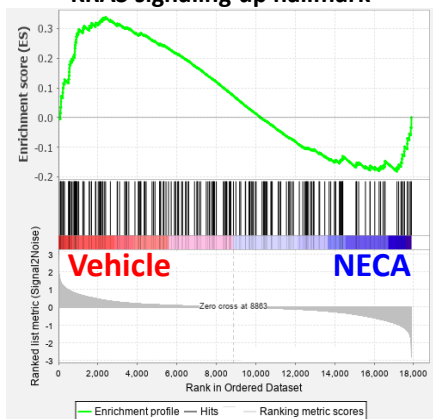
**B**

Treatment  
■ NECA  
■ Vehicle

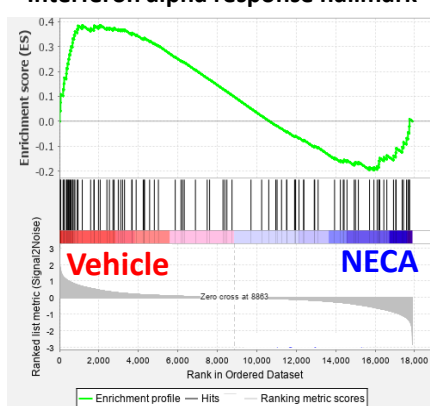


**C**

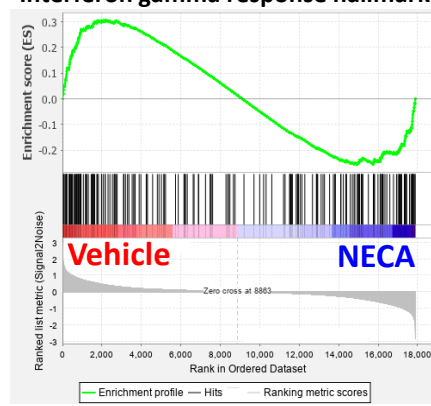
**KRAS signaling up hallmark**



**Interferon alpha response hallmark**



**Interferon gamma response hallmark**

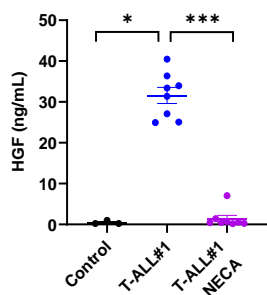


**D**

Ingenuity Canonical Pathways	p-value	z-score
HGF Signaling	1,66E-03	-0,447

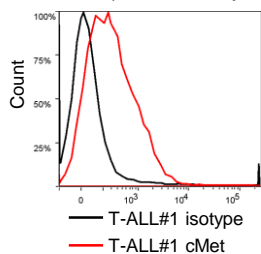
**E**

**HGF Plasma quantification**



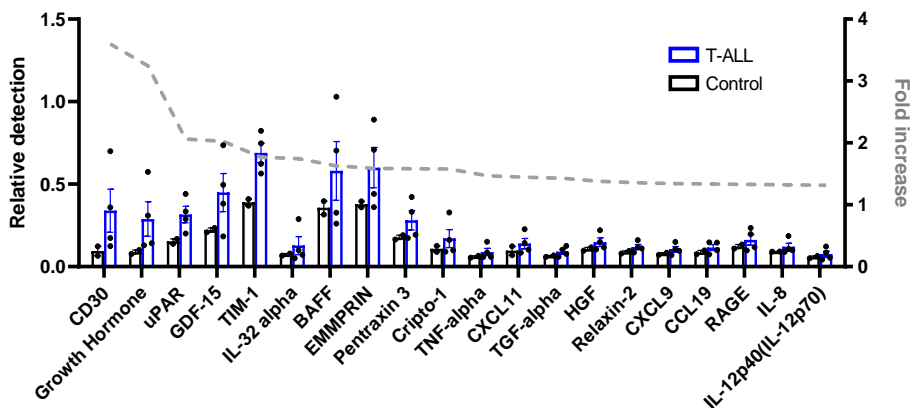
**F**

**cMet (HGF receptor)**

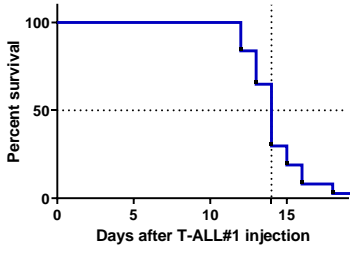


**G**

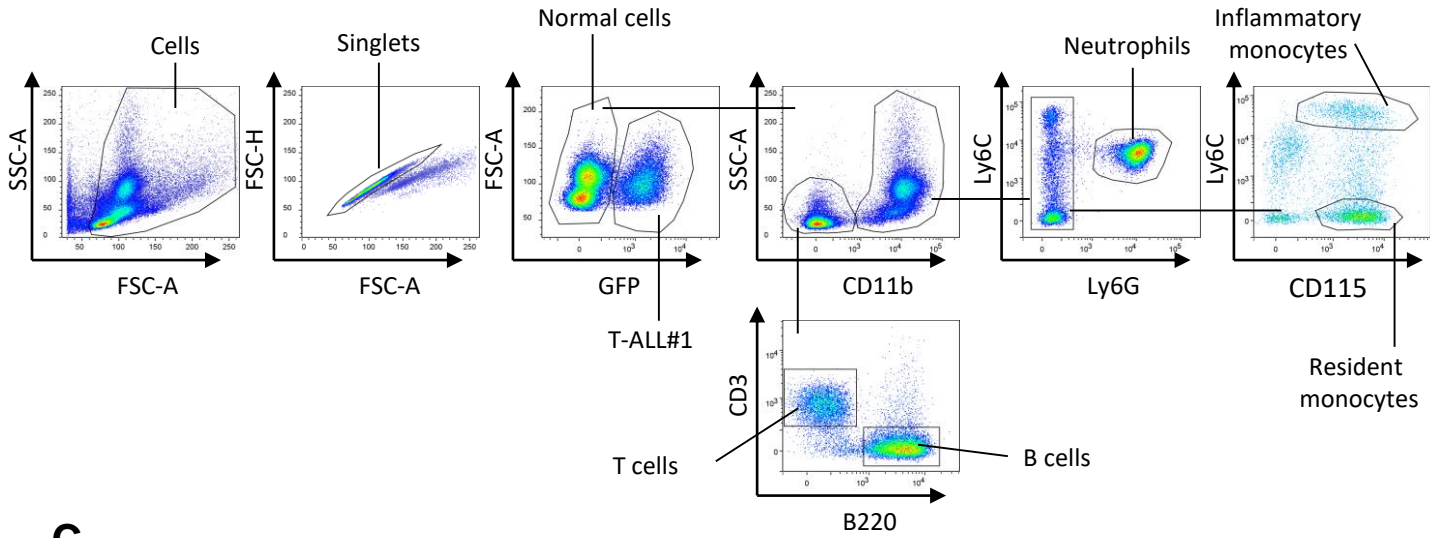
**Human plasma**



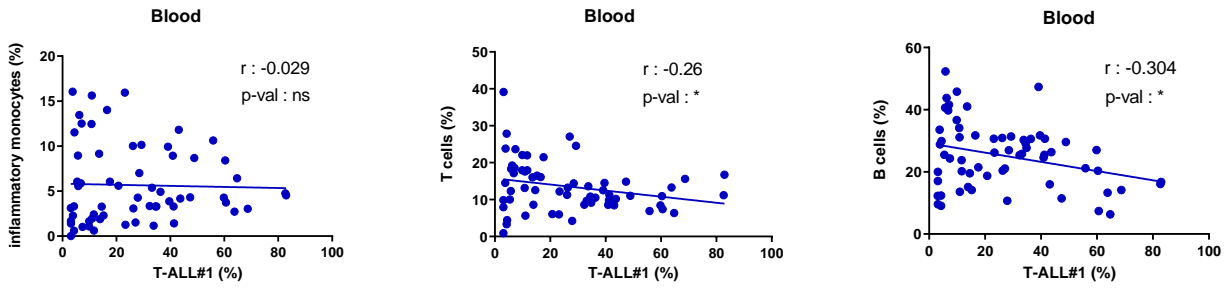
**A**



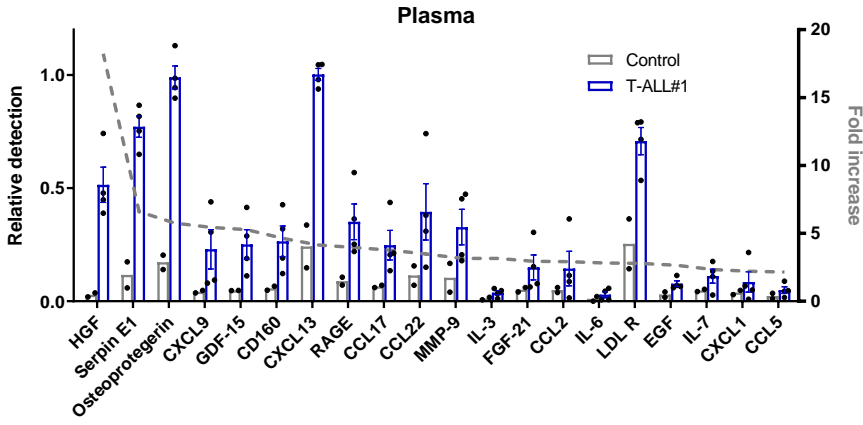
**B**



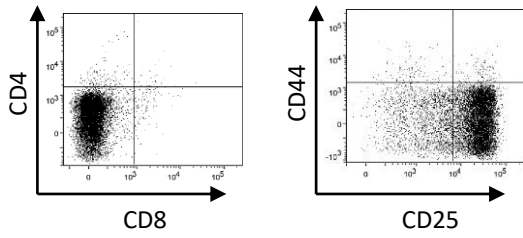
**C**



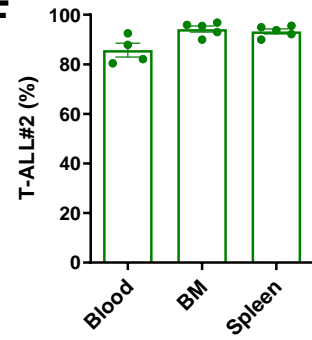
D



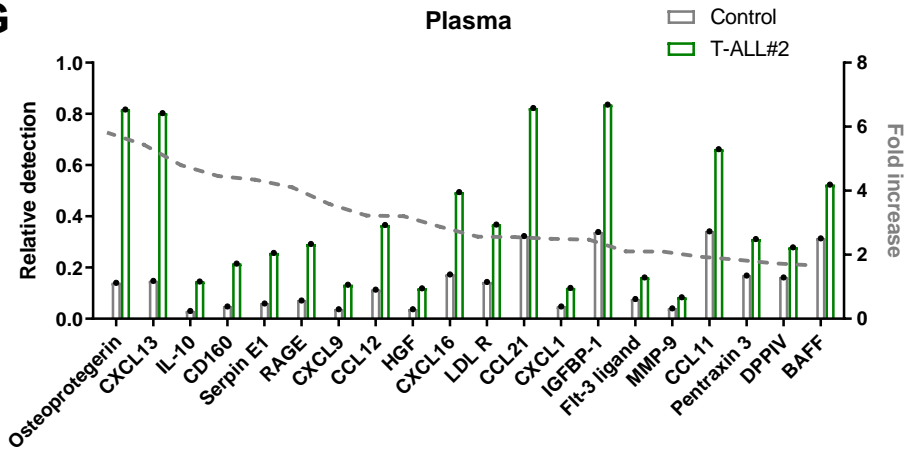
E



F

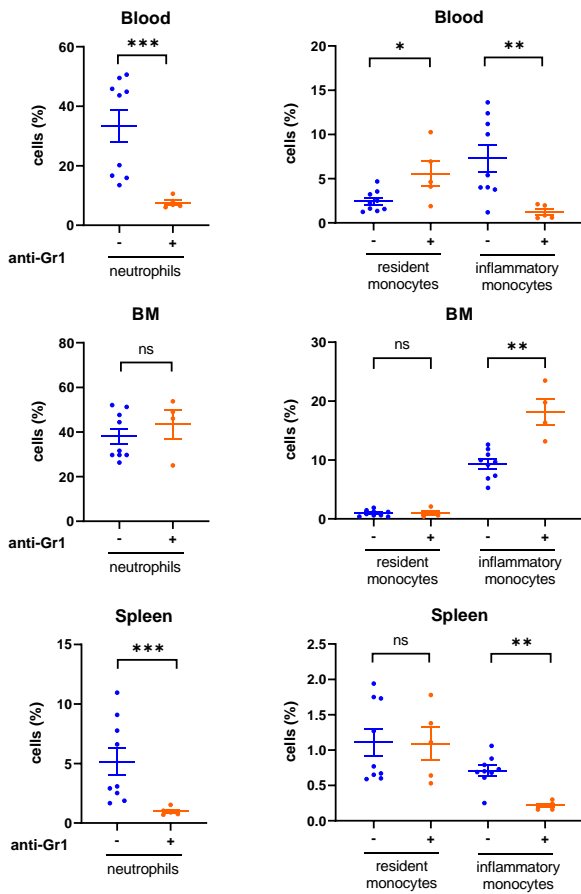


G

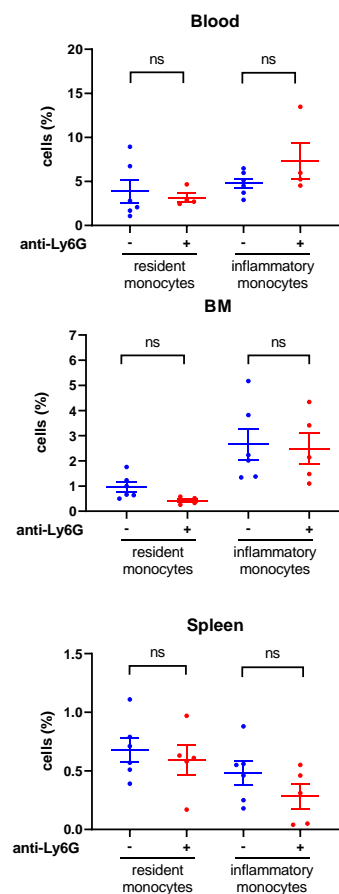




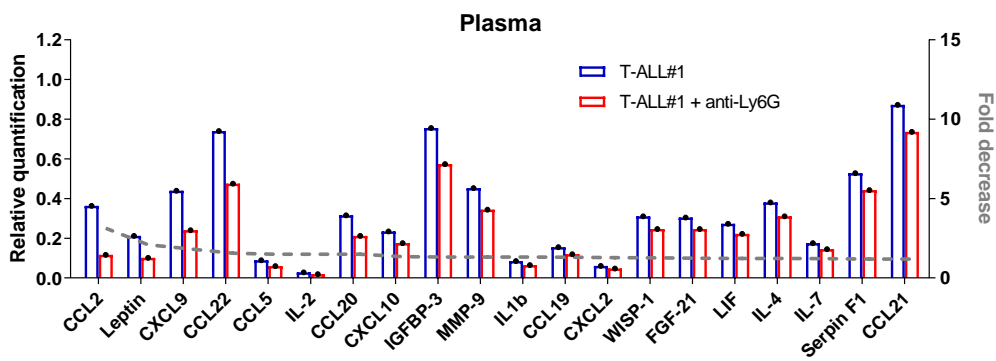
**A**



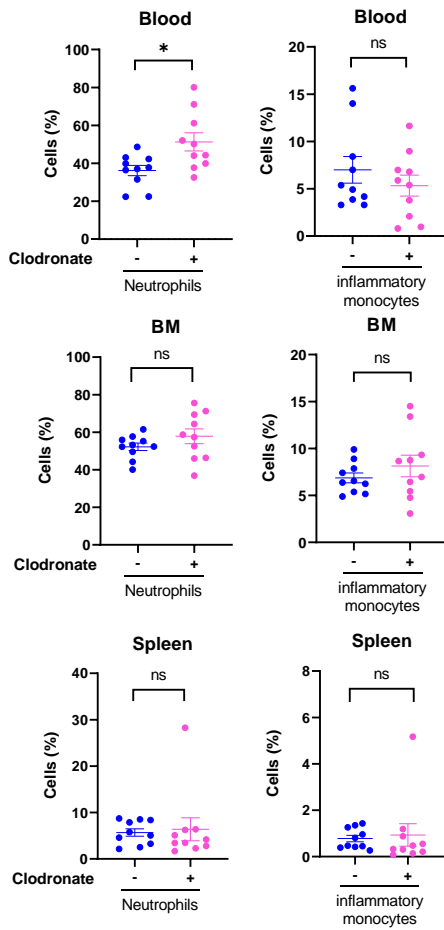
**B**



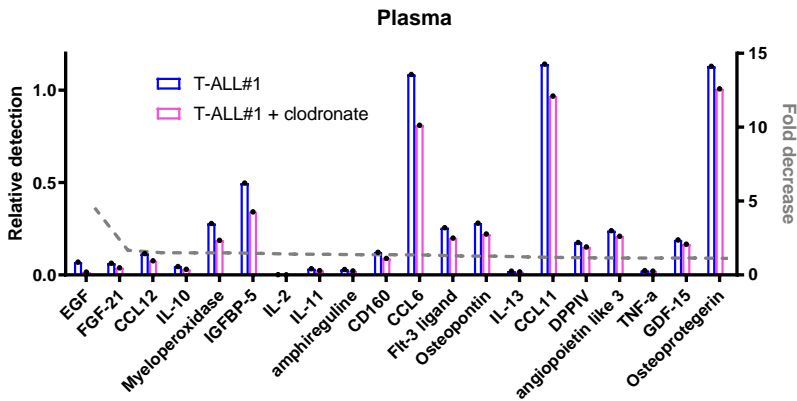
**C**

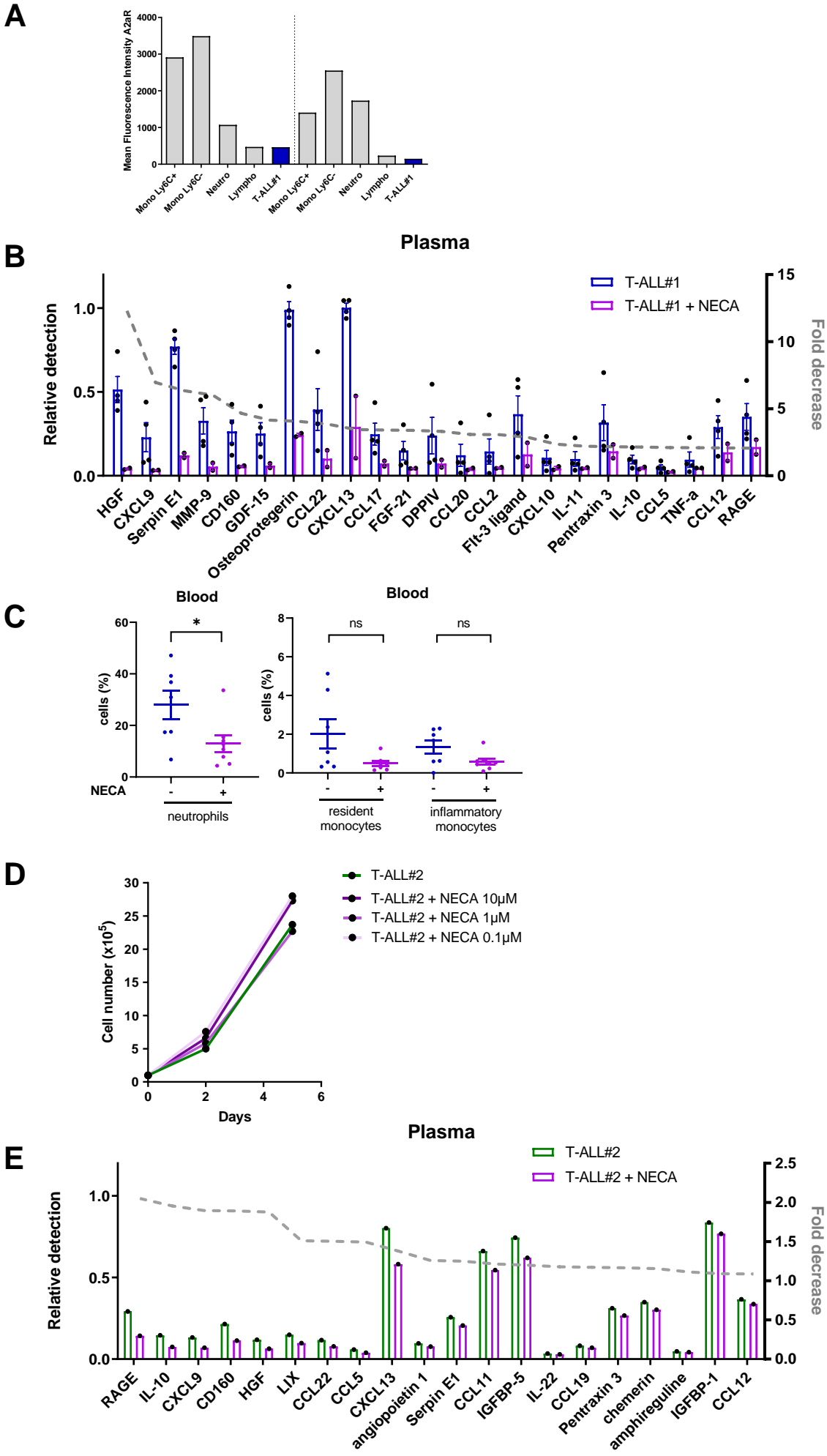


**A**

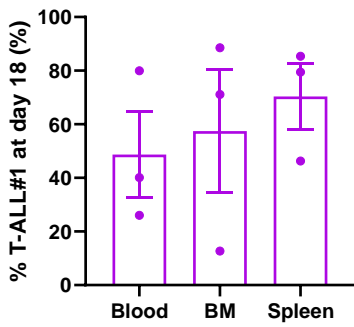


**B**

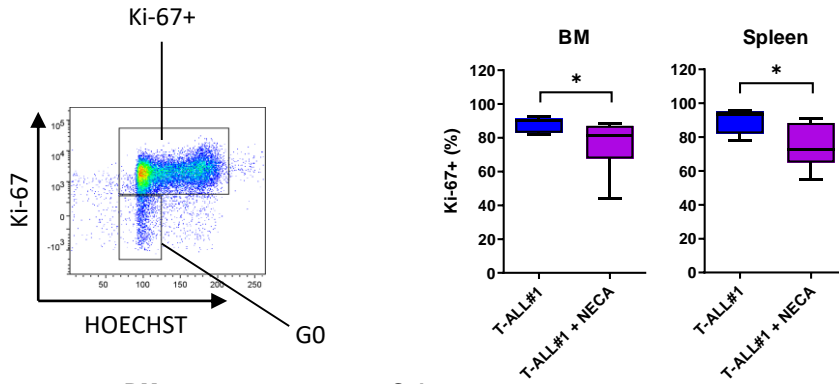




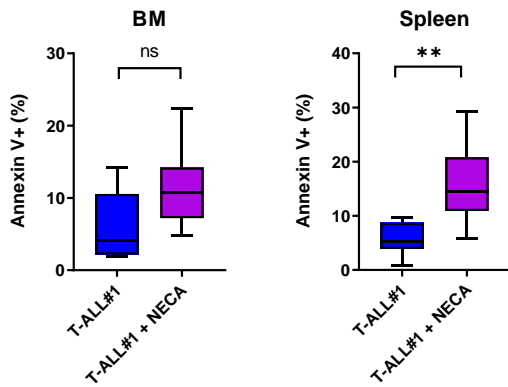
**A**



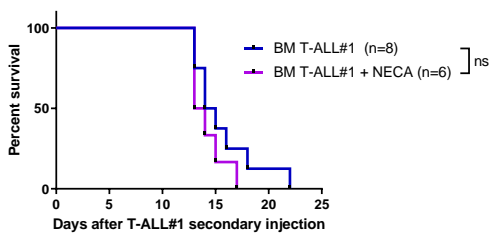
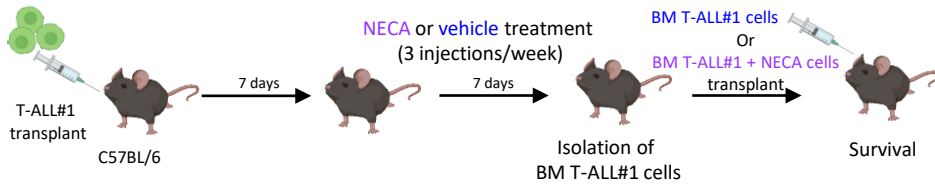
**B**



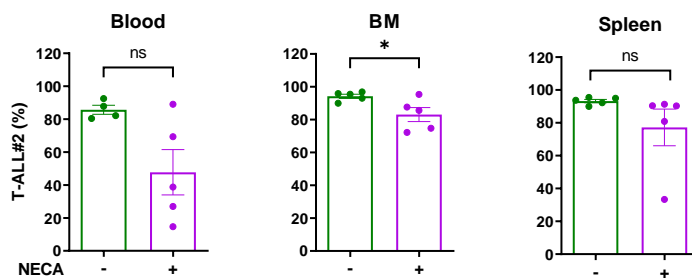
**C**



**D**



**E**

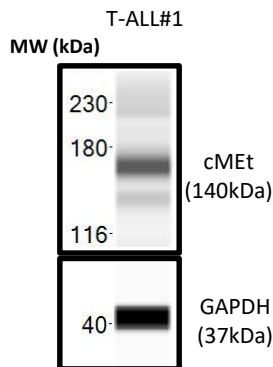


A

Inguinity Canonical Pathways	p-value	z-score
LXR/RXR Activation	1,15E-03	-2,449
PPAR Signaling	5,62E-04	-1,633
Senescence Pathway	7,76E-03	-1,134
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	4,79E-04	-1
Melanoma Signaling	1,29E-03	-1
GADD45 Signaling	2,57E-03	-1
Antiproliferative Role of Somatostatin Receptor 2	6,31E-03	-1
Th1 Pathway	6,31E-03	-1
JAK/STAT Signaling	7,76E-03	-1
PD-1, PD-L1 cancer immunotherapy pathway	5,37E-04	-0,816
PTEN Signaling	5,89E-04	-0,447
Glioblastoma Multifome Signaling	1,29E-03	-0,447
HGF Signaling	1,66E-03	-0,447
ID1 Signaling Pathway	3,09E-03	-0,378
Coronavirus Pathogenesis Pathway	3,39E-03	-0,378

Inguinity Canonical Pathways	p-value	z-score
Cell Cycle Control of Chromosomal Replication	1,91E-04	2,236
Acute Phase Response Signaling	2,00E-03	1,633
IL-17 Signaling	4,37E-04	1,414
HER-2 Signaling in Breast Cancer	1,51E-03	1,414
Estrogen-mediated S-phase Entry	4,17E-06	1,342
Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling	5,62E-03	1,342
Cyclins and Cell Cycle Regulation	1,23E-03	1
IL-7 Signaling Pathway	6,46E-03	1
PI3K/AKT Signaling	1,26E-04	0,816
IL-6 Signaling	1,41E-03	0,816
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	4,17E-03	0,816
Tumor Microenvironment Pathway	7,41E-03	0,816
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	2,04E-04	0,447
HIF1 $\alpha$ Signaling	3,80E-03	0,378

B



## Discussion et perspectives

---

### Résumé des résultats :

Les thématiques d'étude du laboratoire se concentrent depuis quelques années sur l'identification de facteurs extrinsèques aux LAL-T qui peuvent contribuer à différents mécanismes comme la chimiorésistance des LAL-T (Cahu et al., 2017; Fahy et al., 2021b) ou l'identification d'acteurs inflammatoires pro-leucémiques comme la cytokine pro-inflammatoire IL-18 (Uzan et al., 2014). Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité de ce travail pour identifier de nouveaux acteurs cellulaires et moléculaires du microenvironnement inflammatoire qui pourraient contribuer à la progression leucémique.

L'étude des LAL-T nous a permis d'établir que la progression leucémique est accompagnée d'une augmentation des neutrophiles et monocytes résidents dans les organes périphériques et plus particulièrement dans le sang. En parallèle nous avons observé une augmentation de la sécrétion molécules inflammatoires dans le plasma, avec la détection de diverses cytokines, chimiokines et facteurs de croissance.

La déplétion des neutrophiles dans le sang et la rate n'a affecté ni le pourcentage de cellules leucémiques, ni la survie des souris traitées, ni la sécrétion de molécules inflammatoires dans le plasma. Ainsi, les neutrophiles ne jouent pas de rôle majeur dans le microenvironnement inflammatoire induit par leucémie et n'impactent pas la progression leucémique. J'ai ensuite utilisé les liposomes de clodronate pour cibler les populations phagocytaires ce qui a permis de diminuer la progression leucémique mais n'a pas impacté la survie des souris ni la sécrétion de molécules sécrétées dans le plasma des souris traitées. Ces résultats montrent que, les neutrophiles et les cellules phagocytaires ne sont pas les cellules majoritairement responsables de l'environnement moléculaire inflammatoire observé dans les LAL-T, et que dépléter spécifiquement ces cellules myéloïdes n'est pas suffisant pour améliorer la survie des souris.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur le rôle des acteurs moléculaires indépendamment des acteurs cellulaires *in vivo*. L'inhibition de la sécrétion de molécules inflammatoires par le NECA a permis de fortement diminuer l'expansion leucémique

accompagnée d'une amélioration de la survie des souris. En étudiant l'expression génique des cellules leucémique de souris traitées, on observe une diminution de l'activation de voies de signalisation impliquées dans certains processus inflammatoires et également de la voie de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), un facteur de croissance fortement sécrété dans le plasma des souris LAL-T. Les cellules de LAL-T étudiées expriment le récepteur de ce facteur supportant l'hypothèse du rôle de l'HGF, également détecté dans le plasma de patient.

**Pour conclure, cette étude a montré la composition du microenvironnement inflammatoire induit par la leucémie et a démontré ainsi l'importance du microenvironnement inflammatoire moléculaire dans la progression de la LAL-T. Ces résultats nous ont permis d'identifier l'HGF comme une cible moléculaire potentielle du microenvironnement inflammatoire des LAL-T.**

La partie suivant s'attelle à discuter des résultats obtenus en regard de la littérature et d'autres résultats également produits au cours de la thèse.

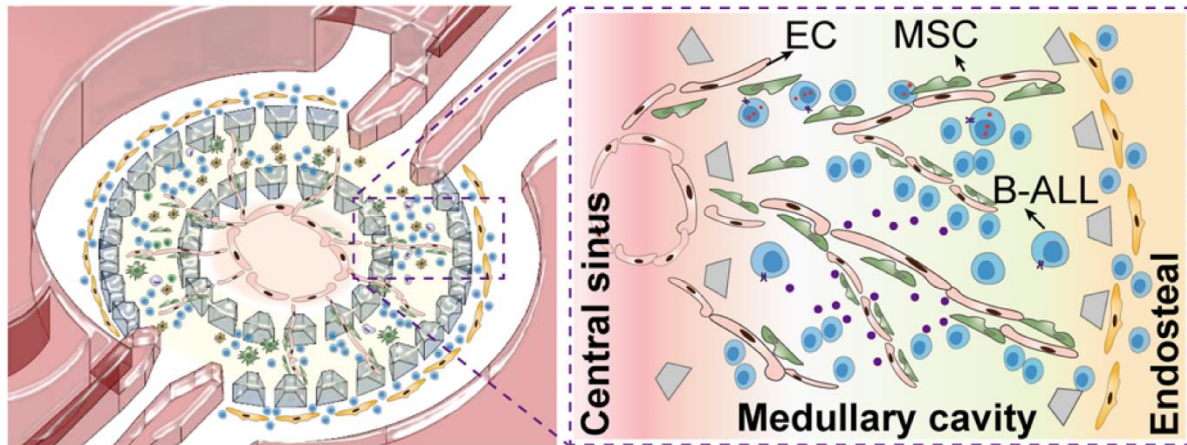
## Discussion

### Point 1 : Utilisation de modèles murins pour modéliser la réponse inflammatoire induite par les LAL-T

Des lignées de souris sont généralement utilisées pour réaliser ce type d'étude et le système immunitaire de ces souris est assez bien identifié, surtout dans la lignée C57BL/6J. L'avantage de ces modèles par rapport aux modèles immunodéficients (comme le modèle NSG décrit en introduction) est que leur système immunitaire est intact et complet. On peut donc s'attendre à observer une réaction immunitaire inflammatoire fonctionnelle. Il faut cependant être vigilant quant à l'origine des cellules immunitaires et la lignée murine receveuse, afin de ne pas créer de situations de rejet entre les lignées murines (Eliopoulos et al., 2004). Dans notre étude, les cellules leucémiques murines sont donc injectées en souris C57BL/6J syngéniques receveuses. L'un des inconvénients de ce modèle est la nécessité d'injecter les cellules leucémiques ce qui peut générer une légère inflammation locale. Pour pouvoir se rapprocher au plus d'un modèle reconstituant les interactions entre les LAL-T et le microenvironnement, un modèle génétique avec génération de novo de LAL-T (comme le modèle murin génétique de surexpression de TAL1 et LMO1 (Aplan et al., 1997)) semble plus proche du patient car ne nécessite pas d'injection de cellules. Cependant, avec ce genre de modèle le développement leucémique est beaucoup plus long justifiant en partie notre choix de l'utilisation de modèles d'injections de LAL-T pour pouvoir gérer plus précisément les protocoles de traitement et le nombre de souris étudiées.

D'autre part, l'utilisation de lignées de souris est de plus en plus débattue. Il est nécessaire et fortement conseillé par les comités éthiques d'utiliser le moins d'animaux possible jusqu'à remplacer le modèle animal par un autre modèle. Dans le cas de la LAL-T, l'étude des cellules leucémiques en culture cellulaire *in vitro* nécessite l'utilisation d'une seconde lignée stromale permettant de soutenir la croissance leucémique (Armstrong et al., 2009). Ces techniques de cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser l'ensemble des interactions entre les types cellulaires présents dans les différents microenvironnements tumoraux et les cellules leucémiques mais permettent par exemple de tester l'influence de certaines molécules (inhibiteurs, molécules thérapeutiques, facteurs de croissance, cytokines...) sur la leucémie de façon directe. En revanche, l'ajout de molécules dans le milieu de culture peut impacter aussi





**Figure 19 : Simulation de la niche médullaire dans l'étude de la LAL-B ex vivo.** Représentation graphique de la puce « leukemia-on-chip » qui simule le microenvironnement médullaire pour identifier de nouveaux mécanismes de chimiorésistance dans la LAL-B. L'ensemble est constitué d'un support solide sur lequel sont cultivées des cellules endothéliales et des MSC qui vont pouvoir se différencier en ostéoblastes. Enfin, les cellules de LAL-B sont ajoutées au montage (issu de Ma et al., 2020)

bien les cellules leucémiques que les cellules stromales, remettant en question la spécificité d'action de la molécule testée. Une nouvelle technique appelée leucémie sur puce « Leukemia-on-a-chip » a permis de reconstituer en partie le microenvironnement médullaire sur une puce ex vivo avec la présence de différents types cellulaires du microenvironnement comme les cellules endothéliales et les CSM. Cette technique permet notamment d'administrer des molécules thérapeutiques pour étudier les mécanismes associés à la chimiorésistance dans les LAL-B (Ma et al., 2020) (Figure 19). On peut facilement imaginer appliquer ce modèle pour l'étude des LAL-T. Cependant, ce modèle est très loin de récapituler l'ensemble des cellules et des interactions présentes dans le microenvironnement médullaire. De plus, il ne prend pas en compte les autres organes qui peuvent interagir avec la leucémie notamment par le biais de signalisation paracrine. Ainsi, pour répondre aux questions scientifiques sur l'interaction entre la leucémie et les différents microenvironnements du corps, il est indispensable d'utiliser un modèle d'étude se rapprochant le plus possible de la réalité physiologique du patient. Dans notre contexte de l'étude du microenvironnement inflammatoire il a donc été difficile de s'affranchir de l'utilisation de modèles animaux avec un système immunitaire intact, nous nous sommes donc penchés sur un modèle d'injection de LAL-T murines en souris syngéniques C57BL/6. Dans notre étude, nous utilisons 2 modèles de LAL-T, l'une avec l'activation constitutive de la voie NOTCH1 et une autre sur-exprimant les oncogènes TAL1 et LMO1.

## Point 2 : Rôles des populations de cellules immunitaires dans les LAL-T *in vivo*

### Comprendre le rôle des neutrophiles

L'utilisation d'anticorps anti-Gr1 et anti-Ly6G a montré que l'on pouvait obtenir une bonne diminution des neutrophiles dans les organes périphériques que nous avons étudiés dans nos modèles de LAL-T. En revanche, les neutrophiles de la MO n'ont pas été impactés par les injections. On ne peut donc pas exclure que les neutrophiles de la MO ne contribuent pas à la progression leucémique. On ne peut pas non plus rejeter l'hypothèse que le maintien des neutrophiles de la MO malgré les traitements avec les anticorps puisse empêcher l'observation du rôle des neutrophiles sur la sécrétion d'acteurs moléculaires. Des études ont montré que la déplétion des neutrophiles était plus efficace avec l'anticorps anti-Gr1 (Carr et al., 2011) mais qu'elle est plus spécifique avec l'anticorps anti-Ly6G (Daley et al., 2008). Cependant, il existe des modèles génétiques comme le modèle PMN<sup>DTR</sup> comportant une construction exprimant le récepteur à la toxine diphtérique spécifiquement à la surface des neutrophiles qui montrent une déplétion des neutrophiles spécifique et plus efficace que les injections d'anticorps contrôlée par l'injection de toxine diphtérique (avec une déplétion des neutrophiles de la MO également) (Reber et al., 2017) alors que le modèle génétique G-CSFR<sup>-/-</sup> montre une neutropénie constitutive avec une diminution de 80 et 50% des neutrophiles du sang et de la MO respectivement (Liu et al., 1996). L'utilisation du système PMN<sup>DTR</sup> dans le contexte de la LAL-T aurait pu nous permettre de connaître l'effet d'une déplétion plus drastique des neutrophiles (malheureusement nous n'avons pas pu avoir accès à ce modèle expérimental). Cependant, bien que la diminution des neutrophiles n'ait pas été efficace dans l'ensemble des compartiments étudiés, les neutrophiles périphériques sanguins et spléniques ont été fortement atteints par les 2 anticorps, et la sécrétion de molécules inflammatoires est pourtant restée inchangée, confortant l'idée que les neutrophiles ne sont pas responsables de la sécrétion de molécules inflammatoires dans les LAL-T et qu'ils ne contribuent pas majoritairement à la progression des LAL-T *in vivo*. Dans la littérature, il a été démontré que l'activité des neutrophiles pouvait être modifiée et qu'en interagissant avec les cellules stromales, ils contribuaient à la progression des lymphomes B. Les cellules stromales associées au lymphome sécrètent de l'IL-8 qui recrute les neutrophiles qui à leur tour supportent les cellules tumorales via la voie BAFF/APRIL (Grégoire et al., 2015). Il a également été montré dans les Leucémie Lymphoïdes Chroniques B (LLC-B) que les centres prolifératifs sécrétaient de l'IL-

8 mais également du G/GM-CSF, de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  qui respectivement induisait la chimiotaxie des neutrophiles et supportait leur reprogrammation en cellules supportrices de LLC-B. Cette reprogrammation favorise l'inhibition de l'activité cytotoxique T anti-tumorale et la formation de « Neutrophils Extracellular Traps », deux mécanismes qui supportent la progression des LLC-B (Wachowska et al., 2021). Bien que l'activité des Lymphocytes T anti-tumorale n'ait jamais été démontrée dans les LAL-T et que le centre prolifératif soit une structure propre aux LLC, il pourrait être intéressant, de disséquer ces mécanismes d'activation des neutrophiles dans la LAL-T et leurs potentielles interactions avec les autres cellules de l'environnement comme les cellules stromales.

### **Comprendre le rôle des phagocytes**

Les résultats que nous obtenons en supprimant les cellules phagocytaires et plus particulièrement les macrophages et monocytes résidents corroborent avec l'identification de leur rôle de soutien dans la LAL-T (Chen et al., 2015; Lyu et al., 2020). En effet, la suppression des phagocytes corrèle avec une diminution drastique de la progression leucémique. En revanche, contrairement à ce qui est décrit dans (Lyu et al., 2020), dans notre modèle nous n'observons pas d'amélioration de la survie des souris. Ils étudient le rôle des cellules myéloïdes de souris receveuses C57BL/6 injectée par une LAL-T primaire issue de la lignée murine LN3 qui expriment le TCR de façon prématurée ce qui conduit à l'apparition de LAL-T (Triplett et al., 2016). Dans notre étude, nous utilisons 2 modèles de LAL-T décrits ci-dessus avec 2 phénotypes de marqueurs de surface et des vitesses de progression leucémiques différents. Cependant, en comparant le profil de sécrétion de molécules inflammatoires dans le plasma de souris C57BL/6 injectées avec la LAL-T « T-ALL#1 » (ICN1) et celui de souris injectées avec « T-ALL#2 » (TAL1/LMO1), on observe de façon similaire une augmentation d'un ensemble de molécules inflammatoires identifiées par cytokine array (notamment des molécules décrites dans la partie résultats comme l'HGF, le CXCL13, la SERPINE E1 ou le MMP-9). Cependant, il existe des différences entre les profils comme la détection de GDF-15 ou CCL17 dans le plasma de souris injectées avec T-ALL#1 alors qu'ils ne le sont pas dans le plasma des souris injectées T-ALL#2 et inversement pour CCL12 ou BAFF. Etant donné que nos modèles de LAL-T sont différents des modèles LN3, nous pouvons supposer qu'il existe également des différences au niveau des molécules sécrétées dans le plasma de ces souris leucémiques. Par ailleurs nous avons étudié l'effet du clodronate uniquement dans le modèles T-ALL#1 (ICN1) et nous n'avons pas observé

de différences entre les molécules sécrétées dans le plasma des souris des 2 groupes de traitement. L'étude de Lyu et ses collègues ne montrent pas l'impact de l'effet du clodronate sur les molécules sécrétées mais on peut supposer que le traitement entraîne dans leur modèle une diminution de la sécrétion de molécules inflammatoires contrairement au notre, conduisant à une amélioration de la survie des souris.

### *Quelles sont les cellules à l'origine de la réponse inflammatoire dans les LAL-T ?*

L'un des rôles majeurs des cellules immunitaires dans l'inflammation est de sécréter des acteurs moléculaires permettant le recrutement ou l'activation d'autres cellules immunitaires afin de répondre à l'agression détectée (Newton and Dixit, 2012). Ce rôle de sécrétion et de recrutement dans l'immunité innée est majoritairement endossé par les cellules myéloïdes. Contrairement à ce que nous espérions voir, nous avons remarqué qu'en supprimant les neutrophiles et les monocytes inflammatoires (utilisation de l'anticorps anti-Gr1) ou bien les phagocytes incluant les macrophages et les monocytes résidents au cours de la progression leucémique, nous ne sommes pas parvenus à modifier la sécrétion de molécules inflammatoires dans le plasma. Ces résultats nous ont permis de conclure que les neutrophiles, les monocytes et les macrophages ne sont pas des cellules essentielles dans la production de l'environnement moléculaire inflammatoire observé dans la LAL-T. En revanche, la déplétion des phagocytes a permis de diminuer l'envahissement leucémique montrant que les monocytes résidents et macrophages pourraient avoir un rôle dans la progression leucémique contrairement aux neutrophiles et monocytes résidents. Plusieurs éléments de réponse peuvent être apportés. Dans l'article de Lyu et ses collègues de 2022, les auteurs montrent que les cellules myéloïdes favorisaient la croissance des cellules leucémiques par interaction directe via la voie des intégrines (Lyu et al., 2022). Cet aspect n'a pas été étudié dans notre modèle.

Dans notre étude, la déplétion des différentes populations myéloïdes n'est peut-être pas suffisante pour inhiber la sécrétion de molécules inflammatoires dans les conditions expérimentales dans lesquelles nous nous trouvons. En effet, nous avons étudié les rôles de ces populations cellulaires indépendamment les unes des autres au cours de la leucémie afin d'identifier leur rôle respectif au cours de la progression leucémique. Cependant, il est très probable que différentes populations cellulaires puissent collaborer pour générer un microenvironnement inflammatoire propice à la progression leucémique et que cibler ces populations séparément ne permette pas de diminuer cette sécrétion d'acteurs moléculaires

dans le plasma. Cette problématique est contournée par l'utilisation du NECA qui cible une large variété de types cellulaires du microenvironnement pour bloquer leur production de molécules inflammatoires (voir discussion sur le NECA).

Il a été décrit que d'autres populations immunitaires comme les cellules dendritiques peuvent contribuer à la progression leucémique notamment par la sécrétion d'IL-7 (Triplett et al., 2016) et elles font également partie des cellules qui contribuent à la progression leucémique décrites par Lyu et ses collègues (Lyu et al., 2020). En réalisant un phénotypage plus poussé, nous pourrions éventuellement identifier d'autres populations immunitaires qui pourraient être modifiées avec la leucémie et il serait d'intérêt d'étudier leur contribution sur la progression leucémique.

Etant donné que les populations cellulaires le plus impactées par la leucémie sont les neutrophiles et les monocytes résidents dans le sang, nous nous sommes focalisés sur l'étude de ces cellules sur la progression leucémique. Cependant, les cellules de la lignée lymphoïdes peuvent également participer à la réaction immunitaire et impacter la LAL-T. Par exemple, le rôle des lymphocytes T cytotoxique ait été identifié dans l'immunité anti-tumorale de nombreux cancers (Waldman et al., 2020). Cependant, cette activité n'a jamais été décrite dans les LAL-T. Il est impossible d'utiliser des anticorps ciblant les lymphocytes T *in vivo* pour les supprimer car ils risquent de cibler également les cellules leucémiques. En revanche, on peut utiliser des modèles génétiques déficients pour les lymphocytes T comme les souris doubles mutantes  $c\text{-Kit}^{-/-} \gamma\text{c}^{-/-}$  (Rodewald et al., 1997). On peut également se poser la question concernant le rôle des lymphocytes B sur la progression leucémique en utilisant le modèle murin  $\mu\text{MT}^{-/-}$ , ou par l'injection d'anticorps anti-CD20 ciblant les lymphocytes B (Kitamura et al., 1991; Yu et al., 2012), ou pour les lymphocytes NK en injectant des anticorps anti-NK1.1 (Waggoner et al., 2014) aux souris receveuses.

Finalement, la sécrétion de molécules inflammatoires dans l'environnement cellulaire est éventuellement due à la présence d'autres populations cellulaires non immunitaires que celles que nous avons ciblées dans cette étude. Par exemple, il a été montré que dans le contexte des LAL-B, la présence de cellules leucémiques induit la différenciation de CSM en Cancer Associated Fibroblasts (CAF). Dans cette étude il apparaît que la présence de cellules leucémiques *in vitro* induit la différenciation de cellules MSC en CAF en réponse au stress oxydatif et que cette différenciation est corrélée à une augmentation de la sécrétion de

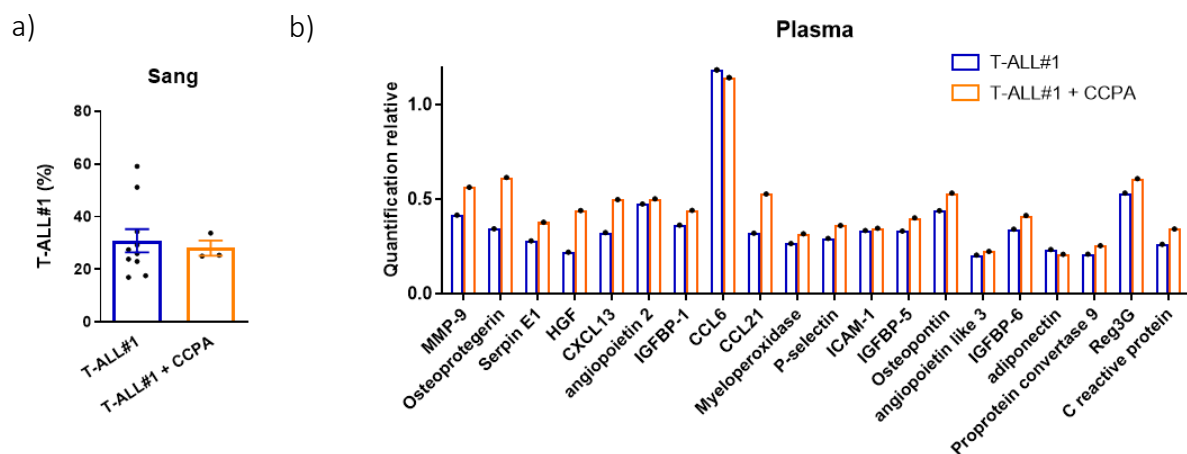
molécules inflammatoires dans le surnageant de culture par les CAF (Burt et al., 2019). De plus, cette co-culture entre cellules stromales et cellules leucémiques est accompagnée de transferts de mitochondries entre les 2 populations cellulaires via l'excroissance de la membrane cytoplasmique rappelant que le soutien du stroma aux cellules leucémiques peut également se passer par contact cellulaire.

D'autres arguments sont en faveur du rôle de sécrétion des cellules stromales dans les LAL-T. Par exemple, il a été démontré que l'IL-18 qui contribue à la progression leucémique peut être sécrétée par des cellules stromales de la MO (Uzan et al., 2014), et nous avons montré que les cellules stromales murines MS5 sécrètent de l'HGF *in vitro* pouvant potentiellement soutenir la croissance des cellules "T-ALL#1" (ICN1) (Figure 18a). Il est également reconnu que les MSC peuvent sécréter de nombreux acteurs moléculaires et agir sur de nombreuses populations cellulaires (Joel et al., 2019).

### **Point 3 : Peut-on utiliser le NECA comme outil scientifique ou comme outil thérapeutique ?**

L'un des systèmes de régulation des mécanismes de l'inflammation passe par la régulation de l'Adénosine. L'adénosine est retrouvée dans le microenvironnement en réponse à l'inflammation où elle peut se fixer aux récepteurs à l'adénosine (Adenosine Receptors AR). Ces récepteurs sont au nombre de 4 (A1, A2a, A2b et A3) et sont exprimés à la surface de nombreuses cellules immunitaires (Effendi et al., 2020). Leur activation peut impacter la réponse inflammatoire, notamment le récepteurs A2a qui en activant la voie de l'AMP cyclique active la voie CREB qui inhibe la voie NF-KB (Morello et al., 2009). L'inhibition de cette voie centrale de la réponse inflammatoire par les récepteurs à l'adénosine conduit à la diminution de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires par de nombreux types cellulaires immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les lymphocytes (Pasquini et al., 2021). Bien qu'il ait une affinité pour l'ensemble des récepteurs à l'adénosine, le 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine (NECA) est décrit comme agoniste du récepteur A2a, peut se fixer à ce récepteur avec une affinité supérieure à l'Adénosine et induire l'inhibition de l'inflammation en aval de la cascade de signalisation (Jacobson and Gao, 2006). Il existe un agoniste plus spécifique du récepteur A2a, le CGS21680. Cependant son utilisation est controversée puisqu'en plus du récepteur A2a, il peut se fixer à certains récepteurs d'autres familles et induire des effets indésirables (Cunha et al., 1996).

Le NECA peut donc agir sur un large ensemble de cellules dans le microenvironnement. De plus, il a été démontré que les récepteurs à l'adénosine étaient surexprimés en condition inflammatoires (Murphree et al., 2005) et nous avons montré que le récepteur A2a n'était pas exprimé sur les cellules leucémiques ICN1 (T-ALL#1) *in vivo* ni dans le sang, ni dans la MO alors que les cellules immunitaires (notamment myéloïdes) l'expriment fortement. Par ailleurs, avant d'utiliser le NECA, nous avons utilisé un autre récepteur agoniste, 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine (CCPA) spécifique de la fixation à A1. L'activation du récepteur A1, contrairement au récepteur A2a, peut induire l'activation de la réaction inflammatoire en diminuant l'AMP cyclique intracellulaire (Effendi et al., 2020; Salmon et al., 1993). Cet agoniste spécifique de A1 n'a pas diminué la sécrétion de molécules inflammatoires comparé à la condition contrôle et la progression leucémique (Figure 20). Nous avons donc montré dans notre étude que le NECA agit spécifiquement sur l'environnement leucémique pour inhiber la sécrétion de molécules inflammatoires en ciblant le récepteur A2a.



**Figure 20 : Effet du traitement CCPA sur la progression leucémique de T-ALL#1 et sur la sécrétion de molécules inflammatoires dans le plasma.** a) Pourcentage de cellules T-ALL#1 dans le sang de souris contrôle comparé aux souris traitées avec le CCPA. b) Quantification par cytokine array de molécules inflammatoires sécrétées dans le plasma de souris traitées avec le CCPA ou non traitées. (Résultats produits par Lucine Fahy, doctorante).

L'utilisation du NECA a montré que la progression de la LAL-T est inhibée lorsque la sécrétion de molécules inflammatoires est bloquée. L'étude transcriptomique a montré une inhibition des voies d'activation de l'inflammation dans les blastes issus de souris traitées. Par exemple, la voie KRAS qui est une voie majeure de la transduction du signal impliquée dans de nombreux cancer (Eser et al., 2014) mais qui est également impliquée dans la signalisation HGF est inhibée

dans les blastes traités au NECA. Cependant, les voies de l'interferon  $\alpha$  et  $\gamma$  sortent significativement diminuées de l'analyse, malgré le fait qu'elles ne fassent pas partie des molécules inflammatoires les plus fortement augmentées par la leucémie ni même diminuées par le NECA. De plus, nous avons quantifié la sécrétion de molécules inflammatoires dans le plasma des souris alors que les blastes utilisés pour l'analyse transcriptomique proviennent de la MO. Même si les molécules inflammatoires détectées dans le plasma représentent l'état inflammatoire global des souris, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que les molécules sécrétées dans le plasma diminuées par le NECA soient les mêmes que celle qui sont détectées dans le microenvironnement de la MO. Il n'est pas impossible que la réponse des cellules leucémiques retrouvées dans la circulation sanguine soit différente de celles de la MO après le traitement NECA. Les échantillons de surnageant de MO de souris traitées ou contrôles sont disponibles au laboratoire pour pouvoir répondre à cette question.

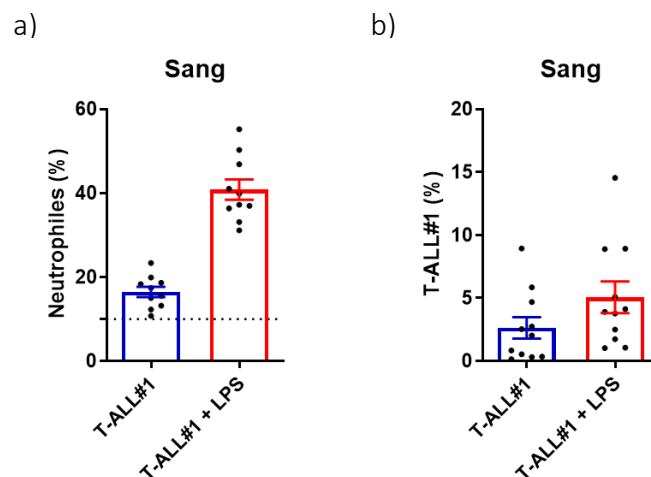
Au cours de ma thèse, j'ai utilisé le NECA comme outil permettant de cibler spécifiquement le microenvironnement (et pas la LAL-T) pour inhiber la sécrétion de molécules inflammatoire et comprendre l'impact de cet environnement sur la progression leucémique. Les traitements actuels en thérapie impactent l'ensemble des cellules de l'organisme et nous cherchons à identifier les acteurs spécifiques de l'environnement. Cependant, avec ces traitements, les patients en rechute et les patients réfractaires ont un mauvais pronostic (Pui and Evans, 2006). L'utilisation du NECA apporterait un nouvel axe de traitement des LAL-T en ciblant la sécrétion de molécules inflammatoires spécifiquement dans le microenvironnement. Parmi les molécules classiquement utilisées pour traiter les LAL-T on retrouve les glucocorticoïdes, comme la dexaméthasone, qui sont des molécules anti-inflammatoires. Ces molécules se fixent sur des récepteurs intracellulaires et inhibent l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Barnes, 1998). Cependant, les effets secondaires des glucocorticoïdes sont très lourds incluant des infections, des fractures osseuses, de l'ostéonécrose, des problèmes comportementaux et des myopathies (Inaba et al., 2017). Le NECA pourrait éventuellement se substituer aux glucocorticoïdes. De plus, cette molécule est déjà utilisée en clinique pour son action vasodilatatrice (Makujina et al., 1992) et a donc été préalablement validée par les instances d'évaluation de protocoles cliniques. Son utilisation pourrait donc être considérée en repositionnement en combinaison avec les autres molécules utilisées en chimiothérapie dans les LAL-T comme la vincristine, l'anthracycline et la L-



asparaginase. L'effet du NECA devrait être testée en comparaison avec la dexaméthasone afin d'identifier un éventuel avantage. L'effet vasodilatateur du NECA doit être pris en considération lors des tests en vue de son repositionnement pour le traitement des LAL-T. Cependant, l'une des contraintes dans la modélisation de l'utilisation de ces molécules est que les autres molécules (vincristine, anthracycline, L-asparaginase) utilisées en clinique diminuent déjà très fortement la quantité de cellules leucémiques et l'éventuel bénéfice que le NECA peut apporter sera dissimulé par la faible quantité de cellules leucémiques.

#### Point 4 : L'inflammation peut-elle être un moteur à l'initiation ou à la progression des LAL-T ?

Les problématiques de ma thèse sont étudiées avec comme hypothèse que la diminution du microenvironnement inflammatoire moléculaire et/ou cellulaire devrait inhiber la progression leucémique. En effet, la suppression de populations cellulaires immunitaires spécifiques (les phagocytes), ou l'inhibition de la sécrétion de molécules inflammatoires



**Figure 21 : Effet de l'injection de LPS sur progression leucémique.** a) Pourcentage de neutrophiles sanguins dans les souris T-ALL#1 traitées ou non avec le LPS. b) Pourcentage de cellules T-ALL#1 dans le sang de souris traitées ou non au LPS. Sont représentées 10 souris par groupes sur 2 expériences indépendantes (moyenne +/- SEM).

sécrétées dans le microenvironnement diminuent l'amplification/expansion leucémique. Cette stratégie fonctionne particulièrement bien dans le cadre d'un modèle d'étude avec une LAL-T à progression rapide comme la leucémie ICN1 (T-ALL#1).

A l'inverse, nous nous sommes demandés si générer un environnement inflammatoire dans notre modèle de transplantation de T-ALL#1 (ICN1) pouvait être un moteur pour

l'expansion leucémique. Nous savons que les LPS qui simule une infection bactérienne en se fixant au PRR de type TLR4 à la surface des cellules immunitaires, induisent une augmentation du recrutement et de l'activation de ces cellules et favorise le relargage de molécules inflammatoires dans le plasma comme le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$ , l'IL-6, ou le CXCL12 (Seemann et al., 2017). Nous avons donc voulu savoir si l'inflammation induite par le LPS pouvait favoriser l'expansion/la croissance leucémique et observer l'effet inverse de ce que nous obtenons avec les expériences en inhibant la sécrétion de molécules inflammatoires. Bien que l'injection de LPS ait induit une augmentation du pourcentage de neutrophiles, la progression leucémique n'a pas été impactée (Figure 21). On peut supposer que l'induction d'une inflammation par le traitement de souris avec du LPS ne permet pas d'induire la sécrétion de molécules inflammatoires impactant la progression leucémique. En effet, l'inflammation induite par le LPS engendre la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  ne sont pas des molécules retrouvées dans le plasma de souris au cours de la leucémie supportant le fait que ces molécules n'aient pas modifiées la progression leucémique. Il serait intéressant de tester d'autres molécules d'induction de l'inflammation, comme le pl:pC qui simule une infection virale et génère une réaction immunitaire en se fixant aux PRR TLR3 exprimé à la surface des lymphocytes B, des macrophages et des cellules dendritiques (Alexopoulou et al., 2001; Manetti et al., 1995).

On peut également se demander si augmenter la sécrétion de molécules inflammatoires dans le microenvironnement peut contribuer à accélérer l'initiation leucémique. Au cours de ma thèse nous avons réalisé quelques expériences sur un modèle de souris mutées RPL10 R98S Lox CD2 Cre, en collaboration avec le laboratoire de Kim de Keersmaecker à Louvain, Belgique. L'expression de la Cre recombinase sous le promoteur CD2 induit l'expression de la sous-unité ribosomale RPL10 mutée spécifiquement dans la lignée lymphoïde. Cette mutation est retrouvée dans 5% des LAL-T et induit le blocage de la différenciation T au stade DN3 dans ce modèle murin (Kampen et al., 2019). Les 2 principales caractéristiques des LAL-T sont la prolifération anarchique de progéniteurs lymphoïdes T immatures et le blocage de la différenciation lymphocytaire T. L'hypothèse associée à nos expériences dans ce modèle est qu'induire une inflammation à ce modèle génétique de blocage de la différenciation T pourrait contribuer à accélérer l'initiation leucémique, à l'image des modèles expérimentaux décrits par Martín-Lorenzo ou Zhang dans des modèles de prédisposition de la LAL-B (Martín-Lorenzo et

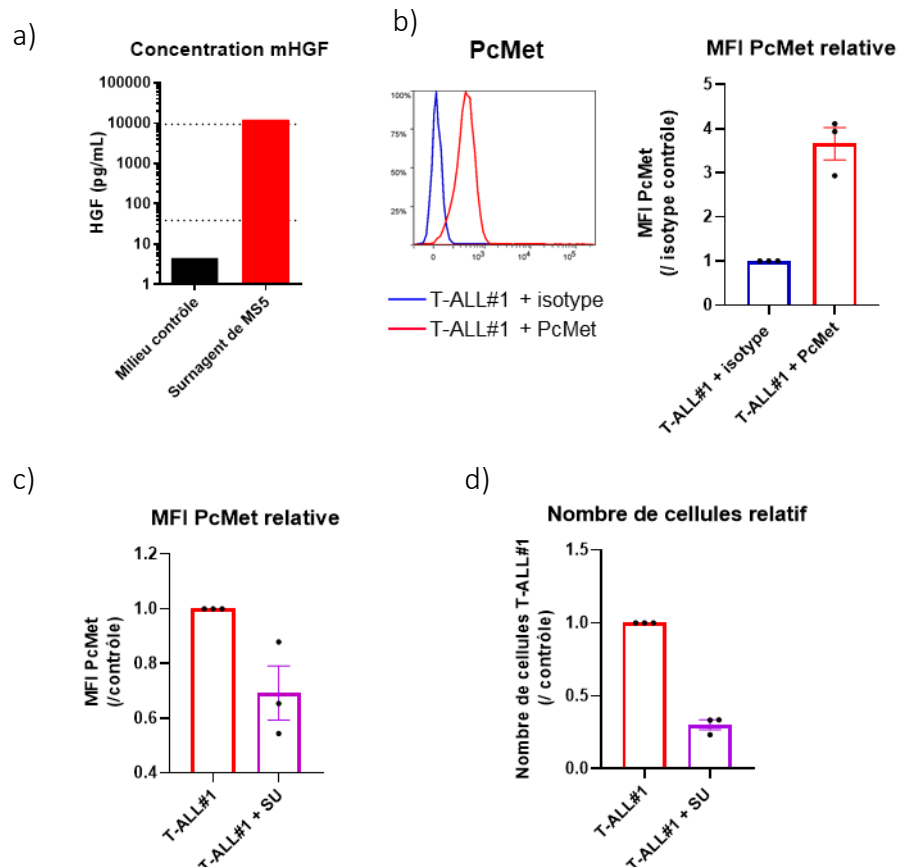
al., 2015; Zhang et al., 2022). Cette hypothèse de travail suit l'idée du Dr. Melvin Greaves décrite en introduction selon laquelle une inflammation aiguë contribue à l'initiation leucémique des LAL chez les patients pédiatriques (Greaves, 2006). Pour induire l'inflammation dans ces modèles pré-leucémiques, nous avons choisi d'injecter du LPS par voie intrapéritonéale ou de maintenir les souris dans un environnement infectieux dans la zone de l'élevage en quarantaine comprenant des agents pathogènes contrairement à la zone conventionnelle. Après le conditionnement, les souris mutées n'ont jamais développé de LAL-T malgré les traitements. Ces résultats montrent que la présence d'une mutation dans l'expression d'oncogènes majeurs (TAL1, NOTCH1, LMO1/2...) est nécessaire à l'initiation leucémique et que nos conditions d'induction de l'inflammation ne permettent pas de sélectionner un clone ayant acquis de telles mutations pour générer une LAL-T.

#### **Point 5 : Quelles sont les futurs défis pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans la LAL-T ?**

##### L'HGF comme potentielle cible thérapeutique :

Grâce à l'utilisation du NECA, nous avons identifié l'HGF comme un acteur moléculaire potentiel dans la LAL-T. Nous nous sommes concentrés sur l'HGF car il s'agit de la molécule la plus fortement augmentée dans le plasma des souris LAL-T et que c'est la plus fortement diminuée par le traitement au NECA. De plus il a été démontré que ce facteur de croissance favorisait la progression leucémique dans l'ATL (Adult T Leukemia) une leucémie des Lymphocytes T matures (Totani et al., 2020) et dans les LAM (Kentsis et al., 2012). La signalisation induite par l'HGF en se fixant à son récepteur cMet induit une cascade de réactions conduisant à la prolifération cellulaire, la survie et la motilité (Liu et al., 2020; Organ and Tsao, 2011). Cette molécule peut donc représenter un candidat potentiel dans le support de la progression des LAL-T, sans être un facteur inflammatoire à proprement parler. Après avoir identifié l'expression du récepteur cMet à la surface des blastes de T-ALL#1, nous avons voulu aller plus loin dans l'identification du rôle de cette molécule sur la progression leucémique. Pour étudier cette interaction nous nous sommes premièrement penchés sur cette interaction *in vitro*. Tout d'abord, notre modèle de culture de cellules leucémique impose l'utilisation d'un

stroma cellulaire en coculture avec nos cellules leucémiques. Nous avons quantifié l'HGF dans le surnageant des cellules stromales seules et avons découvert que cette lignée stromale murine sécrète fortement de l'HGF (jusqu'à 10 ng/ml) (Figure 22a) supportant le fait que ce facteur de



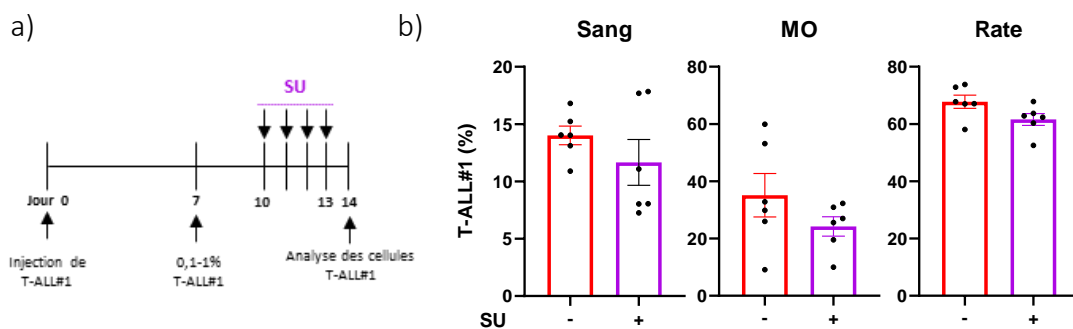
**Figure 22 : Effet de l'inhibition de la voie de signalisation HGF/cMet *in vitro* sur T-ALL#1.**

a) Quantification d'HGF murin dans le surnageant de culture de cellules stromales MS5. B) Phosphorylation du récepteur à l'HGF (PcMet) sur les cellules T-ALL#1 en présence de cellules stromales MS5 *in vitro*. c) Diminution de la MFI relative de PcMet des cellules T-ALL#1 contrôles ou traitées avec 10 $\mu$ M de SU pendant 24 heures. b) Nombre relatif de cellules T-ALL#1 après traitement 10 $\mu$ M de SU pendant 24 heures.

croissance puisse contribuer à la croissance des cellules leucémiques *in vitro*. L'HGF en se fixant sur son récepteur cMet va induire la phosphorylation de sa partie intracellulaire et activant les cascades de signalisation en aval (Parikh et al., 2014). Cette phosphorylation a pu être observée par cytométrie en flux en culture sur les cellules leucémiques T-ALL#1 grâce à un anticorps ciblant spécifiquement la partie intracellulaire phosphorylée (Figure 22b). Il existe des petites molécules comme le SU11274 (simplifié en SU) qui inhibent spécifiquement la phosphorylation activatrice de ce récepteur et est utilisé dans des modèles tumoraux (Berthou et al., 2004; Gao et al., 2013). En ajoutant cet inhibiteur au milieu de culture *in vitro*, on observe en cytométrie

en flux que cette phosphorylation activatrice de cMet est diminuée (Figure 22c). Cette inhibition de phosphorylation est suffisante pour induire une diminution entre le nombre de cellules non traitées et traitées en 24 heures (Figure 22d). Inhiber la phosphorylation de cMet des cellules T-ALL#1 *in vitro* diminue le nombre de cellules leucémiques montrant le rôle potentiellement important de la voie HGF/cMet dans la croissance des blastes.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur l'effet de l'inhibition de cette phosphorylation *in vivo*. En se basant sur un protocole utilisant cette molécule, nous avons injecté quotidiennement le SU par voie intrapéritonéale pendant 4 jours avant de sacrifier les souris (Figure 23a). Le pourcentage de T-ALL#1 est légèrement diminué dans les différents organes étudiés (Figure 23b). Cependant, cette expérience qui a été réalisée une fois, doit être répétée pour pouvoir conclure sur l'effet de cet inhibiteur *in vivo* et l'effet de l'inhibition de la phosphorylation du récepteur sur les cellules leucémiques doit être validée à l'issue du traitement. De plus, les publications utilisant cette molécule préconisent l'injection quotidienne de SU en intraveineuse ce qui va nécessiter un nouveau protocole accepté par notre comité d'éthique.



**Figure 23 : Effet du traitement SU sur les souris T-ALL#1 *in vivo*.** a) Protocole de traitement des souris. Chaque flèche correspond à une injection de SU intrapéritonéale entre le 10<sup>ème</sup> et le 13<sup>ème</sup> jour suivant l'injection de T-ALL#1. b) Pourcentage de cellules leucémiques détectées dans les différents organes au 14<sup>ème</sup> jour.

Pour conclure sur le rôle de l'HGF il faudrait d'autres preuves expérimentales pour démontrer son rôle sur la progression leucémique. Il existe plusieurs stratégies pour valider le rôle de cette signalisation dans les LAL-T. Dans un premier temps, en parallèle des expériences utilisant le SU, il serait intéressant d'ajouter un anticorps ciblant l'interaction entre l'HGF et son récepteur *in vitro* puis *in vivo* pour inhiber cette interaction ligand récepteur. On peut également imaginer diminuer l'expression du récepteur à la surface des cellules de T-ALL#1

grâce à la technique d'ARN interférant. Ces T-ALL#1 modifiées seraient ensuite injectées en souris C57BL/6. La progression leucémique et l'envahissement des différents organes serait comparées à celle de cellules T-ALL#1 non modifiées.

Finalement pour replacer cette étude dans le contexte de la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients, il serait nécessaire de détecter l'expression de cMet à la surface des cellules primaires de patient de LAL-T. Les différentes stratégies d'inhibitions de la voie (inhibiteur spécifique comme le SU, blocage de la voie de signalisation et technique d'ARN interférant) pourraient ensuite être appliquées à ces échantillons. Si ces expériences supportent l'hypothèse du rôle de support de cette signalisation dans la progression leucémique, l'HGF pourra alors être considéré comme piste thérapeutique.

#### Autres molécules comme cible thérapeutique :

A ce jour, peu de molécules ont été identifiées pour jouer un rôle sur la progression leucémique des LAL-T. On retrouve notamment l'IL-7, l'IL-18, l'IGF1, le CCL19, le CCL21 et le CXCL12 (Barata et al., 2001; Ma et al., 2014; Passaro et al., 2015; Pitt et al., 2015; Triplett et al., 2016; Uzan et al., 2014). Ces molécules sont toujours étudiées indépendamment dans ces articles. Au sein du microenvironnement, ces acteurs peuvent être retrouvés ensemble et peuvent impacter la progression leucémique simultanément. Grâce à l'utilisation du NECA, nous avons pu diminuer la sécrétion de nombreuses molécules inflammatoires en même temps. Il est donc probable que plusieurs acteurs moléculaires inhibés par le traitement NECA aient pu participer à limiter la progression leucémique et à favoriser la survie des souris. En plus de l'HGF qui est la molécule la plus fortement diminuée par le NECA, on retrouve la chimiokine CXCL13, la Serpine E1 impliquée dans le processus de coagulation et le MMP-9 une métalloprotéase impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire (dans la partie résultats, Supp. Figure 4). L'ensemble des molécules diminuées peuvent contribuer au recrutement de cellules immunitaires ou favoriser un environnement inflammatoire qui en retour supporte la progression leucémique. Il devient alors très complexe d'identifier les interactions multifactorielles qui peuvent contribuer à la progression leucémique. Nous nous sommes également interrogés sur le rôle du couple ligand récepteur CXCL13/CXCR5 dans les LAL-T. Lorsque CXCL13 se lie au CXCR5, le récepteur est internalisé par la cellule ce qui rend complexe sa détection en cytométrie en flux (Cagigi et al., 2008). L'ajout de CXCL13 au milieu de culture n'a pas modifié la croissance des cellules leucémiques compromettant l'hypothèse du rôle de CXCL13 dans la nos expérience.

Pour démontrer que les molécules inflammatoires sécrétées dans le plasma contribuent à la progression leucémique, il serait intéressant de compléter le milieu de culture des LAL-T avec du plasma de souris envahies par ces cellules leucémiques et donc enrichi en molécules inflammatoires. Seulement, des tests préliminaires ont montré que l'ajout de plasma de souris induisait le décollement des cellules stromales MS5 adhérentes nécessaire à la culture des LAL-T, ce qui a limité l'étude de cet aspect des résultats.

#### **Point 6 : Quels avantages les nouvelles technologies apportent-elles à l'étude de l'interaction entre les LAL-T et le microenvironnement ?**

Ces dernières années, la nouvelle technique de séquençage de transcriptome à l'échelle uni-cellulaire (single cell RNA sequencing) (Tang et al., 2009) a permis de faire de grands progrès dans la compréhension du fonctionnement de pathologies ou de systèmes biologiques (Baryawno et al., 2019; Laurenti and Göttgens, 2018; Tikhonova et al., 2019). Cette technique a notamment permis d'identifier qu'il y avait un fort remodelage microenvironnement immunitaire de la MO de patients de LAL-B (Witkowski et al., 2020). En effet, ils ont observé une augmentation d'une population de monocytes résidents dans la MO et dans le sang en parallèle de la LAL-B. Ils ont finalement démontré que la présence de monocyte résidents est associée avec un mauvais pronostic chez les patients LAL-B et que cette population immunitaire contribuait à la résistance aux traitements aux Inhibiteurs aux Tyrosine Kinases. Une étude similaire a été réalisé dans le cadres des AML (Lasry et al., 2022) ce qui a permis d'identifier une signature transcriptomique inflammatoire propres aux cellules leucémiques corrélée avec un mauvais pronostic, une augmentation des lymphocytes B atypiques de la MO caractéristique d'une inflammation chronique.

A ce jour, il n'existe aucune publication comportant une analyse de scRNAseq de patients de LAL-T se concentrant sur les cellules du microenvironnement. Cette technique serait un grand atout dans le cadre de notre étude et permettrait d'identifier avec précision chaque population cellulaire présente dans le microenvironnement et la contribution qu'elles peuvent avoir dans la génération d'un environnement inflammatoire. L'une des contraintes associées à cette hypothèse est que lorsque les patients se font diagnostiquer pour une LAL-T, les tissus (notamment la MO) sont souvent très envahis par les cellules leucémiques et il ne

reste que peu de cellules non leucémique. Pour pallier à cet effet, il faudrait répéter l'expérience avec suffisamment d'échantillons pour obtenir un profil de scRNAseq homogène commun à l'ensemble des patients. Il survient alors le problème de la diversité des LAL-T inter-patient. Ces expériences permettraient d'identifier une signature transcriptomique du microenvironnement inflammatoire commune à toutes les LAL-T (indépendamment de leur classification ou de l'hétérogénéité intra-patient). Ainsi, nous pourrions formuler des hypothèses plus précises sur les mécanismes inflammatoires avec lesquelles les cellules du microenvironnement supportent la progression de la LAL-T communs à tous les patients. Cela permettrait de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques en lien avec le rôle du microenvironnement inflammatoire des LAL-T.

Pour conclure, ce travail de thèse montre que la LAL-T s'accompagne d'une inflammation caractérisée par l'augmentation de populations immunitaires myéloïdes sanguines et d'une augmentation de la sécrétion de molécules inflammatoires dans le plasma. Cibler ces populations myéloïdes n'a pas permis de diminuer l'inflammation associée à la leucémie et ni d'améliorer la survie des souris, indiquant que d'autres cellules que celles étudiées en sont responsable. En revanche, inhiber la sécrétion de molécules inflammatoires spécifiquement par le microenvironnement de la leucémie grâce à un agoniste des récepteurs à l'adénosine a limité la progression leucémique et a amélioré la survie des souris. Finalement, l'inhibition de ces sécrétions a permis de dégager l'HGF comme nouveau candidat moléculaire potentiel pouvant être une cible dans le traitement des LAL-T. Des études mécanistiques supplémentaires sont nécessaires pour conclure définitivement sur un rôle de l'HGF dans le processus pro-leucémique.



## Références bibliographiques

---

- Abu, N., Rus Bakaruraini, N.A.A., Nasir, S.N., 2021. Extracellular Vesicles and DAMPs in Cancer: A Mini-Review. *Frontiers in Immunology* 12.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193–197. <https://doi.org/10.1038/35004599>
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>
- Allouch, A., Voisin, L., Zhang, Y., Raza, S.Q., Lecluse, Y., Calvo, J., Selimoglu-Buet, D., de Botton, S., Louache, F., Pflumio, F., Solary, E., Perfettini, J.-L., 2022. CDKN1A is a target for phagocytosis-mediated cellular immunotherapy in acute leukemia. *Nat Commun* 13, 6739. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34548-3>
- Aplan, P.D., Jones, C.A., Chervinsky, D.S., Zhao, X., Ellsworth, M., Wu, C., McGuire, E.A., Gross, K.W., 1997. An *scf* gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *The EMBO Journal* 16, 2408–2419. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2408>
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., Vardiman, J.W., 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Arikan, S., Bahceci, M., Tuzcu, A., Gokalp, D., 2009. Serum tumour necrosis factor-alpha and interleukin-8 levels in acromegalic patients: acromegaly may be associated with moderate inflammation. *Clinical Endocrinology* 70, 498–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03362.x>
- Armstrong, F., de la Grange, P.B., Gerby, B., Rouyez, M.-C., Calvo, J., Fontenay, M., Boissel, N., Dombret, H., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Roméo, P.-H., Ballerini, P., Pflumio, F., 2009. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood* 113, 1730–1740. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-138172>
- Arya, S.K., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., 1984. Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. *J Immunol* 133, 273–276.
- Aster, J.C., Blacklow, S.C., Pear, W.S., 2011. Notch signalling in T cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. *J Pathol* 223, 262–273. <https://doi.org/10.1002/path.2789>
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F., 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666–670. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>
- Augelli-Szafran, C.E., Wei, H.-X., Lu, D., Zhang, J., Gu, Y., Yang, T., Osenkowski, P., Ye, W., Wolfe, M.S., 2010. Discovery of Notch-Sparing  $\gamma$ -Secretase Inhibitors. *Curr Alzheimer Res* 7, 207–209.
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0)

- Ballesteros-Arias, L., Silva, J.G., Paiva, R.A., Carbonetto, B., Faísca, P., Martins, V.C., 2019. T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia as a Consequence of Thymus Autonomy. *The Journal of Immunology* 202, 1137–1144. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801373>
- Barata, J.T., Cardoso, A.A., Nadler, L.M., Boussioutis, V.A., 2001. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *Blood* 98, 1524–1531. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.5.1524>
- Barnes, P.J., 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94, 557–572. <https://doi.org/10.1042/cs0940557>
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Baryawno, N., Przybylski, D., Kowalczyk, M.S., Kfoury, Y., Severe, N., Gustafsson, K., Kokkaliaris, K.D., Mercier, F., Tabaka, M., Hofree, M., Dionne, D., Papazian, A., Lee, D., Ashenberg, O., Subramanian, A., Vaishnav, E.D., Rozenblatt-Rosen, O., Regev, A., Scadden, D.T., 2019. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell* 177, 1915–1932.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.040>
- Battula, V.L., Le, P.M., Sun, J.C., Nguyen, K., Yuan, B., Zhou, X., Sonnylal, S., McQueen, T., Ruvolo, V., Michel, K.A., Ling, X., Jacamo, R., Shpall, E., Wang, Z., Rao, A., Al-Atrash, G., Konopleva, M., Davis, R.E., Harrington, M.A., Cahill, C.W., Bueso-Ramos, C., Andreeff, M., 2017. AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth. *JCI Insight* 2. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90036>
- Bayón-Calderón, F., Toribio, M.L., González-García, S., 2020. Facts and Challenges in Immunotherapy for T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* 21, 7685. <https://doi.org/10.3390/ijms21207685>
- Belmonte, M., Hoofd, C., Weng, A.P., Giambra, V., 2016. Targeting Leukemia Stem Cells: Which Pathways Drive Self-Renewal Activity in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia? *Current Oncology* 23, 34–41. <https://doi.org/10.3747/co.23.2806>
- Belver, L., Ferrando, A., 2016. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 16, 494–507. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.63>
- Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., van't Veer, M.B., 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9, 1783–1786.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan, C., 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>
- Berthou, S., Aebbersold, D.M., Schmidt, L.S., Stroka, D., Heigl, C., Streit, B., Stalder, D., Gruber, G., Liang, C., Howlett, A.R., Candinas, D., Greiner, R.H., Lipson, K.E., Zimmer, Y., 2004. The Met kinase inhibitor SU11274 exhibits a selective inhibition pattern toward different receptor mutated variants. *Oncogene* 23, 5387–5393. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207691>
- Bhatia, M., Wang, J.C.Y., Kapp, U., Bonnet, D., Dick, J.E., 1997. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 5320–5325. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5320>

- Binder, S., Luciano, M., Horejs-Hoeck, J., 2018. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev* 43, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.08.004>
- Bobbala, D., Kandhi, R., Chen, X., Mayhue, M., Bouchard, E., Yan, J., Knecht, H., Barabé, F., Ramanathan, S., Ilangumaran, S., 2016. Interleukin-15 deficiency promotes the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia in non-obese diabetes mice with severe combined immunodeficiency. *Leukemia* 30, 1749–1752. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.28>
- Bonnet, D., Dick, J.E., 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J., 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527–530. <https://doi.org/10.1038/301527a0>
- Böttcher, J.P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrero, M., Sammicheli, S., Rogers, N.C., Sahai, E., Zelenay, S., Reis e Sousa, C., 2018. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* 172, 1022–1037.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.004>
- Boulais, P.E., Frenette, P.S., 2015. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* 125, 2621–2629. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-570192>
- Braun, A., Worbs, T., Moschovakis, G.L., Halle, S., Hoffmann, K., Bölter, J., Münk, A., Förster, R., 2011. Afferent lymph-derived T cells and DCs use different chemokine receptor CCR7-dependent routes for entry into the lymph node and intranodal migration. *Nat Immunol* 12, 879–887. <https://doi.org/10.1038/ni.2085>
- Broome, J.D., 1981. L-Asparaginase: discovery and development as a tumor-inhibitory agent. *Cancer Treat Rep* 65 Suppl 4, 111–114.
- Broz, M.L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A.E., Pollack, J.L., Erle, D.J., Barczak, A., Rosenblum, M.D., Daud, A., Barber, D.L., Amigorena, S., van't Veer, L.J., Sperling, A.I., Wolf, D.M., Krummel, M.F., 2014. Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* 26, 638–652. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.007>
- Bruchhage, K.-L., Heinrichs, S., Wollenberg, B., Pries, R., 2018. IL-10 in the microenvironment of HNSCC inhibits the CpG ODN-induced IFN- $\alpha$  secretion of pDCs. *Oncol Lett* 15, 3985–3990. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.7772>
- Buffière, A., Uzan, B., Aucagne, R., Hermetet, F., Mas, M., Nassurdine, S., Aznague, A., Carmignac, V., Tournier, B., Bouchot, O., Ballerini, P., Barata, J.T., Bastie, J.-N., Delva, L., Pflumio, F., Quéré, R., 2019. T-cell acute lymphoblastic leukemia displays autocrine production of Interleukin-7. *Oncogene* 38, 7357–7365. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0921-4>
- Buonamici, S., Trimarchi, T., Ruocco, M.G., Reavie, L., Cathelin, S., Mar, B.G., Klinakis, A., Lukyanov, Y., Tseng, J.-C., Sen, F., Gehrie, E., Li, M., Newcomb, E., Zavadil, J., Meruelo, D., Lipp, M., Ibrahim, S., Efstratiadis, A., Zagzag, D., Bromberg, J.S., Dustin, M.L., Aifantis, I., 2009. CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature* 459, 1000–1004. <https://doi.org/10.1038/nature08020>
- Burt, R., Dey, A., Aref, S., Aguiar, M., Akarca, A., Bailey, K., Day, W., Hooper, S., Kirkwood, A., Kirschner, K., Lee, S.-W., Lo Celso, C., Manji, J., Mansour, M.R., Marafioti, T., Mitchell, R.J., Muirhead, R.C., Cheuk Yan Ng, K., Pospori, C., Puccio, I., Zuborne-Alapi, K., Sahai, E., Fielding, A.K., 2019. Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute

- lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood* 134, 1415–1429.  
<https://doi.org/10.1182/blood.2019001398>
- Cagigi, A., Mowafi, F., Phuong Dang, L.V., Tenner-Racz, K., Atlas, A., Grutzmeier, S., Racz, P., Chiodi, F., Nilsson, A., 2008. Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection. *Blood* 112, 4401–4410.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140426>
- Cahu, X., Calvo, J., Poglio, S., Prade, N., Colsch, B., Arcangeli, M.-L., Leblanc, T., Petit, A., Baleyrier, F., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Junot, C., Larghero, J., Ballerini, P., Delabesse, E., Uzan, B., Pflumio, F., 2017. Bone marrow sites differently imprint dormancy and chemoresistance to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Advances* 1, 1760–1772. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017004960>
- Calderón, L., Boehm, T., 2011. Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 7517–7522.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1016428108>
- Calvo, J., Fahy, L., Uzan, B., Pflumio, F., 2019. Desperately seeking a home marrow niche for T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Advances in Biological Regulation* 74, 100640.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100640>
- Campana, D., Pui, C.-H., 2017. Minimal residual disease–guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 129, 1913–1918. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-725804>
- Carr, K.D., Sieve, A.N., Indramohan, M., Break, T.J., Lee, S., Berg, R.E., 2011. Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol* 41, 2666–2676.  
<https://doi.org/10.1002/eji.201041363>
- Carron, C., Cormier, F., Janin, A., Lacronique, V., Giovannini, M., Daniel, M.T., Bernard, O., Ghysdael, J., 2000. TEL-JAK2 transgenic mice develop T-cell leukemia. *Blood* 95, 3891–3899.
- Catherinet, C., Passaro, D., Gachet, S., Medyouf, H., Reynaud, A., Lasgi, C., Ghysdael, J., Quang, C.T., 2021. NFAT transcription factors are essential and redundant actors for leukemia initiating potential in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLOS ONE* 16, e0254184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254184>
- Ceredig, R., Rolink, A.G., 2012. The key role of IL-7 in lymphopoiesis. *Semin Immunol* 24, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.004>
- Chauveau, A., Pirgova, G., Cheng, H.-W., De Martin, A., Zhou, F.Y., Wideman, S., Rittscher, J., Ludewig, B., Arnon, T.I., 2020. Visualization of T Cell Migration in the Spleen Reveals a Network of Perivascular Pathways that Guide Entry into T Zones. *Immunity* 52, 794–807.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.03.010>
- Chen, G.Y., Nuñez, G., 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10, 826–837. <https://doi.org/10.1038/nri2873>
- Chen, S.-Y., Yang, X., Feng, W.-L., Liao, J.-F., Wang, L.-N., Feng, L., Lin, Y.-M., Ren, Q., Zheng, G.-G., 2015. Organ-Specific Microenvironment Modifies Diverse Functional and Phenotypic Characteristics of Leukemia-Associated Macrophages in Mouse T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Journal of Immunology* 194, 2919–2929.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400451>
- Chen, Y., Zhang, L., Huang, J., Hong, X., Zhao, J., Wang, Z., Zhang, K., 2017. Dasatinib and chemotherapy in a patient with early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia

- and NUP214-ABL1 fusion: A case report. *Exp Ther Med* 14, 3979–3984.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2017.5046>
- Chiaretti, S., Foà, R., 2009. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 94, 160–162.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2008.004150>
- Chiu, P.P.L., Jiang, H., Dick, J.E., 2010. Leukemia-initiating cells in human T-lymphoblastic leukemia exhibit glucocorticoid resistance. *Blood* 116, 5268–5279.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-292300>
- Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., Tanaka, M., Merad, M., Frenette, P.S., 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* 208, 261–271. <https://doi.org/10.1084/jem.20101688>
- Chow, D.C., Wenning, L.A., Miller, W.M., Papoutsakis, E.T., 2001. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J* 81, 675–684. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75732-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75732-3)
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., Shaper, J.H., 1984. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157–165.
- Clappier, E., Cuccuini, W., Cayuela, J.M., Vecchione, D., Baruchel, A., Dombret, H., Sigaux, F., Soulier, J., 2006. Cyclin D2 dysregulation by chromosomal translocations to TCR loci in T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 20, 82–86.  
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404008>
- Condamine, T., Ramachandran, I., Youn, J.-I., Gabrilovich, D.I., 2015. Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. *Annu Rev Med* 66, 97–110.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-051013-052304>
- Conter, V., Valsecchi, M.G., Parasole, R., Putti, M.C., Locatelli, F., Barisone, E., Lo Nigro, L., Santoro, N., Aricò, M., Ziino, O., Pession, A., Testi, A.M., Micalizzi, C., Casale, F., Zecca, M., Casazza, G., Tamaro, P., La Barba, G., Notarangelo, L.D., Silvestri, D., Colombini, A., Rizzari, C., Biondi, A., Masera, G., Basso, G., 2014. Childhood high-risk acute lymphoblastic leukemia in first remission: results after chemotherapy or transplant from the AIEOP ALL 2000 study. *Blood* 123, 1470–1478.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532598>
- Cordes, M., Canté-Barrett, K., van den Akker, E.B., Moretti, F.A., Kiełbasa, S.M., Vloemans, S.A., Garcia-Perez, L., Teodosio, C., van Dongen, J.J.M., Pike-Overzet, K., Reinders, M.J.T., Staal, F.J.T., 2022. Single-cell immune profiling reveals thymus-seeding populations, T cell commitment, and multilineage development in the human thymus. *Science Immunology* 7, eade0182. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.ade0182>
- Cordo', V., van der Zwet, J.C.G., Canté-Barrett, K., Pieters, R., Meijerink, J.P.P., 2021. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Roadmap to Targeted Therapies. *Blood Cancer Discovery* 2, 19–31. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-20-0093>
- Correia, N.C., Barata, J.T., 2019. MicroRNAs and their involvement in T-ALL: A brief overview. *Adv Biol Regul* 74, 100650. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100650>
- Coustan-Smith, E., Mullighan, C.G., Onciu, M., Behm, F.G., Raimondi, S.C., Pei, D., Cheng, C., Su, X., Rubnitz, J.E., Basso, G., Biondi, A., Pui, C.-H., Downing, J.R., Campana, D., 2009. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 10, 147–156. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70314-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70314-0)

- Cully, M., You, H., Levine, A.J., Mak, T.W., 2006. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 184–192. <https://doi.org/10.1038/nrc1819>
- Cunha, R.A., Johansson, B., Constantino, M.D., Sebastião, A.M., Fredholm, B.B., 1996. Evidence for high-affinity binding sites for the adenosine A2A receptor agonist [3H] CGS 21680 in the rat hippocampus and cerebral cortex that are different from striatal A2A receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353, 261–271. <https://doi.org/10.1007/BF00168627>
- Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S., Albina, J.E., 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83, 64–70. <https://doi.org/10.1189/jlb.0407247>
- De Bie, J., Demeyer, S., Alberti-Servera, L., Geerdens, E., Segers, H., Broux, M., De Keersmaecker, K., Michaux, L., Vandenberghe, P., Voet, T., Boeckx, N., Uyttebroeck, A., Cools, J., 2018. Single-cell sequencing reveals the origin and the order of mutation acquisition in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 32, 1358–1369. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0127-8>
- De Keersmaecker, K., Atak, Z.K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., Gianfelici, V., Geerdens, E., Clappier, E., Porcu, M., Lahortiga, I., Lucà, R., Yan, J., Hulselmans, G., Vranckx, H., Vandepoel, R., Sweron, B., Jacobs, K., Mentens, N., Wlodarska, I., Cauwelier, B., Cloos, J., Soulier, J., Uyttebroeck, A., Bagni, C., Hassan, B.A., Vandenberghe, P., Johnson, A.W., Aerts, S., Cools, J., 2013. Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 45, 186–190. <https://doi.org/10.1038/ng.2508>
- De Keersmaecker, K., Real, P.J., Gatta, G.D., Palomero, T., Sulis, M.L., Tosello, V., Van Vlierberghe, P., Barnes, K., Castillo, M., Sole, X., Hadler, M., Lenz, J., Aplan, P.D., Kelliher, M., Kee, B.L., Pandolfi, P.P., Kappes, D., Gounari, F., Petrie, H., Van der Meulen, J., Speleman, F., Paietta, E., Racevskis, J., Wiernik, P.H., Rowe, J.M., Soulier, J., Avran, D., Cavé, H., Dastugue, N., Raimondi, S., Meijerink, J.P.P., Cordon-Cardo, C., Califano, A., Ferrando, A.A., 2010. The TLX1 oncogene drives aneuploidy in T cell transformation. *Nat Med* 16, 1321–1327. <https://doi.org/10.1038/nm.2246>
- de Koning, H.D., Simon, A., Zeeuwen, P.L.J.M., Schalkwijk, J., 2012. Pattern Recognition Receptors in Immune Disorders Affecting the Skin. *J Innate Immun* 4, 225–240. <https://doi.org/10.1159/000335900>
- Deftos, M.L., Bevan, M.J., 2000. Notch signaling in T cell development. *Current Opinion in Immunology* 12, 166–172. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)00067-9)
- Della Gatta, G., Palomero, T., Perez-Garcia, A., Ambesi-Impiombato, A., Bansal, M., Carpenter, Z.W., De Keersmaecker, K., Sole, X., Xu, L., Paietta, E., Racevskis, J., Wiernik, P.H., Rowe, J.M., Meijerink, J.P., Califano, A., Ferrando, A.A., 2012. Reverse engineering of TLX oncogenic transcriptional networks identifies RUNX1 as tumor suppressor in T-ALL. *Nat Med* 18, 436–440. <https://doi.org/10.1038/nm.2610>
- Den Haan, J., Mebius, R., Kraal, G., 2012. Stromal cells of the mouse spleen. *Frontiers in Immunology* 3.
- Deng, J., Fleming, J.B., 2022. Inflammation and Myeloid Cells in Cancer Progression and Metastasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9.
- Deng, T., Lyon, C.J., Bergin, S., Caligiuri, M.A., Hsueh, W.A., 2016. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu Rev Pathol* 11, 421–449. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044359>

- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E., 2009. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res* 29, 313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Dinareello, C.A., 2000. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw* 11, 483–486.
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., Dick, J.E., 2012. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* 10, 120–136. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- Dumortier, A., Jeannet, R., Kirstetter, P., Kleinmann, E., Sellars, M., dos Santos, N.R., Thibault, C., Barths, J., Ghysdael, J., Punt, J.A., Kastner, P., Chan, S., 2006. Notch Activation Is an Early and Critical Event during T-Cell Leukemogenesis in Ikaros-Deficient Mice. *Mol Cell Biol* 26, 209–220. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.1.209-220.2006>
- Dutta, A., Zhao, B., Love, P.E., 2021. New insights into TCR  $\beta$ -selection. *Trends Immunol* 42, 735–750. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.06.005>
- Effendi, W.I., Nagano, T., Kobayashi, K., Nishimura, Y., 2020. Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells* 9, 785. <https://doi.org/10.3390/cells9030785>
- Einsiedel, H.G., von Stackelberg, A., Hartmann, R., Fengler, R., Schrappe, M., Janka-Schaub, G., Mann, G., Hählen, K., Göbel, U., Klingebiel, T., Ludwig, W.-D., Henze, G., 2005. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. *J Clin Oncol* 23, 7942–7950. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.1031>
- Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Galipeau, J., 2004. 911. MHC Class I and II Mismatched Marrow Stromal Cells from C57Bl/6 Mice Are Immune Rejected by Recipient Balb/c Mice. *Molecular Therapy* 9, S348. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.06.817>
- Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., Sklar, J., 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649–661. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90111-b](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90111-b)
- Epelman, S., Lavine, K.J., Randolph, G.J., 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., Saur, D., 2014. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 111, 817–822. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.215>
- Espinosa, L., Cathelin, S., D’Altri, T., Trimarchi, T., Statnikov, A., Guiu, J., Rodilla, V., Inglés-Esteve, J., Nomdedeu, J., Bellosillo, B., Besses, C., Abdel-Wahab, O., Kucine, N., Sun, S.-C., Song, G., Mullighan, C.C., Levine, R.L., Rajewsky, K., Aifantis, I., Bigas, A., 2010. The Notch/Hes1 pathway sustains NF- $\kappa$ B activation through CYLD repression in T cell leukemia. *Cancer Cell* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.08.006>
- Fahy, L., Calvo, J., Chabi, S., Renou, L., Le Maout, C., Poglio, S., Leblanc, T., Petit, A., Baruchel, A., Ballerini, P., Naguibneva, I., Haddad, R., Arcangeli, M.-L., Mazurier, F., Pflumio, F., Uzan, B., 2021a. Hypoxia favors chemoresistance in T-ALL through an HIF1 $\alpha$ -mediated mTORC1 inhibition loop. *Blood Advances* 5, 513–526. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002832>
- Fahy, L., Calvo, J., Chabi, S., Renou, L., Le Maout, C., Poglio, S., Leblanc, T., Petit, A., Baruchel, A., Ballerini, P., Naguibneva, I., Haddad, R., Arcangeli, M.-L., Mazurier, F., Pflumio, F., Uzan, B., 2021b. Hypoxia favors chemoresistance in T-ALL through an HIF1 $\alpha$ -mediated mTORC1 inhibition loop. *Blood Advances* 5, 513–526. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002832>

- Fehling, H.J., Laplace, C., Mattei, M.G., Saint-Ruf, C., von Boehmer, H., 1995. Genomic structure and chromosomal location of the mouse pre-T-cell receptor alpha gene. *Immunogenetics* 42, 275–281. <https://doi.org/10.1007/BF00176445>
- Ferrando, A.A., Armstrong, S.A., Neuberg, D.S., Sallan, S.E., Silverman, L.B., Korsmeyer, S.J., Look, A.T., 2003. Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* 102, 262–268. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3221>
- Ferrando, A.A., Neuberg, D.S., Staunton, J., Loh, M.L., Huard, C., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Pui, C.H., Downing, J.R., Gilliland, D.G., Lander, E.S., Golub, T.R., Look, A.T., 2002. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1, 75–87. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00018-1](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00018-1)
- Franklin, R.A., Liao, W., Sarkar, A., Kim, M.V., Bivona, M.R., Liu, K., Pamer, E.G., Li, M.O., 2014. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* 344, 921–925. <https://doi.org/10.1126/science.1252510>
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., Albelda, S.M., 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>
- Fulop, G.M., Phillips, R.A., 1990. The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* 347, 479–482. <https://doi.org/10.1038/347479a0>
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Bronte, V., 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253–268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Gachet, S., Genescà, E., Passaro, D., Irigoyen, M., Alcalde, H., Clémenson, C., Poglio, S., Pflumio, F., Janin, A., Lasgi, C., Dodier, S., Soyer, M., Duménil, G., Ghysdael, J., 2013. Leukemia-initiating cell activity requires calcineurin in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 27, 2289–2300. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.156>
- Gamrekelashvili, J., Giagnorio, R., Jussofie, J., Soehnlein, O., Duchene, J., Briseño, C.G., Ramasamy, S.K., Krishnasamy, K., Limbourg, A., Häger, C., Kapanadze, T., Ishifune, C., Hinkel, R., Radtke, F., Strobl, L.J., Zimmer-Strobl, U., Napp, L.C., Bauersachs, J., Haller, H., Yasutomo, K., Kupatt, C., Murphy, K.M., Adams, R.H., Weber, C., Limbourg, F.P., 2016. Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signalling. *Nat Commun* 7, 12597. <https://doi.org/10.1038/ncomms12597>
- Gao, W., Bing, X., Li, M., Yang, Z., Li, Y., Chen, H., 2013. Study of critical role of c-Met and its inhibitor SU11274 in colorectal carcinoma. *Med Oncol* 30, 546. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0546-3>
- García-Gutiérrez, V., Hernández-Boluda, J.C., 2019. Tyrosine Kinase Inhibitors Available for Chronic Myeloid Leukemia: Efficacy and Safety. *Front Oncol* 9, 603. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00603>
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R., 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00174-2)
- Gerby, B., Clappier, E., Armstrong, F., Deswarte, C., Calvo, J., Poglio, S., Soulier, J., Boissel, N., Leblanc, T., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Roméo, P.H., Ballerini, P., Pflumio, F., 2011. Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. *Leukemia* 25, 1249–1258. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.93>
- Gerby, B., Tremblay, C.S., Tremblay, M., Rojas-Sutterlin, S., Herblot, S., Hébert, J., Sauvageau, G., Lemieux, S., Lécuyer, E., Veiga, D.F.T., Hoang, T., 2014. SCL, LMO1 and Notch1



- Reprogram Thymocytes into Self-Renewing Cells. *PLoS Genet* 10, e1004768. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004768>
- Girardi, T., Vicente, C., Cools, J., De Keersmaecker, K., 2017. The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood* 129, 1113–1123. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-706465>
- González-García, S., Mosquera, M., Fuentes, P., Palumbo, T., Escudero, A., Pérez-Martínez, A., Ramírez, M., Corcoran, A.E., Toribio, M.L., 2019. IL-7R is essential for leukemia-initiating cell activity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 134, 2171–2182. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000982>
- Gordon, S., Plüddemann, A., Martinez Estrada, F., 2014. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 262, 36–55. <https://doi.org/10.1111/imr.12223>
- Graux, C., Cools, J., Melotte, C., Quentmeier, H., Ferrando, A., Levine, R., Vermeesch, J.R., Stul, M., Dutta, B., Boeckx, N., Bosly, A., Heimann, P., Uyttebroeck, A., Mentens, N., Somers, R., MacLeod, R. a. F., Drexler, H.G., Look, A.T., Gilliland, D.G., Michaux, L., Vandenberghe, P., Wlodarska, I., Marynen, P., Hagemeijer, A., 2004. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 36, 1084–1089. <https://doi.org/10.1038/ng1425>
- Greaves, M., 2018. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 18, 471–484. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6>
- Greaves, M., 2006. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6, 193–203. <https://doi.org/10.1038/nrc1816>
- Greaves, M.F., Janossy, G., Peto, J., Kay, H., 1981. Immunologically defined subclasses of acute lymphoblastic leukaemia in children: their relationship to presentation features and prognosis. *Br J Haematol* 48, 179–197.
- Greenbaum, U., Mahadeo, K.M., Kebriaei, P., Shpall, E.J., Saini, N.Y., 2020. Chimeric Antigen Receptor T-Cells in B-Acute Lymphoblastic Leukemia: State of the Art and Future Directions. *Front Oncol* 10, 1594. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01594>
- Grégoire, M., Guilloton, F., Pangault, C., Mourcin, F., Sok, P., Latour, M., Amé-Thomas, P., Flecher, E., Fest, T., Tarte, K., 2015. Neutrophils trigger a NF- $\kappa$ B dependent polarization of tumor-supportive stromal cells in germinal center B-cell lymphomas. *Oncotarget* 6, 16471–16487. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4106>
- Greten, F.R., Grivennikov, S.I., 2019. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms and Consequences. *Immunity* 51, 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>
- Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R., Fanger, N.A., 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 189, 1343–1354. <https://doi.org/10.1084/jem.189.8.1343>
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Grosveld, G.C., 2009.  $\gamma$ -secretase inhibitors: Notch so bad. *Nat Med* 15, 20–21. <https://doi.org/10.1038/nm0109-20>
- Gualdrón-López, M., Díaz-Varela, M., Toda, H., Aparici-Herraiz, I., Pedró-Cos, L., Lauzurica, R., Lacerda, M.V.G., Fernández-Sanmartín, M.A., Fernandez-Becerra, C., del Portillo, H.A., 2021. Multiparameter Flow Cytometry Analysis of the Human Spleen Applied to Studies of Plasma-Derived EVs From Plasmodium vivax Patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11.

- Gunn, M.D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L.T., Nakano, H., 1999. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189, 451–460. <https://doi.org/10.1084/jem.189.3.451>
- Guo, R.J., Bahmanyar, M., Minden, M.D., Chang, H., 2016. CD33, not early precursor T-cell phenotype, is associated with adverse outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 172, 823–825. <https://doi.org/10.1111/bjh.13545>
- Hale, L.P., Braun, R.D., Gwinn, W.M., Greer, P.K., Dewhirst, M.W., 2002. Hypoxia in the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1467-1477. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00682.2001>
- Hamilton, B.K., Rybicki, L., Abounader, D., Adekola, K., Advani, A., Aldoss, I., Bachanova, V., Bashey, A., Brown, S., DeLima, M., Devine, S., Flowers, C.R., Ganguly, S., Jagasia, M., Kennedy, V.E., Kim, D.D.H., McGuirk, J., Pullarkat, V., Romee, R., Sandhu, K., Smith, M., Ueda, M., Viswabandya, A., Vu, K., Wall, S., Zeichner, S.B., Perales, M.-A., Majhail, N.S., 2017. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Adult T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 23, 1117–1121. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.04.003>
- Han, J., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2021. A 2020 View of Thymus Stromal Cells in T Cell Development. *The Journal of Immunology* 206, 249–256. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000889>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harmon, J.M., Norman, M.R., Fowlkes, B.J., Thompson, E.B., 1979. Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line. *J Cell Physiol* 98, 267–278. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040980203>
- Hayashi, F., Means, T.K., Luster, A.D., 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102, 2660–2669. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1078>
- Hebert, J., Jm, C., J, B., F, S., 1994. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 84.
- Higashi, Y., Quevedo, H.C., Tiwari, S., Sukhanov, S., Shai, S.-Y., Anwar, A., Delafontaine, P., 2014. Interaction between Insulin-Like Growth Factor-1 and Atherosclerosis and Vascular Aging. *Cardiovascular Issues in Endocrinology* 43, 107–124. <https://doi.org/10.1159/000360571>
- Hoesel, B., Schmid, J.A., 2013. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer* 12, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Holmfeldt, L., Wei, L., Diaz-Flores, E., Walsh, M., Zhang, J., Ding, L., Payne-Turner, D., Churchman, M., Andersson, A., Chen, S.-C., McCastlain, K., Becksfort, J., Ma, J., Wu, G., Patel, S.N., Heatley, S.L., Phillips, L.A., Song, G., Easton, J., Parker, M., Chen, X., Rusch, M., Boggs, K., Vadodaria, B., Hedlund, E., Drenberg, C., Baker, S., Pei, D., Cheng, C., Huether, R., Lu, C., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Tabib, Y., Dooling, D.J., Ochoa, K., Minden, M., Lewis, I.D., To, L.B., Marltton, P., Roberts, A.W., Raca, G., Stock, W., Neale, G., Drexler, H.G., Dickins, R.A., Ellison, D.W., Shurtleff, S.A., Pui, C.-H., Ribeiro, R.C., Devidas, M., Carroll, A.J., Heerema, N.A., Wood, B., Borowitz, M.J., Gastier-Foster, J.M., Raimondi, S.C., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Hunger, S.P., Loh, M.L., Mullighan, C.G., 2013. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 45, 242–252. <https://doi.org/10.1038/ng.2532>

- Homminga, I., Pieters, R., Langerak, A.W., de Rooij, J.J., Stubbs, A., Verstegen, M., Vuerhard, M., Buijs-Gladdines, J., Kooij, C., Klous, P., van Vlierberghe, P., Ferrando, A.A., Cayuela, J.M., Verhaaf, B., Beverloo, H.B., Horstmann, M., de Haas, V., Wiekmeijer, A.-S., Pike-Overzet, K., Staal, F.J.T., de Laat, W., Soulier, J., Sigaux, F., Meijerink, J.P.P., 2011. Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 19, 484–497. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.02.008>
- Hunger, S.P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B.M., Gaynon, P.S., Winick, N.J., Reaman, G.H., Carroll, W.L., 2012. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 30, 1663–1669. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.8018>
- Inaba, H., Pei, D., Wolf, J., Howard, S.C., Hayden, R.T., Go, M., Varetchouk, O., Hahn, T., Buaboonnam, J., Metzger, M.L., Rubnitz, J.E., Ribeiro, R.C., Sandlund, J.T., Jeha, S., Cheng, C., Evans, W.E., Relling, M.V., Pui, C.-H., 2017. Infection-related complications during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Oncol* 28, 386–392. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw557>
- Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J.A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Ledergor, G., Jung, Y., Milo, I., Poulos, M.G., Kalinkovich, A., Ludin, A., Golan, K., Khatib, E., Kumari, A., Kollet, O., Shakhar, G., Butler, J.M., Rafii, S., Adams, R.H., Scadden, D.T., Lin, C.P., Lapidot, T., 2016. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* 532, 323–328. <https://doi.org/10.1038/nature17624>
- Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T., Nakahata, T., 2002. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100, 3175–3182. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0207>
- J B Vogler, 3rd, Murphy, W.A., 1988. Bone marrow imaging. *Radiology*. <https://doi.org/10.1148/radiology.168.3.3043546>
- Jacobson, K.A., Gao, Z.-G., 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5, 247–264. <https://doi.org/10.1038/nrd1983>
- Jain, N., Lamb, A.V., O'Brien, S., Ravandi, F., Konopleva, M., Jabbour, E., Zuo, Z., Jorgensen, J., Lin, P., Pierce, S., Thomas, D., Rytting, M., Borthakur, G., Kadia, T., Cortes, J., Kantarjian, H.M., Khoury, J.D., 2016. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (ETP-ALL/LBL) in adolescents and adults: a high-risk subtype. *Blood* 127, 1863–1869. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-661702>
- Jeannot, R., Mastio, J., Macias-Garcia, A., Oravec, A., Ashworth, T., Geimer Le Lay, A.-S., Jost, B., Le Gras, S., Ghysdael, J., Gridley, T., Honjo, T., Radtke, F., Aster, J.C., Chan, S., Kastner, P., 2010. Oncogenic activation of the Notch1 gene by deletion of its promoter in Ikaros-deficient T-ALL. *Blood* 116, 5443–5454. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-286658>
- Jeannin, P., Jaillon, S., Delneste, Y., 2008. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol* 20, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.013>
- Joel, M.D.M., Yuan, J., Wang, J., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., Xu, W., Mao, F., 2019. MSC: immunoregulatory effects, roles on neutrophils and evolving clinical potentials. *Am J Transl Res* 11, 3890–3904.

- Johnson, I.S., Armstrong, J.G., Gorman, M., Burnett, J.P., 1963. THE VINCA ALKALOIDS: A NEW CLASS OF ONCOLYTIC AGENTS. *Cancer Res* 23, 1390–1427.
- Jones, D.L., Wagers, A.J., 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 11–21. <https://doi.org/10.1038/nrm2319>
- Kamel-Reid, S., Dick, J.E., 1988. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242, 1706–1709. <https://doi.org/10.1126/science.2904703>
- Kampen, K.R., Sulima, S.O., Verbelen, B., Girardi, T., Vereecke, S., Rinaldi, G., Verbeeck, J., Op de Beeck, J., Uyttebroeck, A., Meijerink, J.P.P., Moorman, A.V., Harrison, C.J., Spincemaille, P., Cools, J., Cassiman, D., Fendt, S.-M., Vermeersch, P., De Keersmaecker, K., 2019. The ribosomal RPL10 R98S mutation drives IRES-dependent BCL-2 translation in T-ALL. *Leukemia* 33, 319–332. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0176-z>
- Karrman, K., Johansson, B., 2017. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer* 56, 89–116. <https://doi.org/10.1002/gcc.22416>
- Kaushik, B., Pal, D., Saha, S., 2021. Gamma Secretase Inhibitor: Therapeutic Target via NOTCH Signaling in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Drug Targets* 22, 1789–1798. <https://doi.org/10.2174/1389450122666210203192752>
- Kentsis, A., Reed, C., Rice, K.L., Sanda, T., Rodig, S.J., Tholouli, E., Christie, A., Valk, P.J.M., Delwel, R., Ngo, V., Kutok, J.L., Dahlberg, S.E., Moreau, L.A., Byers, R.J., Christensen, J.G., Woude, G.V., Licht, J.D., Kung, A.L., Staudt, L.M., Look, A.T., 2012. Autocrine activation of the MET receptor tyrosine kinase in acute myeloid leukemia. *Nat Med* 18, 1118–1122. <https://doi.org/10.1038/nm.2819>
- King, B., Trimarchi, T., Reavie, L., Xu, L., Mullenders, J., Ntziachristos, P., Aranda-Orgilles, B., Perez-Garcia, A., Shi, J., Vakoc, C., Sandy, P., Shen, S.S., Ferrando, A., Aifantis, I., 2013. The ubiquitin ligase FBXW7 modulates leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability. *Cell* 153, 1552–1566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.041>
- Kirchgesner, C.U., Patil, C.K., Evans, J.W., Cuomo, C.A., Fried, L.M., Carter, T., Oettinger, M.A., Brown, J.M., 1995. DNA-Dependent Kinase (p350) as a Candidate Gene for the Murine SCID Defect. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.7855601>
- Kitamura, D., Roes, J., Kühn, R., Rajewsky, K., 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin  $\mu$  chain gene. *Nature* 350, 423–426. <https://doi.org/10.1038/350423a0>
- Kramer, E.D., Abrams, S.I., 2020. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells as Negative Regulators of Anticancer Immunity. *Frontiers in Immunology* 11.
- Krause, D.S., Scadden, D.T., 2015. A hostel for the hostile: the bone marrow niche in hematologic neoplasms. *Haematologica* 100, 1376–1387. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.113852>
- Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A.N.R., Rieber, N., Radsak, M., Bernuth, H. von, Benarafa, C., Roos, D., Skokowa, J., Hartl, D., 2015. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLOS Pathogens* 11, e1004651. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004651>
- Kumar, R., Godavarthy, P.S., Krause, D.S., 2018. The bone marrow microenvironment in health and disease at a glance. *Journal of Cell Science* 131, jcs201707. <https://doi.org/10.1242/jcs.201707>
- Kunz, J.B., Rausch, T., Bandapalli, O.R., Eilers, J., Pechanska, P., Schuessle, S., Assenov, Y., Stütz, A.M., Kirschner-Schwabe, R., Hof, J., Eckert, C., von Stackelberg, A., Schrappe,

- M., Stanulla, M., Koehler, R., Avigad, S., Elitzur, S., Handgretinger, R., Benes, V., Weischenfeldt, J., Korbel, J.O., Muckenthaler, M.U., Kulozik, A.E., 2015. Pediatric T-cell lymphoblastic leukemia evolves into relapse by clonal selection, acquisition of mutations and promoter hypomethylation. *Haematologica* 100, 1442–1450. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.129692>
- Labidi-Galy, S.I., Sisirak, V., Meeus, P., Gobert, M., Treilleux, I., Bajard, A., Combes, J.-D., Faget, J., Mithieux, F., Cassagnol, A., Tredan, O., Durand, I., Ménétrier-Caux, C., Caux, C., Blay, J.-Y., Ray-Coquard, I., Bendriss-Vermare, N., 2011. Quantitative and Functional Alterations of Plasmacytoid Dendritic Cells Contribute to Immune Tolerance in Ovarian Cancer. *Cancer Research* 71, 5423–5434. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0367>
- Langenau, D.M., Traver, D., Ferrando, A.A., Kutok, J.L., Aster, J.C., Kanki, J.P., Lin, S., Prochownik, E., Trede, N.S., Zon, L.I., Look, A.T., 2003. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science* 299, 887–890. <https://doi.org/10.1126/science.1080280>
- Lapidot, T., Pflumio, F., Doedens, M., Murdoch, B., Williams, D.E., Dick, J.E., 1992. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 255, 1137–1141. <https://doi.org/10.1126/science.1372131>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., Dick, J.E., 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Larochelle, A., Krouse, A., Metzger, M., Orlic, D., Donahue, R.E., Fricker, S., Bridger, G., Dunbar, C.E., Hematti, P., 2006. AMD3100 mobilizes hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity in nonhuman primates. *Blood* 107, 3772–3778. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3592>
- Lasry, A., Nadorp, B., Fornerod, M., Nicolet, D., Wu, H., Walker, C.J., Sun, Z., Witkowski, M.T., Tikhonova, A.N., Guillaumot-Ruano, M., Cayanan, G., Yeaton, A., Robbins, G., Obeng, E.A., Tsigos, A., Stone, R.M., Byrd, J.C., Pounds, S., Carroll, W.L., Gruber, T.A., Eisfeld, A.-K., Aifantis, I., 2022. An inflammatory state remodels the immune microenvironment and improves risk stratification in acute myeloid leukemia. *Nat Cancer* 1–16. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00480-0>
- Laurenti, E., Göttgens, B., 2018. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553, 418–426. <https://doi.org/10.1038/nature25022>
- Lazarus, H.M., Richards, S.M., Chopra, R., Litzow, M.R., Burnett, A.K., Wiernik, P.H., Franklin, I.M., Tallman, M.S., Cook, L., Buck, G., Durrant, I.J., Rowe, J.M., Goldstone, A.H., Medical Research Council (MRC)/National Cancer Research Institute (NCRI) Adult Leukaemia Working Party of the United Kingdom and the Eastern Cooperative Oncology Group, 2006. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* 108, 465–472. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4666>
- León, B., López-Bravo, M., Ardavín, C., 2007. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519–531. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.017>
- Leoni, V., Biondi, A., 2015. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 100, 295–299. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.124016>

- Leung, W., Pui, C.-H., Coustan-Smith, E., Yang, J., Pei, D., Gan, K., Srinivasan, A., Hartford, C., Triplett, B.M., Dallas, M., Pillai, A., Shook, D., Rubnitz, J.E., Sandlund, J.T., Jeha, S., Inaba, H., Ribeiro, R.C., Handgretinger, R., Laver, J.H., Campana, D., 2012. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. *Blood* 120, 468–472. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-409813>
- Li, K., Xu, W., Lu, K., Wen, Y., Xin, T., Shen, Y., Lv, X., Hu, S., Jin, R., Wu, X., 2020. CSF-1R inhibition disrupts the dialog between leukaemia cells and macrophages and delays leukaemia progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24, 13115–13128. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15916>
- Li, S., Feng, J., Wu, F., Cai, J., Zhang, X., Wang, H., Fetahu, I.S., Iwanicki, I., Ma, D., Hu, T., Liu, H., Wang, B., Shi, G., Tan, L., Shi, Y.G., 2020. TET2 promotes anti-tumor immunity by governing G-MDSCs and CD8+ T-cell numbers. *EMBO Rep* 21, e49425. <https://doi.org/10.15252/embr.201949425>
- Liew, P.X., Kubes, P., 2019. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev* 99, 1223–1248. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018>
- Liu, C., Saito, F., Liu, Z., Lei, Y., Uehara, S., Love, P., Lipp, M., Kondo, S., Manley, N., Takahama, Y., 2006. Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood* 108, 2531–2539. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024190>
- Liu, F., Wu, H.Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., Link, D.C., 1996. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* 5, 491–501. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80504-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80504-x)
- Liu, J., Lin, P.C., Zhou, B.P., 2015. Inflammation Fuels Tumor Progress and Metastasis. *Curr Pharm Des* 21, 3032–3040.
- Liu, J., Zhang, X., Cheng, Y., Cao, X., 2021. Dendritic cell migration in inflammation and immunity. *Cell Mol Immunol* 18, 2461–2471. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00726-4>
- Liu, X., Sun, R., Chen, J., Liu, L., Cui, X., Shen, S., Cui, G., Ren, Z., Yu, Z., 2020. Crosstalk Mechanisms Between HGF/c-Met Axis and ncRNAs in Malignancy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.
- Liu, Y., Easton, J., Shao, Y., Maciaszek, J., Wang, Z., Wilkinson, M.R., McCastlain, K., Edmonson, M., Pounds, S.B., Shi, L., Zhou, X., Ma, X., Sioson, E., Li, Y., Rusch, M., Gupta, P., Pei, D., Cheng, C., Smith, M.A., Auvil, J.G., Gerhard, D.S., Relling, M.V., Winick, N.J., Carroll, A.J., Heerema, N.A., Raetz, E., Devidas, M., Willman, C.L., Harvey, R.C., Carroll, W.L., Dunsmore, K.P., Winter, S.S., Wood, B.L., Sorrentino, B.P., Downing, J.R., Loh, M.L., Hunger, S.P., Zhang, J., Mullighan, C.G., 2017. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 49, 1211–1218. <https://doi.org/10.1038/ng.3909>
- Lo, J.C., Chin, R.K., Lee, Y., Kang, H.-S., Wang, Y., Weinstock, J.V., Banks, T., Ware, C.F., Franzoso, G., Fu, Y.-X., 2003. Differential regulation of CCL21 in lymphoid/nonlymphoid tissues for effectively attracting T cells to peripheral tissues. *J Clin Invest* 112, 1495–1505. <https://doi.org/10.1172/JCI200319188>
- Lorey, S.L., Huang, Y.C., Sharma, V., 2004. Constitutive expression of Interleukin-18 and Interleukin-18 receptor mRNA in tumour derived human B-cell lines. *Clin Exp Immunol* 136, 456–462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02465.x>

- Luciano, M., Krenn, P.W., Horejs-Hoeck, J., 2022. The cytokine network in acute myeloid leukemia. *Frontiers in Immunology* 13.
- Lyu, A., Nam, S.H., Humphrey, R.S., Durham, T.A., Hu, Z., Arasappan, D., Horton, T.M., Ehrlich, L.I.R., 2022. Integrin signaling is critical for myeloid-mediated support of T-cell acute lymphoblastic leukemia (preprint). *Cancer Biology*.  
<https://doi.org/10.1101/2022.01.05.475106>
- Lyu, A., Triplett, T.A., Nam, S.H., Hu, Z., Arasappan, D., Godfrey, W.H., Ames, R.Y., Sarang, A., Selden, H.J., Lee, C.-H., Georgiou, G., Horton, T.M., Ehrlich, L.I.R., 2020. Tumor-associated myeloid cells provide critical support for T-ALL. *Blood* 136, 1837–1850.  
<https://doi.org/10.1182/blood.2020007145>
- Ma, C., Witkowski, M.T., Harris, J., Dolgalev, I., Sreeram, S., Qian, W., Tong, J., Chen, X., Aifantis, I., Chen, W., 2020. Leukemia-on-a-chip: Dissecting the chemoresistance mechanisms in B cell acute lymphoblastic leukemia bone marrow niche. *Science Advances* 6, eaba5536. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba5536>
- Ma, S., Shi, Y., Pang, Y., Dong, F., Cheng, H., Hao, S., Xu, J., Zhu, X., Yuan, W., Cheng, T., Zheng, G., 2014. Notch1-induced T cell leukemia can be potentiated by microenvironmental cues in the spleen. *Journal of Hematology & Oncology* 7, 71.  
<https://doi.org/10.1186/s13045-014-0071-7>
- MacDonald, K.P.A., Palmer, J.S., Cronau, S., Seppanen, E., Olver, S., Raffelt, N.C., Kuns, R., Pettit, A.R., Clouston, A., Wainwright, B., Branstetter, D., Smith, J., Paxton, R.J., Cerretti, D.P., Bonham, L., Hill, G.R., Hume, D.A., 2010. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* 116, 3955–3963. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-266296>
- Makujina, S.R., Sabouni, M.H., Bhatia, S., Douglas, F.L., Mustafa, S.J., 1992. Vasodilatory effects of adenosine A2 receptor agonists CGS 21680 and CGS 22492 in human vasculature. *Eur J Pharmacol* 221, 243–247. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90708-c](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90708-c)
- Mamonkin, M., Rouse, R.H., Tashiro, H., Brenner, M.K., 2015. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood* 126, 983–992. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629527>
- Manetti, R., Annunziato, F., Tomasevic, L., Giannò, V., Parronchi, P., Romagnani, S., Maggi, E., 1995. Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon-alpha and interleukin-12. *Eur J Immunol* 25, 2656–2660. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250938>
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11, 519–531.  
<https://doi.org/10.1038/nri3024>
- Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P., Bronte, V., 2008. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev* 222, 162–179. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00602.x>
- Marks, D.I., Paietta, E.M., Moorman, A.V., Richards, S.M., Buck, G., DeWald, G., Ferrando, A., Fielding, A.K., Goldstone, A.H., Ketterling, R.P., Litzow, M.R., Luger, S.M., McMillan, A.K., Mansour, M.R., Rowe, J.M., Tallman, M.S., Lazarus, H.M., 2009. T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood* 114, 5136–5145. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-231217>

- Marks, D.I., Rowntree, C., 2017. Management of adults with T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood* 129, 1134–1142. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-692608>
- Martín-Lorenzo, A., Hauer, J., Vicente-Dueñas, C., Auer, F., González-Herrero, I., García-Ramírez, I., Ginzler, S., Thiele, R., Constantinescu, S.N., Bartenhagen, C., Dugas, M., Gombert, M., Schäfer, D., Blanco, O., Mayado, A., Orfao, A., Alonso-López, D., Rivas, J.D.L., Cobaleda, C., García-Cenador, M.B., García-Criado, F.J., Sánchez-García, I., Borkhardt, A., 2015. Infection Exposure Is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of *Pax5* -Inherited Susceptibility. *Cancer Discov* 5, 1328–1343. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0892>
- Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O.I., Dick, J.E., 2003. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 9, 959–963. <https://doi.org/10.1038/nm886>
- Mazzucchelli, R., Durum, S.K., 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 7, 144–154. <https://doi.org/10.1038/nri2023>
- McCormack, M.P., Young, L.F., Vasudevan, S., de Graaf, C.A., Codrington, R., Rabbitts, T.H., Jane, S.M., Curtis, D.J., 2010. The *Lmo2* oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science* 327, 879–883. <https://doi.org/10.1126/science.1182378>
- McGuire, E.A., Rintoul, C.E., Sclar, G.M., Korsmeyer, S.J., 1992. Thymic overexpression of Ttg-1 in transgenic mice results in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Mol Cell Biol* 12, 4186–4196.
- Mebius, R.E., Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5, 606–616. <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- Mendes, R.D., Sarmiento, L.M., Canté-Barrett, K., Zurbier, L., Buijs-Gladdines, J.G.C.A.M., Póvoa, V., Smits, W.K., Abecasis, M., Yunes, J.A., Sonneveld, E., Horstmann, M.A., Pieters, R., Barata, J.T., Meijerink, J.P.P., 2014. PTEN microdeletions in T-cell acute lymphoblastic leukemia are caused by illegitimate RAG-mediated recombination events. *Blood* 124, 567–578. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-562751>
- Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D.P., Hasserjian, R.P., Ghobrial, I.M., Gribben, J.G., Andreeff, M., Krause, D.S., 2020. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer* 20, 285–298. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0245-2>
- Methot, S.P., Di Noia, J.M., 2017. Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Adv Immunol* 133, 37–87. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.11.002>
- Minuzzo, S., Agnusdei, V., Pusceddu, I., Pinazza, M., Moserle, L., Masiero, M., Rossi, E., Crescenzi, M., Hoey, T., Ponzoni, M., Amadori, A., Indraccolo, S., 2015. DLL4 regulates NOTCH signaling and growth of T acute lymphoblastic leukemia cells in NOD/SCID mice. *Carcinogenesis* 36, 115–121. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu223>
- Morello, S., Sorrentino, R., Pinto, A., 2009. Adenosine A2a receptor agonists as regulators of inflammation: pharmacology and therapeutic opportunities. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*.
- Möricke, A., Reiter, A., Zimmermann, M., Gadner, H., Stanulla, M., Dördelmann, M., Löning, L., Beier, R., Ludwig, W.-D., Ratei, R., Harbott, J., Boos, J., Mann, G., Niggli, F., Feldges, A., Henze, G., Welte, K., Beck, J.-D., Klingebiel, T., Niemeyer, C., Zintl, F., Bode, U., Urban, C., Wehinger, H., Niethammer, D., Riehm, H., Schrappe, M., German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group, 2008. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169



- unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood* 111, 4477–4489. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-112920>
- Morrison, S.J., Scadden, D.T., 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327–334. <https://doi.org/10.1038/nature12984>
- Müller, E., Christopoulos, P.F., Halder, S., Lunde, A., Beraki, K., Speth, M., Øynebråten, I., Corthay, A., 2017. Toll-Like Receptor Ligands and Interferon- $\gamma$  Synergize for Induction of Antitumor M1 Macrophages. *Frontiers in Immunology* 8.
- Mullighan, C.G., 2012. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 122, 3407–3415. <https://doi.org/10.1172/JCI61203>
- Mullighan, C.G., Phillips, L.A., Su, X., Ma, J., Miller, C.B., Shurtleff, S.A., Downing, J.R., 2008. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322, 1377–1380. <https://doi.org/10.1126/science.1164266>
- Munn, L.L., 2017. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 9. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1370>
- Murphree, L.J., Sullivan, G.W., Marshall, M.A., Linden, J., 2005. Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF- $\kappa$ B in A2A adenosine receptor induction. *Biochem J* 391, 575–580. <https://doi.org/10.1042/BJ20050888>
- Nagi, R.S., Bhat, A.S., Kumar, H., 2014. Cancer: A Tale of Aberrant PRR Response. *Front Immunol* 5, 161. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00161>
- Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J., 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037–3047. <https://doi.org/10.1084/jem.20070885>
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Okamura, H., 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19, 423–474. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.423>
- Nandi, M., Ghosh, A., Akbari, S.A., Bobbala, D., Boucher, M.-J., Menendez, A., Hoang, T., Ilangumaran, S., Ramanathan, S., 2023. IL-15 Prevents the Development of T-ALL from Aberrant Thymocytes with Impaired DNA Repair Functions and Increased NOTCH1 Activation. *Cancers (Basel)* 15, 671. <https://doi.org/10.3390/cancers15030671>
- Newton, K., Dixit, V.M., 2012. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a006049. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Noy, R., Pollard, J.W., 2014. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>
- Ntziachristos, P., Tsiganos, A., Vlierberghe, P.V., Nedjic, J., Trimarchi, T., Flaherty, M.S., Ferrer-Marco, D., da Ros, V., Tang, Z., Siegle, J., Asp, P., Hadler, M., Rigo, I., Keersmaecker, K.D., Patel, J., Huynh, T., Utro, F., Poglio, S., Samon, J.B., Paietta, E., Racevskis, J., Rowe, J.M., Rabadan, R., Levine, R.L., Brown, S., Pflumio, F., Dominguez, M., Ferrando, A., Aifantis, I., 2012. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 18, 298–302. <https://doi.org/10.1038/nm.2651>
- Ntziachristos, P., Tsiganos, A., Welstead, G.G., Trimarchi, T., Bakogianni, S., Xu, L., Loizou, E., Holmfeldt, L., Strikoudis, A., King, B., Mullenders, J., Becksfors, J., Nedjic, J., Paietta, E., Tallman, M.S., Rowe, J.M., Tonon, G., Satoh, T., Kruidenier, L., Prinjha, R., Akira, S., Van Vlierberghe, P., Ferrando, A.A., Jaenisch, R., Mullighan, C.G., Aifantis, I., 2014.

- Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 514, 513–517. <https://doi.org/10.1038/nature13605>
- O'Connor, D., Bate, J., Wade, R., Clack, R., Dhir, S., Hough, R., Vora, A., Goulden, N., Samarasinghe, S., 2014. Infection-related mortality in children with acute lymphoblastic leukemia: an analysis of infectious deaths on UKALL2003. *Blood* 124, 1056–1061. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-560847>
- Oliveira, M.L., Veloso, A., Garcia, E.G., Iyer, S., Pereira, C., Barreto, V.M., Langenau, D.M., Barata, J.T., 2022. Mutant IL7R collaborates with MYC to induce T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 36, 1533–1540. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01590-5>
- Organ, S.L., Tsao, M.-S., 2011. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol* 3, S7–S19. <https://doi.org/10.1177/1758834011422556>
- Palomero, T., Barnes, K.C., Real, P.J., Glade Bender, J.L., Sulis, M.L., Murty, V.V., Colovai, A.I., Balbin, M., Ferrando, A.A., 2006. CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to gamma-secretase inhibitors. *Leukemia* 20, 1279–1287. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404258>
- Palomero, T., Sulis, M.L., Cortina, M., Real, P.J., Barnes, K., Ciofani, M., Caparros, E., Buteau, J., Brown, K., Perkins, S.L., Bhagat, G., Agarwal, A.M., Basso, G., Castillo, M., Nagase, S., Cordon-Cardo, C., Parsons, R., Zúñiga-Pflücker, J.C., Dominguez, M., Ferrando, A.A., 2007. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med* 13, 1203–1210. <https://doi.org/10.1038/nm1636>
- Pan, X.-Q., 2012. The mechanism of the anticancer function of M1 macrophages and their use in the clinic. *Chin J Cancer* 31, 557–563. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10046>
- Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., Zhang, T., 2020. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology* 11.
- Papayannidis, C., DeAngelo, D.J., Stock, W., Huang, B., Shaik, M.N., Cesari, R., Zheng, X., Reynolds, J.M., English, P.A., Ozeck, M., Aster, J.C., Kuo, F., Huang, D., Lira, P.D., McLachlan, K.R., Kern, K.A., Garcia-Manero, G., Martinelli, G., 2015. A Phase 1 study of the novel gamma-secretase inhibitor PF-03084014 in patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. *Blood Cancer J* 5, e350. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.80>
- Parikh, R.A., Wang, P., Beumer, J.H., Chu, E., Appleman, L.J., 2014. The potential roles of hepatocyte growth factor (HGF)-MET pathway inhibitors in cancer treatment. *Onco Targets Ther* 7, 969–983. <https://doi.org/10.2147/OTT.S40241>
- Pasquini, S., Contri, C., Borea, P.A., Vincenzi, F., Varani, K., 2021. Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. *Int J Mol Sci* 22, 7685. <https://doi.org/10.3390/ijms22147685>
- Passaro, D., Irigoyen, M., Catherinet, C., Gachet, S., Da Costa De Jesus, C., Lasgi, C., Tran Quang, C., Ghysdael, J., 2015. CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 27, 769–779. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.003>
- Passaro, D., Quang, C.T., Ghysdael, J., 2016. Microenvironmental cues for T-cell acute lymphoblastic leukemia development. *Immunological Reviews* 271, 156–172. <https://doi.org/10.1111/imr.12402>
- Patel, A.A., Thomas, J., Rojek, A.E., Stock, W., 2020. Biology and Treatment Paradigms in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Older Adolescents and Adults. *Curr Treat Options Oncol* 21, 57. <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00757-5>

- Pearson, O.H., Eliel, L.P., 1950. Use of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisone in lymphomas and leukemias. *J Am Med Assoc* 144, 1349–1353. <https://doi.org/10.1001/jama.1950.02920160023005>
- Pérez-Figueroa, E., Sánchez-Cuaxospa, M., Martínez-Soto, K.A., Sánchez-Zauco, N., Medina-Sansón, A., Jiménez-Hernández, E., Torres-Nava, J.R., Félix-Castro, J.M., Gómez, A., Ortega, E., Maldonado-Bernal, C., 2016. Strong inflammatory response and Th1-polarization profile in children with acute lymphoblastic leukemia without apparent infection. *Oncology Reports* 35, 2699–2706. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4657>
- Pikarsky, E., Porat, R.M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., Ben-Neriah, Y., 2004. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461–466. <https://doi.org/10.1038/nature02924>
- Pitt, L.A., Tikhonova, A.N., Hu, H., Trimarchi, T., King, B., Gong, Y., Sanchez-Martin, M., Tsigos, A., Littman, D.R., Ferrando, A.A., Morrison, S.J., Fooksman, D.R., Aifantis, I., Schwab, S.R., 2015. CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance. *Cancer Cell* 27, 755–768. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.002>
- Plaks, V., Kong, N., Werb, Z., 2015. The Cancer Stem Cell Niche: How Essential is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell* 16, 225–238. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.015>
- Poglio, S., Cahu, X., Uzan, B., Besnard-Guérin, C., Lapillonne, H., Leblanc, T., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Petit, A., Baleyrier, F., Amsellem, S., Baud, V., Ballerini, P., Pflumio, F., 2015. Rapid childhood T-ALL growth in xenograft models correlates with mature phenotype and NF-κB pathway activation but not with poor prognosis. *Leukemia* 29, 977–980. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.317>
- Pommier, A., Audemard, A., Durand, A., Lengagne, R., Delpoux, A., Martin, B., Douguet, L., Le Campion, A., Kato, M., Avril, M.-F., Auffray, C., Lucas, B., Prévost-Blondel, A., 2013. Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 13085–13090. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300314110>
- Prockop, D.J., 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71–74. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.71>
- Pui, C.-H., Evans, W.E., 2006. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354, 166–178. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052603>
- Pui, C.-H., Mullighan, C.G., Evans, W.E., Relling, M.V., 2012. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 120, 1165–1174. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-378943>
- Pui, C.-H., Robison, L.L., Look, A.T., 2008. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371, 1030–1043. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60457-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60457-2)
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., Pear, W.S., 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11, 299–308. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80105-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80105-3)
- Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., Pollard, J.W., 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475, 222–225. <https://doi.org/10.1038/nature10138>

- Qian, B.-Z., Pollard, J.W., 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Quintás-Cardama, A., Tong, W., Manshouri, T., Vega, F., Lennon, P.A., Cools, J., Gilliland, D.G., Lee, F., Cortes, J., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G., 2008. Activity of tyrosine kinase inhibitors against human NUP214-ABL1-positive T cell malignancies. *Leukemia* 22, 1117–1124. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.80>
- Radtke, F., MacDonald, H.R., Tacchini-Cottier, F., 2013. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol* 13, 427–437. <https://doi.org/10.1038/nri3445>
- Randolph, G.J., Ochando, J., Partida-Sánchez, S., 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 26, 293–316. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090254>
- Rao, S.S., O’Neil, J., Liberator, C.D., Hardwick, J.S., Dai, X., Zhang, T., Tyminski, E., Yuan, J., Kohl, N.E., Richon, V.M., Van der Ploeg, L.H.T., Carroll, P.M., Draetta, G.F., Look, A.T., Strack, P.R., Winter, C.G., 2009. Inhibition of NOTCH Signaling by Gamma Secretase Inhibitor Engages the RB Pathway and Elicits Cell Cycle Exit in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Cancer Research* 69, 3060–3068. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4295>
- Reber, L.L., Gillis, C.M., Starkl, P., Jönsson, F., Sibilano, R., Marichal, T., Gaudenzio, N., Bérard, M., Rogalla, S., Contag, C.H., Bruhns, P., Galli, S.J., 2017. Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine* 214, 1249–1258. <https://doi.org/10.1084/jem.20161238>
- Récher, C., 2021. Clinical Implications of Inflammation in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Oncology* 11.
- Reinisch, A., Thomas, D., Corces, M.R., Zhang, X., Gratzinger, D., Hong, W.-J., Schallmoser, K., Strunk, D., Majeti, R., 2016. A humanized bone marrow ossicle xenotransplantation model enables improved engraftment of healthy and leukemic human hematopoietic cells. *Nat Med* 22, 812–821. <https://doi.org/10.1038/nm.4103>
- Renou, L., Boelle, P.-Y., Deswarte, C., Spicuglia, S., Benyoucef, A., Calvo, J., Uzan, B., Belhocine, M., Cieslak, A., Landman-Parker, J., Baruchel, A., Asnafi, V., Pflumio, F., Ballerini, P., Naguibneva, I., 2017. Homeobox protein TLX3 activates miR-125b expression to promote T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Advances* 1, 733–747. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017005538>
- Richter-Pechańska, P., Kunz, J.B., Rausch, T., Erarslan-Uysal, B., Bornhauser, B., Frismantas, V., Assenov, Y., Zimmermann, M., Happich, M., von Knebel-Doeberitz, C., von Neuhoff, N., Köhler, R., Stanulla, M., Schrappe, M., Cario, G., Escherich, G., Kirschner-Schwabe, R., Eckert, C., Avigad, S., Pfister, S.M., Muckenthaler, M.U., Bourquin, J.-P., Korbel, J.O., Kulozik, A.E., 2022. Pediatric T-ALL type-1 and type-2 relapses develop along distinct pathways of clonal evolution. *Leukemia* 36, 1759–1768. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01587-0>
- Rodewald, H.R., Ogawa, M., Haller, C., Waskow, C., DiSanto, J.P., 1997. Pro-thymocyte expansion by c-kit and the common cytokine receptor gamma chain is essential for repertoire formation. *Immunity* 6, 265–272. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80329-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80329-5)
- Rongvaux, A., Willinger, T., Takizawa, H., Rathinam, C., Auerbach, W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Eynon, E.E., Stevens, S., Manz, M.G., Flavell, R.A., 2011. Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis

- in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2378–2383.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1019524108>
- Saint Fleur-Lominy, S., Maus, M., Vaeth, M., Lange, I., Zee, I., Suh, D., Liu, C., Wu, X., Tikhonova, A., Aifantis, I., Feske, S., 2018. STIM1 and STIM2 Mediate Cancer-Induced Inflammation in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cell Reports* 24, 3045–3060.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.030>
- Salmon, J.E., Brogle, N., Brownlie, C., Edberg, J.C., Kimberly, R.P., Chen, B.X., Erlanger, B.F., 1993. Human mononuclear phagocytes express adenosine A1 receptors. A novel mechanism for differential regulation of Fc gamma receptor function. *J Immunol* 151, 2775–2785.
- Sánchez-Aguilera, A., Méndez-Ferrer, S., 2017. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cell Mol Life Sci* 74, 579–590. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2306-y>
- Sánchez-Lanzas, R., Kalampalika, F., Ganuza, M., 2022. Diversity in the bone marrow niche: Classic and novel strategies to uncover niche composition. *Br J Haematol* 199, 647–664. <https://doi.org/10.1111/bjh.18355>
- Sánchez-Martínez, D., Baroni, M.L., Gutierrez-Agüera, F., Roca-Ho, H., Blanch-Lombarte, O., González-García, S., Torrebadell, M., Junca, J., Ramírez-Orellana, M., Velasco-Hernández, T., Bueno, C., Fuster, J.L., Prado, J.G., Calvo, J., Uzan, B., Cools, J., Camos, M., Pflumio, F., Toribio, M.L., Menéndez, P., 2019. Fratricide-resistant CD1a-specific CAR T cells for the treatment of cortical T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 133, 2291–2304. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-882944>
- Sanda, T., Ln, L., Mi, B., Zp, F., H, K., A, G., W, M., J, T., Y, A., Ma, K., Ch, J., Lm, S., Ra, Y., At, L., 2012. Core transcriptional regulatory circuit controlled by the TAL1 complex in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell* 22.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.007>
- Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C., Quack, C., Falk, C.S., Umansky, V., Cerwenka, A., 2012. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol* 189, 5602–5611. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201018>
- Schrapppe, M., Valsecchi, M.G., Bartram, C.R., Schrauder, A., Panzer-Grümayer, R., Möricke, A., Parasole, R., Zimmermann, M., Dworzak, M., Buldini, B., Reiter, A., Basso, G., Klingebiel, T., Messina, C., Ratei, R., Cazzaniga, G., Koehler, R., Locatelli, F., Schäfer, B.W., Aricò, M., Welte, K., van Dongen, J.J.M., Gadner, H., Biondi, A., Conter, V., 2011. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood* 118, 2077–2084.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-338707>
- Schuchard, M., Landers, J.P., Sandhu, N.P., Spelsberg, T.C., 1993. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* 14, 659–669. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-6-659>
- Scupoli, M.T., Vinante, F., Krampera, M., Vincenzi, C., Nadali, G., Zampieri, F., Ritter, M.A., Eren, E., Santini, F., Pizzolo, G., 2003. Thymic epithelial cells promote survival of human T-cell acute lymphoblastic leukemia blasts: the role of interleukin-7. *Haematologica* 88, 1229–1237.
- Seemann, S., Zohles, F., Lupp, A., 2017. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of Biomedical Science* 24, 60.  
<https://doi.org/10.1186/s12929-017-0370-8>

- Sentís, I., Gonzalez, S., Genescà, E., García-Hernández, V., Muiños, F., Gonzalez, C., López-Arribillaga, E., Gonzalez, J., Fernandez-Ibarrondo, L., Mularoni, L., Espinosa, L., Bellosillo, B., Ribera, J.-M., Bigas, A., Gonzalez-Perez, A., Lopez-Bigas, N., 2020. The evolution of relapse of adult T cell acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biology* 21, 284. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02192-z>
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., Pamer, E.G., 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421–452. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>
- Shah, B.D., Borate, U., Kota, V.K., Zhang, L., Peker, D., Hathaway, A.R., Chavez, J.C., 2015. Multi-Institution Review of Adult Early T-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma (ETP-ALL). *Blood* 126, 3715. <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.3715.3715>
- Shaul, M.E., Levy, L., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Albelda, S.M., Fridlender, Z.G., 2016. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF $\beta$  modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncol Immunology* 5, e1232221. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1232221>
- Shi, C., Pamer, E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>
- Shiraz, P., Jehangir, W., Agrawal, V., 2021. T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia—Current Concepts in Molecular Biology and Management. *Biomedicines* 9, 1621. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111621>
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., Greiner, D.L., Handgretinger, R., 2005. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174, 6477–6489. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6477>
- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T.V., Greiner, D.L., 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154, 180–191.
- Silva, A., Laranjeira, A.B.A., Martins, L.R., Cardoso, B.A., Demengeot, J., Yunes, J.A., Seddon, B., Barata, J.T., 2011. IL-7 Contributes to the Progression of Human T-cell Acute Lymphoblastic Leukemias. *Cancer Research* 71, 4780–4789. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3606>
- Sisirak, V., Faget, J., Gobert, M., Goutagny, N., Vey, N., Treilleux, I., Renaudineau, S., Poyet, G., Labidi-Galy, S.I., Goddard-Leon, S., Durand, I., Le Mercier, I., Bajard, A., Bachelot, T., Puisieux, A., Puisieux, I., Blay, J.-Y., Ménétrier-Caux, C., Caux, C., Bendriss-Vermare, N., 2012. Impaired IFN- $\alpha$  Production by Plasmacytoid Dendritic Cells Favors Regulatory T-cell Expansion That May Contribute to Breast Cancer Progression. *Cancer Research* 72, 5188–5197. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3468>
- Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.-M., Regnault, A., García-Peydró, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.-L., Sigaux, F., 2005. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 106, 274–286. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-3900>
- Spranger, S., Dai, D., Horton, B., Gajewski, T.F., 2017. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* 31, 711–723.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.04.003>

- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., Mak, T.W., 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29–39. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81780-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81780-8)
- Stegelmeier, A.A., van Vloten, J.P., Mould, R.C., Klafuric, E.M., Minott, J.A., Wootton, S.K., Bridle, B.W., Karimi, K., 2019. Myeloid Cells during Viral Infections and Inflammation. *Viruses* 11, 168. <https://doi.org/10.3390/v11020168>
- Stonier, S.W., Schluns, K.S., 2010. Trans-presentation: A novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunology Letters* 127, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.09.009>
- Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., Arai, N., 1988. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* 8, 466–472. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.1.466-472.1988>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B.B., Siddiqui, A., Lao, K., Surani, M.A., 2009. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 6, 377–382. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>
- Tao, H., Li, L., Liao, N.-S., Schluns, K.S., Luckhart, S., Sleasman, J.W., Zhong, X.-P., 2021. Thymic Epithelial Cell-Derived IL-15 and IL-15 Receptor  $\alpha$  Chain Foster Local Environment for Type 1 Innate Like T Cell Development. *Frontiers in Immunology* 12.
- Terwilliger, T., Abdul-Hay, M., 2017. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 7, e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
- Thiel, E., 1985. Cell surface markers in leukemia: biological and clinical correlations. *Crit Rev Oncol Hematol* 2, 209–260. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(85\)80003-2](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(85)80003-2)
- Tiemessen, M.M., Jagger, A.L., Evans, H.G., van Herwijnen, M.J.C., John, S., Taams, L.S., 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19446–19451. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706832104>
- Tikhonova, A.N., Dolgalev, I., Hu, H., Sivaraj, K.K., Hoxha, E., Cuesta-Domínguez, Á., Pinho, S., Akhmetzyanova, I., Gao, J., Witkowski, M., Guillamot, M., Gutkin, M.C., Zhang, Y., Marier, C., Diefenbach, C., Kousteni, S., Heguy, A., Zhong, H., Fooksman, D.R., Butler, J.M., Economides, A., Frenette, P.S., Adams, R.H., Satija, R., Tsigos, A., Aifantis, I., 2019. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature* 569, 222–228. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1104-8>
- Todd, M.A.M., Picketts, D.J., 2012. PHF6 interacts with the nucleosome remodeling and deacetylation (NuRD) complex. *J Proteome Res* 11, 4326–4337. <https://doi.org/10.1021/pr3004369>
- Totani, H., Shinjo, K., Suzuki, M., Katsushima, K., Mase, S., Masaki, A., Ito, A., Ri, M., Kusumoto, S., Komatsu, H., Ishida, T., Inagaki, H., Iida, S., Kondo, Y., 2020. Autocrine HGF/c-Met signaling pathway confers aggressiveness in lymph node adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene* 39, 5782–5794. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01393-x>

- Tremblay, M., Tremblay, C.S., Herblot, S., Aplan, P.D., Hébert, J., Perreault, C., Hoang, T., 2010. Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes Dev.* 24, 1093–1105. <https://doi.org/10.1101/gad.1897910>
- Triplett, T.A., Cardenas, K.T., Lancaster, J.N., Hu, Z., Selden, H.J., Jasso, G.J., Balasubramanyam, S., Chan, K., Li, L., Chen, X., Marcogliese, A.N., Davé, U.P., Love, P.E., Ehrlich, L.I.R., 2016. Endogenous dendritic cells from the tumor microenvironment support T-ALL growth via IGF1R activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520245113>
- Ushach, I., Zlotnik, A., 2016. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology* 100, 481–489. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0316-144R>
- Uzan, B., Poglio, S., Gerby, B., Wu, C., Gross, J., Armstrong, F., Calvo, J., Cahu, X., Deswarte, C., Dumont, F., Passaro, D., Besnard-Guérin, C., Leblanc, T., Baruchel, A., Landman-Parker, J., Ballerini, P., Baud, V., Ghysdael, J., Baleyrier, F., Porteu, F., Pflumio, F., 2014. Interleukin-18 produced by bone marrow-derived stromal cells supports T-cell acute leukaemia progression. *EMBO Mol Med* 6, 821–834. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303286>
- Van Vlierberghe, P., Ambesi-Impombato, A., Perez-Garcia, A., Haydu, J.E., Rigo, I., Hadler, M., Tosello, V., Della Gatta, G., Paietta, E., Racevskis, J., Wiernik, P.H., Luger, S.M., Rowe, J.M., Rue, M., Ferrando, A.A., 2011. ETV6 mutations in early immature human T cell leukemias. *J Exp Med* 208, 2571–2579. <https://doi.org/10.1084/jem.20112239>
- Van Vlierberghe, P., Palomero, T., Khiabanian, H., Van der Meulen, J., Castillo, M., Van Roy, N., De Moerloose, B., Philippé, J., González-García, S., Toribio, M.L., Taghon, T., Zurbier, L., Cauwelier, B., Harrison, C.J., Schwab, C., Pisecker, M., Strehl, S., Langerak, A.W., Gecz, J., Sonneveld, E., Pieters, R., Paietta, E., Rowe, J.M., Wiernik, P.H., Benoit, Y., Soulier, J., Poppe, B., Yao, X., Cordon-Cardo, C., Meijerink, J., Rabadan, R., Speleman, F., Ferrando, A., 2010. PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 42, 338–342. <https://doi.org/10.1038/ng.542>
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., Bloomfield, C.D., 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937–951. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>
- Virchow, R., 1848. Zur pathologischen Physiologie des Bluts. II Weisses Blut (Leukämie). 563–572.
- Vrooman, L.M., Silverman, L.B., 2009. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr* 21, 1–8. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32831f1f24>
- Wachowska, M., Wojciechowska, A., Muchowicz, A., 2021. The Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Mol Sci* 23, 365. <https://doi.org/10.3390/ijms23010365>
- Waggoner, S.N., Daniels, K.A., Welsh, R.M., 2014. Therapeutic Depletion of Natural Killer Cells Controls Persistent Infection. *Journal of Virology* 88, 1953–1960. <https://doi.org/10.1128/JVI.03002-13>



- Waksman, S.A., 1960. The actinomycins and their importance in the treatment of tumors in animals and man. Introduction. *Ann N Y Acad Sci* 89, 285–286.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb20151.x>
- Waldman, A.D., Fritz, J.M., Lenardo, M.J., 2020. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 20, 651–668.  
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Wallaert, A., Durinck, K., Taghon, T., Van Vlierberghe, P., Speleman, F., 2017. T-ALL and thymocytes: a message of noncoding RNAs. *Journal of Hematology & Oncology* 10, 66.  
<https://doi.org/10.1186/s13045-017-0432-0>
- Wang, J.C.Y., Doedens, M., Dick, J.E., 1997. Primitive Human Hematopoietic Cells Are Enriched in Cord Blood Compared With Adult Bone Marrow or Mobilized Peripheral Blood as Measured by the Quantitative In Vivo SCID-Repopulating Cell Assay. *Blood* 89, 3919–3924. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.11.3919>
- Wang, W., Zimmerman, G., Huang, X., Yu, S., Myers, J., Wang, Y., Moreton, S., Nthale, J., Awadallah, A., Beck, R., Xin, W., Wald, D., Huang, A.Y., Zhou, L., 2016. Aberrant Notch Signaling in the Bone Marrow Microenvironment of Acute Lymphoid Leukemia Suppresses Osteoblast-Mediated Support of Hematopoietic Niche Function. *Cancer Research* 76, 1641–1652. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2092>
- Wei, J.-W., Huang, K., Yang, C., Kang, C.-S., 2017. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol Rep* 37, 3–9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>
- Weigent, D.A., 2013. Lymphocyte GH-axis hormones in immunity. *Cell Immunol* 285, 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.10.003>
- Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., Aster, J.C., 2004. Activating Mutations of NOTCH1 in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science* 306, 269–271.  
<https://doi.org/10.1126/science.1102160>
- Witkowski, M.T., Dolgalev, I., Evensen, N.A., Ma, C., Chambers, T., Roberts, K.G., Sreeram, S., Dai, Y., Tikhonova, A.N., Lasry, A., Qu, C., Pei, D., Cheng, C., Robbins, G.A., Pierro, J., Selvaraj, S., Mezzano, V., Daves, M., Lupo, P.J., Scheurer, M.E., Loomis, C.A., Mullighan, C.G., Chen, W., Rabin, K.R., Tsigos, A., Carroll, W.L., Aifantis, I., 2020. Extensive Remodeling of the Immune Microenvironment in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 37, 867–882.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.04.015>
- Wolfe, M.S., 2006. The  $\gamma$ -Secretase Complex: Membrane-Embedded Proteolytic Ensemble. *Biochemistry* 45, 7931–7939. <https://doi.org/10.1021/bi060799c>
- Wood, B.L., Winter, S.S., Dunsmore, K.P., Devidas, M., Chen, S., Asselin, B., Esiashvili, N., Loh, M.L., Winick, N.J., Carroll, W.L., Raetz, E.A., Hunger, S.P., 2014. T-Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) Shows Excellent Outcome, Lack of Significance of the Early Thymic Precursor (ETP) Immunophenotype, and Validation of the Prognostic Value of End-Induction Minimal Residual Disease (MRD) in Children’s Oncology Group (COG) Study AALL0434. *Blood* 124, 1. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.1.1>
- Wunderlich, M., Chou, F.-S., Sexton, C., Presicce, P., Chougnet, C.A., Aliberti, J., Mulloy, J.C., 2018. Improved multilineage human hematopoietic reconstitution and function in NSGS mice. *PLoS One* 13, e0209034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209034>
- Wylie, B., Macri, C., Mintern, J.D., Waithman, J., 2019. Dendritic Cells and Cancer: From Biology to Therapeutic Intervention. *Cancers (Basel)* 11, 521.  
<https://doi.org/10.3390/cancers11040521>

- Wyllie, B., Seppanen, E., Xiao, K., Zemek, R., Zanker, D., Prato, S., Foley, B., Hart, P.H., Kroczeck, R.A., Chen, W., Waithman, J., 2015. Cross-presentation of cutaneous melanoma antigen by migratory XCR1+CD103<sup>-</sup> and XCR1+CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Oncolmmunology* 4, e1019198. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1019198>
- Wyllie, A.H., 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555–556. <https://doi.org/10.1038/284555a0>
- Xu, D., Chan, W.L., Leung, B.P., Hunter, D., Schulz, K., Carter, R.W., McInnes, I.B., Robinson, J.H., Liew, F.Y., 1998. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 188, 1485–1492. <https://doi.org/10.1084/jem.188.8.1485>
- Yan, Y., Zhao, W., Liu, W., Li, Y., Wang, X., Xun, J., Davgadorj, C., 2021. CCL19 enhances CD8<sup>+</sup> T-cell responses and accelerates HBV clearance. *J Gastroenterol* 56, 769–785. <https://doi.org/10.1007/s00535-021-01799-8>
- Yang, F., Feng, W., Wang, H., Wang, L., Liu, X., Wang, R., Chen, C., Yang, X., Zhang, D., Ren, Q., Zheng, G., 2020. Monocyte-Derived Leukemia-Associated Macrophages Facilitate Extramedullary Distribution of T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Cancer Research* 80, 3677–3691. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0034>
- Yang, X., Feng, W., Wang, R., Yang, F., Wang, L., Chen, S., Ru, Y., Cheng, T., Zheng, G., 2018. Repolarizing heterogeneous leukemia-associated macrophages with more M1 characteristics eliminates their pro-leukemic effects. *Oncoimmunology* 7, e1412910. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1412910>
- Yu, S., Ellis, J.S., Dunn, R., Kehry, M.R., Braley-Mullen, H., 2012. Transient depletion of B cells in young mice results in activation of regulatory T cells that inhibit development of autoimmune disease in adults. *Int Immunol* 24, 233–242. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs003>
- Yu, V.W.C., Saez, B., Cook, C., Lotinun, S., Pardo-Saganta, A., Wang, Y.-H., Lymperi, S., Ferraro, F., Raaijmakers, M.H.G.P., Wu, J.Y., Zhou, L., Rajagopal, J., Kronenberg, H.M., Baron, R., Scadden, D.T., 2015. Specific bone cells produce DLL4 to generate thymus-seeding progenitors from bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* 212, 759–774. <https://doi.org/10.1084/jem.20141843>
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., Weidong, C., 2020. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol* 877, 173090. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>
- Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., Lu, C., Chen, S.-C., Wei, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J., Roberts, K.G., Pounds, S.B., Ulyanov, A., Becksfort, J., Gupta, P., Huether, R., Kriwacki, R.W., Parker, M., McGoldrick, D.J., Zhao, D., Alford, D., Espy, S., Bobba, K.C., Song, G., Pei, D., Cheng, C., Roberts, S., Barbato, M.I., Campana, D., Coustan-Smith, E., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Kleppe, M., Cools, J., Shimano, K.A., Hermiston, M.L., Doulatov, S., Eppert, K., Laurenti, E., Notta, F., Dick, J.E., Basso, G., Hunger, S.P., Loh, M.L., Devidas, M., Wood, B., Winter, S., Dunsmore, K.P., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Hong, X., Harris, C.C., Dooling, D.J., Ochoa, K., Johnson, K.J., Obenauer, J.C., Evans, W.E., Pui, C.-H., Naeve, C.W., Ley, T.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Mullighan, C.G., 2012a. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481, 157–163. <https://doi.org/10.1038/nature10725>
- Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., Lu, C., Chen, S.-C., Wei, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J.,

Roberts, K.G., Pounds, S.B., Ulyanov, A., Becksfort, J., Gupta, P., Huether, R., Kriwacki, R.W., Parker, M., McGoldrick, D.J., Zhao, D., Alford, D., Espy, S., Bobba, K.C., Song, G., Pei, D., Cheng, C., Roberts, S., Barbato, M.I., Campana, D., Coustan-Smith, E., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Kleppe, M., Cools, J., Shimano, K.A., Hermiston, M.L., Doulatov, S., Eppert, K., Laurenti, E., Notta, F., Dick, J.E., Basso, G., Hunger, S.P., Loh, M.L., Devidas, M., Wood, B., Winter, S., Dunsmore, K.P., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Hong, X., Harris, C.C., Dooling, D.J., Ochoa, K., Johnson, K.J., Obenauer, J.C., Evans, W.E., Pui, C.-H., Naeve, C.W., Ley, T.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., Mullighan, C.G., 2012b. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481, 157–163. <https://doi.org/10.1038/nature10725>

Zhang, P., Qin, M., Wang, Y., Chen, X., Miao, Y., Yuan, M., Zhou, W., Li, D., Wang, D., Wang, M., Ai, L., Ma, Y., Dong, Y., Ji, Y., 2022. Inflammation accelerates BCR-ABL1+ B-ALL development through upregulation of AID. *Blood Adv* 6, 4060–4072. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005017>



# Hypoxia favors chemoresistance in T-ALL through an HIF1 $\alpha$ -mediated mTORC1 inhibition loop

Lucine Fahy,<sup>1-3</sup> Julien Calvo,<sup>1-3,\*</sup> Sara Chabi,<sup>1-3,\*</sup> Laurent Renou,<sup>1-3</sup> Charly Le Maout,<sup>1-3</sup> Sandrine Poglio,<sup>1-3</sup> Thierry Leblanc,<sup>4</sup> Arnaud Petit,<sup>5</sup> André Baruchel,<sup>4</sup> Paola Ballerini,<sup>5</sup> Irina Naguibneva,<sup>1-3</sup> Rima Haddad,<sup>1-3</sup> Marie-Laure Arcangeli,<sup>1-3</sup> Frederic Mazurier,<sup>6,7</sup> Françoise Pflumio,<sup>1-3,†</sup> and Benjamin Uzan<sup>1-3,†</sup>

<sup>1</sup>Team Niche and Cancer in Hematopoiesis, Unité 1274, INSERM, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>2</sup>Laboratoire des Cellules Souches Hématopoïétiques et des Leucémies, Service Cellules Souches et Radiations, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM), Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Fontenay-aux-Roses, France; <sup>3</sup>Unité de Recherche (UMR)-E008 Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations, Université de Paris–Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France; <sup>4</sup>Service d'Héματο-Immuno-logie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris Diderot, Paris, France; <sup>5</sup>AP-HP, Service d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital A. Trousseau, Paris, France; <sup>6</sup>Université de Tours, Équipe d'Accueil (EA) 7501 Groupe Innovation et Ciblage Cellulaire (GICC), Tours, France; and <sup>7</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Équipes de Recherche Labellisées (ERL) 7001 Leukemic Niche & RedOx Metabolism (LNOx), Tours, France

## Key Points

- Hypoxia inhibits T-ALL cell growth by decreasing down cell cycle and mitochondria activity, making them less sensitive to chemotherapies.
- mTOR inhibitor mimicked the hypoxia effects and increased drug resistance.

Resistance to chemotherapy, a major therapeutic challenge in the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), can be driven by interactions between leukemic cells and the microenvironment that promote survival of leukemic cells. The bone marrow, an important leukemia niche, has low oxygen partial pressures that highly participate in the regulation of normal hematopoiesis. Here we show that hypoxia inhibits T-ALL cell growth by slowing down cell cycle progression, decreasing mitochondria activity, and increasing glycolysis, making them less sensitive to antileukemic drugs and preserving their ability to initiate leukemia after treatment. Activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) was diminished in hypoxic leukemic cells, and treatment of T-ALL with the mTOR inhibitor rapamycin in normoxia mimicked the hypoxia effects, namely decreased cell growth and increased quiescence and drug resistance. Knocking down (KD) hypoxia-induced factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), a key regulator of the cellular response to hypoxia, antagonized the effects observed in hypoxic T-ALL and restored chemosensitivity. HIF-1 $\alpha$  KD also restored mTOR activation in low O<sub>2</sub> concentrations, and inhibiting mTOR in HIF1 $\alpha$  KD T-ALL protected leukemic cells from chemotherapy. Thus, hypoxic niches play a protective role of T-ALL during treatments. Inhibition of HIF-1 $\alpha$  and activation of the mTORC1 pathway may help suppress the drug resistance of T-ALL in hypoxic niches.

## Introduction

Cancer treatments have greatly improved because of the progress of genomics. However, chemoresistance remains a major problem in eradicating cancer cells. Drug resistance may involve many molecular mechanisms including intrinsic metabolic adaptation of tumors, selection of cancer cells bearing additional mutations, activation of compensatory signaling pathways,<sup>1</sup> and extrinsic induced chemoprotection by the tumor microenvironment.<sup>2</sup> In fact, this resistance may rely at least partly on less proliferating or even quiescent tumor cells escaping proliferating cell targeting drugs and preserving

Submitted 30 June 2020; accepted 14 December 2020; published online 22 January 2021. DOI 10.1182/bloodadvances.2020002832.

\*J.C. and S.C. contributed equally to this study.

†F.P. and B.U. contributed equally to this study.

For data sharing, please contact the corresponding author at benjamin.uzan@cea.fr.

The current affiliation for S.P. is INSERM U1053-BaRITOn-Equipe Oncogénèse des Lymphomes Cutanés, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

The full-text version of this article contains a data supplement.

© 2021 by The American Society of Hematology

the ability to reinitiate cancers.<sup>3</sup> Identifying and resolving resistance mechanisms are thus currently major challenges in cancer treatment.

The interactions of cancer cells with their surrounding microenvironment have gained increased attention because of the hypothesis that specific supportive cells can regulate the quiescence, survival, and self-renewal of cancer cells. This relationship may underlie critical mechanisms that facilitate both disease initiation and drug resistance.<sup>4</sup>

T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is an aggressive hematologic malignancy characterized by bone marrow (BM) infiltration of immature lymphoblasts derived from transformed T-cell precursors.<sup>5</sup> After chemotherapy, the 5-year T-ALL event-free survival rate is now less than 50% for adults<sup>6</sup> and about 80% for children, both having a particularly unfavorable prognosis at relapse.<sup>5</sup> Drug-resistant blasts that survived below the detection limit suggesting complete remission may subsequently be reactivated, proliferate, and trigger the relapse. The mechanisms underlying T-ALL chemoresistance are partially understood. Data from the literature have shown that the main cause of treatment failure in relapsed ALL is the resistance to glucocorticoids<sup>7</sup> and that the enhancement of a glycolytic status in leukemic cells may induce drug resistance.<sup>8</sup> Interestingly, transcriptional profiling reveals the association of chemoresistance in T-ALL is associated with the upregulation of glycolysis, oxidative phosphorylation, cholesterol biosynthesis and glutamate metabolism, increased growth rates, and activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) and MYC signaling pathways.<sup>9</sup> The PI3K/AKT/mTOR pathway is thus an attractive target to improve treatment responses in T-ALL because it is frequently activated in association with treatment resistance. Over the last decade, various targeted inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway have been developed unraveling promising tools for enhanced treatment efficacy.<sup>10</sup>

BM has been suggested to take part in a complex crosstalk in which leukemic cells can remodel the microenvironment.<sup>11-13</sup> Hence, leukemia-supportive niches targeting treatments unveil a crucial aspect of T-ALL therapy.<sup>14</sup> In T-ALL, Hawkins et al<sup>15</sup> highlighted dynamic interactions of leukemic cells with the overall BM microenvironment but not with specific cell types. Therefore, future therapeutic interventions should target the migration/homing interactions of leukemic cells in the BM rather than cell-cell interactions to combat survival and invasion of drug-resistant T-ALL cells. Identifying how the BM microenvironment physical/biochemical properties impact T-ALL growth, in addition to the molecular mechanisms governing the quiescence of resistant cancer cell, may provide clues to efficiently target resistant cells.

Hypoxia is a key physical/biochemical microenvironmental status of BM that influences both the biology of hematopoietic stem cells and leukemic cells.<sup>16-21</sup> In hypoxia, adaptive responses have been identified as downstream effects of hypoxia-inducible factors (HIFs).<sup>22</sup> HIF-1 is a master transcription factor for oxygen sensing. It is composed of an oxygen-regulated  $\alpha$  subunit (HIF-1 $\alpha$ ) and a constitutively expressed  $\beta$  subunit (HIF-1 $\beta$ ).<sup>22</sup> Under hypoxia, stabilized HIF-1 $\alpha$  dimerizes with HIF-1 $\beta$  and is translocated into the nucleus to promote target gene transcription allowing the induction of an expression program that results in enhanced oxygen delivery to tissues.<sup>22</sup> However, the determinants of HIF-1 $\alpha$  regulation are

incompletely understood.<sup>23</sup> HIF-1 $\alpha$  protein levels are elevated in most solid tumors because of hypoxic stress or aberrant mutations.<sup>24</sup> Clinical investigations revealed that elevation of HIF-1 $\alpha$  makes tumor cells more resistant to chemotherapy and increases the likelihood of metastasis and poor outcome.<sup>25</sup> In this work, we investigated how low oxygen concentrations impact T-ALL proliferation, apoptosis leukemia-propagating activity, and chemoresistance. We identified an interesting HIF-1 $\alpha$ /mTORC1 signaling loop that orchestrates quiescence of T-ALL cells and contributes to T-ALL drug resistance.

## Materials and methods

### Human T-ALL

Human T-ALL cell samples were obtained with the informed consent of patients in accordance with the Declaration of Helsinki and the ethics regulations. Blood and/or BM samples were collected at diagnosis at Hôpital R. Debré and Hôpital A. Trousseau (Paris, France) and processed as previously described.<sup>26</sup> Culture conditions, in vivo protocols, and T-ALL cells used in this study are described in the supplemental Methods.

### Quantification of mitochondrial mass and membrane potential

Mitochondrial mass was determined using 50 nM Mitotracker Green (MTG; M7514; Thermo Fisher Scientific), and mitochondrial membrane potential was measured using 100 nM tetramethylrhodamine methyl ester (TMRE; T669; Thermo Fisher Scientific), both following the manufacturer's instructions. Briefly, leukemic cells were incubated with MTG and TMRE for 30 minutes at 37°C in their culture medium before analysis. Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (2920; Sigma-Aldrich) was added at 50  $\mu$ M, 15 minutes before the end of the labeling and used as a negative control.

### In vivo chemotherapy

For T-ALL 4-drug induction therapy, we used a 1-week schedule of vincristine (0.25 mg/kg, intravenously, Monday), dexamethasone (5 mg/kg, intraperitoneally, each day Monday-Friday), L-asparaginase (1000 U/kg, intraperitoneally, each day Monday-Friday), and cytarabine (Ara-C, 2.5 mg/kg, intravenously, Monday). At the end of treatment, the mice were euthanized, and the percentage of leukemia cells in the BM was evaluated.

### Lentiviral vectors and transduction of T-ALL cells

Short hairpin RNA (shRNA) targeting 5'-GTGATGAAAGAATTA CCGAAT-3' of HIF1 $\alpha$  (NM\_181054.1, NM\_001530.2; hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  subunit; shHIF-1 $\alpha$ ) was cloned in the pTRIP/ $\Delta$ U3-MND-GFP vector and vectors were produced as previously described.<sup>27</sup> shHIF-1 $\alpha$ .2 vector construct was provided by the F.M. laboratory.<sup>20</sup> T-ALL cells were transduced as in Gerby et al.<sup>28</sup> Control shRNA vector contained the 5' GTGTTGGGTCGCGAAAGG of hepatitis C strain SL8 polyprotein (MN628597.1).<sup>29</sup> shRNA control was cloned in pTRIP/ $\Delta$ U3-MND-GFP or in pTRIP/ $\Delta$ U3-MND-Cherry vectors.

### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Values are presented as the mean or median  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons between conditions

were determined using nonparametric (Wilcoxon or Friedman test) or parametric test (1-way analysis of variance). Survival of mice was compared using the log-rank (Mantel-Cox) test. Differences with  $P < .05$ ,  $P < .01$ ,  $P < .001$ , or  $P < .0001$  are considered statistically significant.

## Results

### Hypoxia modulates apoptosis, cell cycle, and metabolism of T-ALL cells

Leukemic cells from 5 human T-ALL patient samples and 3 T-ALL mouse models (supplemental Table) were cocultured with MS5 or MS5-DL1 stromal cells<sup>30</sup> for 4 days in 1%, 3.5%, and 21% O<sub>2</sub> (hereafter called normoxia). At the end of the culture, T-ALL cells were counted by flow cytometry using CD45 and CD7 expression on cells, as, respectively, pan hematopoietic and T-cell markers. We observed that hypoxia strongly inhibits CD45<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup> T-ALL cell growth with twice less cells in 3.5% O<sub>2</sub> than in normoxia and no growth in 1% O<sub>2</sub> condition (Figure 1A; supplemental Figure 1A). A direct effect of hypoxia on leukemic cells (rather than a rebound effect on stromal cells) was tested with 3 human T-ALL samples that can grow without stromal support (T-ALL #1, #3, and #4) in contrast to most T-ALL samples.<sup>30</sup> The results showed that hypoxia inhibits T-ALL growth although stromal cells were absent from the culture (supplemental Figure 1A), suggesting that hypoxia directly affects T-ALL cells through cellular cycle arrest or induced cell death. Interestingly, T-ALL cells long-term cultured in hypoxic conditions did not grow during this period but retained a proliferation potential. Indeed, at the end of the 3-week culture, T-ALL cells grew back when they were cultured in normoxia (supplemental Figure 1B). Annexin-V staining showed that after 4 days of hypoxia, T-ALL cells that persisted did not exhibit significant apoptosis (Figure 1B). Of note, higher apoptotic cells could be detected, especially at 1% O<sub>2</sub> (median levels <6%), when a larger gating strategy was applied, indicating that low O<sub>2</sub> may induce some cells to die (data not shown). Measuring lactate dehydrogenase levels in culture media, indicative of unspecific release of this intracytoplasmic enzyme caused by cell death, shows a very slight increase only at 1% O<sub>2</sub>, further supporting limited apoptosis induction in hypoxia (supplemental Figure 1C). Further analyzes showed that hypoxia rather impacted T-ALL growth by increasing quiescence and reducing cell cycle progression. Indeed, the percentage of leukemic cells in G<sub>0</sub> was 33% and 40% in, respectively, 3.5% O<sub>2</sub> and 1% O<sub>2</sub> vs 20% in 21% O<sub>2</sub>, whereas 12% and 8% of cells in hypoxia vs 22% of cells in normoxia were in the S phase of cell cycle (Figure 1C; supplemental Figure 1D). As cell exposure to hypoxic conditions may also alter energetic metabolism through mitochondrial morphology, size, and mean velocity, we next incubated T-ALL cultured in various O<sub>2</sub> concentrations with MTG and TMRE. Low MTG and TMRE detection was observed in hypoxic compared with normoxic T-ALL cells, indicating mitochondrial mass decrease and weaker activity or depolarization of the mitochondria membrane (Figure 1D). Increased anaerobic glycolysis was observed with elevation of lactate levels in T-ALL culture medium as O<sub>2</sub> levels decreased, further indicative of metabolic switch in hypoxia (Figure 1E). Altogether these data suggest an increased quiescence and a significant mitochondrial rewiring in leukemic cells under hypoxia.

### Hypoxia induces HIF target gene expression in T-ALL

Cell adaptation to hypoxia requires the activation of transcriptional programs that coordinate expression of genes involved in oxygen delivery (notably via angiogenesis) and metabolic adaptation (via glucose uptake) but also genes such as those implicated in cell trafficking in and out of hypoxic tissue microenvironments (via chemotactic responsiveness to SDF1/CXCR4).<sup>31</sup> First, we validated the induction of the hypoxic state in our culture through the expression of *HIF-1 $\alpha$* . As expected, the transcriptional expression of *HIF-1 $\alpha$*  remained equivalent in the leukemic cells regardless of the O<sub>2</sub> levels (Figure 1F; supplemental Figure 1E), whereas HIF-1 $\alpha$  protein was stabilized and translocated in the nucleus of T-ALL cells in hypoxic cultures (supplemental Figures 1F and 3Bi), triggering increased expression of target genes such as vascular and epithelial growth factor (*VEGF*), glucose transporter 3 (*GLUT3* has both a higher affinity for glucose and at least a fivefold greater transport capacity than GLUT1, GLUT2, and GLUT4<sup>32</sup>), and C-X-C chemokine receptor type 4 (*CXCR4*)<sup>33</sup>. These expression levels were inversely correlated with O<sub>2</sub> levels (Figure 1F). Of note, the level of *EPAS1/HIF-2 $\alpha$*  transcript expression was very low in T-ALL cells, even in hypoxic conditions (supplemental Figure 1D).

### Functional status of hypoxic T-ALL cells

Because T-ALL cells cultured in low O<sub>2</sub> levels are metabolically distinct from their T-ALL counterparts cultured in normoxia, we tested their functional potentials (ie, growth and leukemia-propagating abilities) using in vitro and in vivo xenograft models. First, we observed that leukemic cells recovered from hypoxia cultures and retain their ability to proliferate in vitro when they are reincubated in normoxia for a long period, starting with same cell numbers. In fact, when leukemic cells were analyzed shortly after secondary culture initiation (eg, at 7 days), a difference in cell number was detected comparing the original cell culture O<sub>2</sub> levels (Figure 2A), suggesting a significant hypoxia imprinting on T-ALL growth soon after hypoxia treatment. These differences were abolished when the culture was extended for 28 days regardless of the O<sub>2</sub> levels applied to the precultures (Figure 2B), meaning that low O<sub>2</sub> tensions maintain the leukemic cells in a slow/quiescent state but do not abolish in vitro growth recovery. Leukemic cells collected after 4 days of hypoxic/normoxic cultures were also injected into immune-deficient NSG mice, and leukemia propagation was measured by regular mouse BM samplings. As expected, leukemia gradually invaded the BM cavity over time (Figure 2C). Among the 3 tested samples, 2 T-ALL samples (#1 and #2) showed similar ability to propagate disease whether leukemic cells were precultured in hypoxia or normoxia, whereas hypoxic leukemic blasts of T-ALL#3 were more aggressive (Figure 2D). Altogether, these results show that T-ALL samples maintain their in vitro and in vivo growth potential despite hypoxia-induced quiescence and metabolic changes.

### Hypoxia and T-ALL chemoresistance

We then assumed that the intrinsic T-ALL drugs sensitivity might differ whether the leukemic cells were cultured in hypoxia or normoxia. To challenge this hypothesis, leukemic cells were preincubated 24 hours in hypoxia or normoxia and then treated for an additional 72 hours in medium containing 10 nM vincristine sulfate, 500 nM cytarabine, or 100 nM dexamethasone while maintaining respective O<sub>2</sub> tension. At the end of the chemotherapy

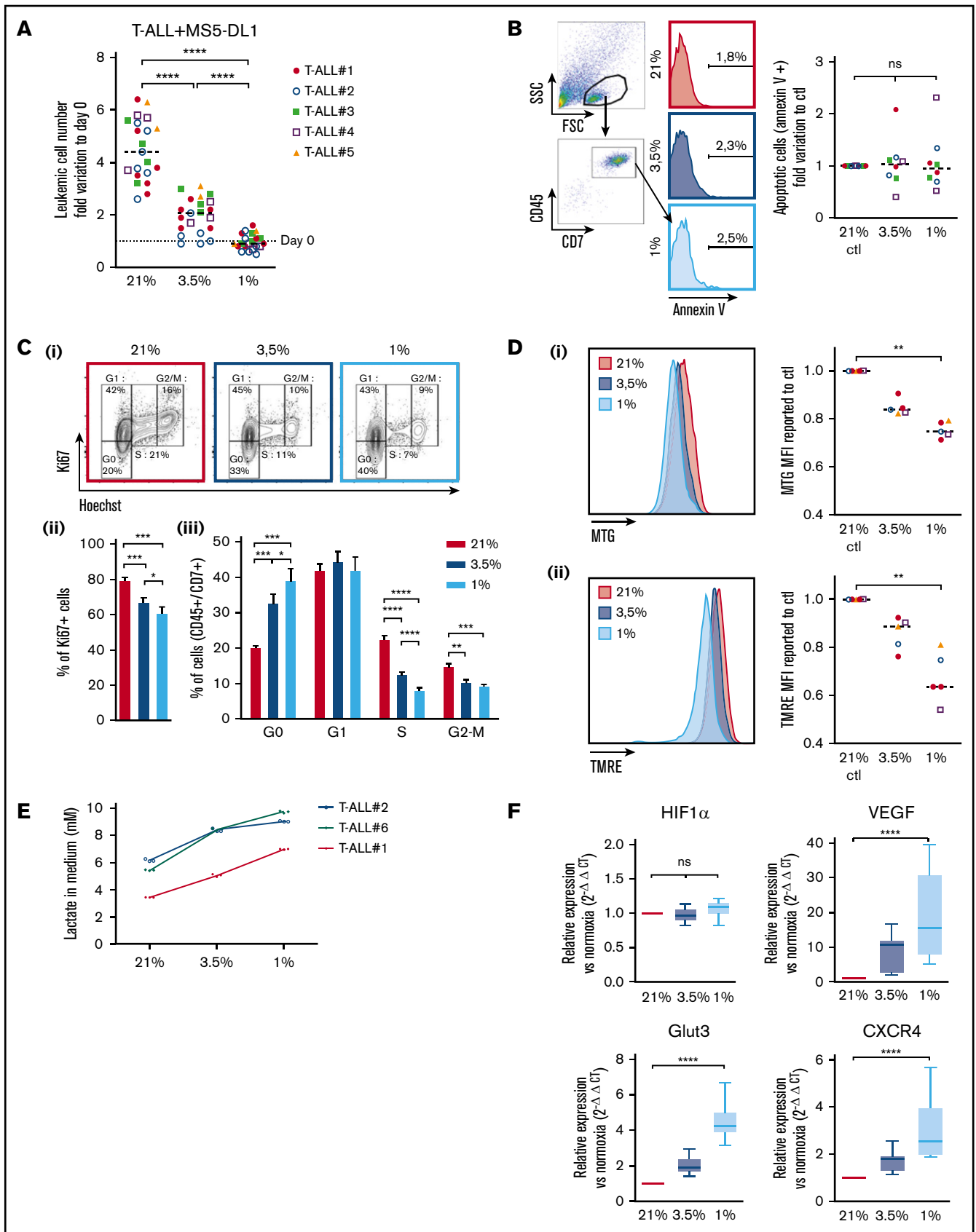


Figure 1.



treatments, a difference in the harvested leukemic cell number was detected between hypoxic and normoxic conditions, with more live cells after vincristine treatment in hypoxia than in normoxia (Figure 3A). By calculating the percentage of live cells after drug exposure, we further observed that hypoxic T-ALL cells displayed a lower sensitivity to cell cycle–related drugs (ie, vincristine and cytarabine) but also to dexamethasone compared with normoxic cells (Figure 3B; supplemental Figure 2A). Importantly, leukemic cells grew back in vitro in permissive conditions only when live T-ALL cells had been treated 72 hours with 10 nM vincristine in hypoxia and not in normoxia (Figure 3C). Similarly, cells treated with vincristine in hypoxia before transplant in immune-deficient NSG mice generated leukemia faster in the mouse BM. Mice receiving drug-treated hypoxic cells succumbed 2.5 to 10 weeks before the mice injected with leukemic cells treated with vincristine in normoxia (Figure 3D-E; supplemental Figure 2B-C). These results indicate that hypoxia lowers T-ALL sensitivity to chemotherapy and provides a resistance status.

### HIF-1 $\alpha$ levels impact T-ALL chemoresistance in hypoxia

Hypoxia has been shown to promote cancer stemness through HIF factors.<sup>34</sup> HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  are elevated in various cancer patients and associated with poor prognosis.<sup>35</sup> HIF-2 $\alpha$  transcripts are weakly expressed in T-ALL (supplemental Figure 1D); therefore, we focused our work on HIF-1 $\alpha$  and knocked down (KD) its expression to evaluate its role in hypoxia-mediated chemoresistance. The efficiency of the HIF-1 $\alpha$  shRNA (shHIF-1 $\alpha$ .1) was measured in transduced and fluorescence-activated cell sorter–sorted T-ALL samples cultured in hypoxia or normoxia (supplemental Figure 3A). A significant reduction in mRNA and protein levels was observed using shHIF-1 $\alpha$ .1 vector, with 55% to 85% lower mRNA expression relative to control (Figure 4A; supplemental Figure 3B). As a consequence of HIF-1 $\alpha$  KD in T-ALL, a significant reduction of its target gene expression *VEGF* and *GLUT3* was detected in all tested T-ALL samples cultured in hypoxia, whereas a decrease in *CXCR4* was observed in some samples only (Figure 4A).

We next determined whether HIF-1 $\alpha$  KD affected T-ALL cell growth in vitro. We first observed that the HIF-1 $\alpha$  KD did not interfere with T-ALL cell growth in normoxia, indicating no obvious side effects of the 2 shHIF-1 $\alpha$  constructs (Figure 4B; supplemental Figure 3C).

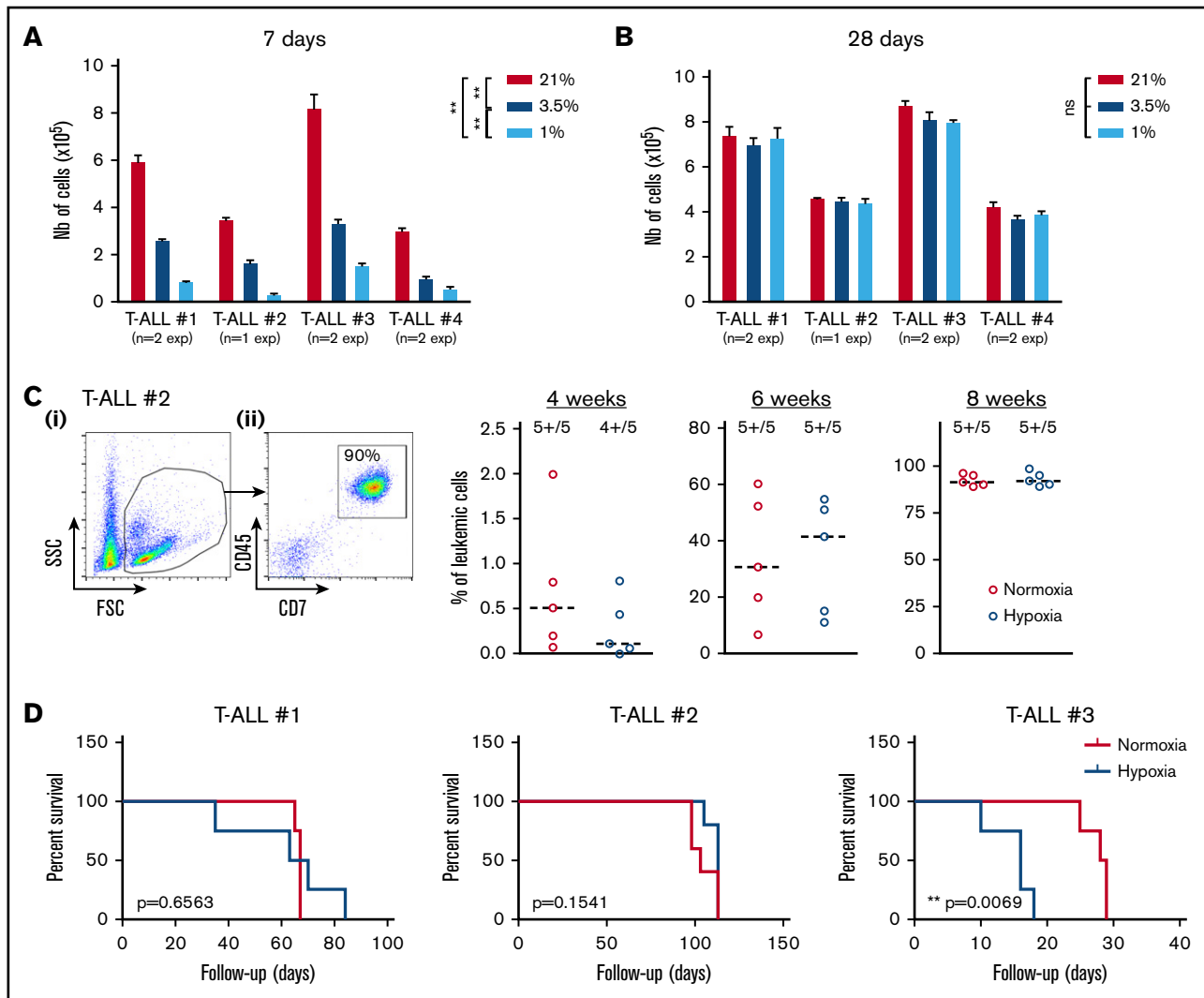
Interestingly, the growth of T-ALL cells that is decreased in hypoxia was partially restored on HIF-1 $\alpha$  KD (Figure 4B; supplemental Figure 3C). Furthermore, when transduced T-ALL cells were cultured in hypoxia, the proportion of quiescent leukemic cells was lower in HIF-1 $\alpha$  KD compared with the control shRNA condition (Figure 4C; supplemental Figure 3D). This indicates that HIF-1 $\alpha$  silencing decreases hypoxia-induced quiescence. In accordance with the in vitro data, we observed that HIF-1 $\alpha$  KD enhanced leukemic cell propagation of hypoxic T-ALL cells when transplanted in immune-deficient NSG mice but with no major impact on mouse survival (supplemental Figure 3E).

Next, we used HIF-1 $\alpha$  KD T-ALL blasts to assess whether HIF-1 $\alpha$  inhibition could modify hypoxia-induced drug resistance. We observed that silencing HIF-1 $\alpha$  in T-ALL blocked the hypoxia-mediated resistance to vincristine, reaching same levels of live cells as T-ALL cells treated with vincristine in normoxia (Figure 4D). Moreover, these HIF-1 $\alpha$  KD T-ALL cells treated with vincristine in hypoxia, unlike control cells, became unable to grow in a drug-free medium for during 7 days in normoxic atmosphere (Figure 4E). These results indicate that HIF-1 $\alpha$  is a major effector in the hypoxia-related drug resistance of T-ALL.

### HIF-1 $\alpha$ levels impact on T-ALL chemosensitivity in vivo

We next sought to determine whether HIF-1 $\alpha$  levels also impacted T-ALL chemosensitivity in vivo as HIF1 $\alpha$  is stabilized in T-ALL recovered from mouse BM (supplemental Figure 5A). Leukemia propagation was studied using a (1:1) competitive transplantation of shHIF-1 $\alpha$  (GFP<sup>+</sup>) cells mixed with shCTL (Cherry<sup>+</sup>) cells from T-ALL #1 (Figure 5A-B). In agreement with supplemental Figure 3E, leukemia development was enhanced with shHIF-1 $\alpha$  cells that overgrew shCTL cells within 9 weeks (Figure 5C; supplemental Figure 5B). Thereafter, the same mice were treated for a week with a combination of vincristine, L-asparaginase, dexamethasone, and cytarabine.<sup>36</sup> As expected, leukemic cell levels dropped down by >75% as a consequence of the treatment (Figure 5C-D). Importantly we also observed a significant drop of shHIF-1 $\alpha$  T-ALL cells and inversely an increase of shCTL cells in the treated mouse BM (Figure 5C, E-F). Of note, KD of HIF1 $\alpha$  was still efficient in the human leukemic cells engrafted in mouse BM, indicating the shRNA strategy remains functional over time even after their in vivo injection (Figure 5G). These results indicate that HIF-1 $\alpha$  silencing sensitizes T-ALL to treatment,

**Figure 1. Hypoxia modulates apoptosis, cell cycle, and metabolism in T-ALL.** (A) Growth of T-ALL in conditions of low and high O<sub>2</sub> levels. Shown are the numbers of leukemic cells after 4 days of culture in normoxia and hypoxia expressed as fold variation compared with number of cells plated at day 0 in contact with MS5-DL1 cells. Every dot is the mean of technical triplicates for 1 experiment. T-ALL #1, n = 6exp; T-ALL #2, n = 6exp; T-ALL #3, n = 4exp; T-ALL #4, n = 3exp; and T-ALL #5, n = 2exp. (B) Apoptosis levels for T-ALL in culture at high and low O<sub>2</sub> levels. Shown are fold variation of apoptotic cells relative to control, gated on lymphocyte cells. Every experiment was done in technical triplicate. T-ALL #1, T-ALL #2, T-ALL #3, and T-ALL #4, n = 2exp for each T-ALL. (C) Cell cycle analysis of T-ALL in high and low O<sub>2</sub> levels. (i) Representative plots of Ki67/Hoechst staining of T-ALL #1. Proportion of Ki67<sup>+</sup> leukemic cells (ii) and proportion of cells in G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, and G<sub>2</sub>/M phases (iii). Shown are mean  $\pm$  SEM of cultures with T-ALL #1 and T-ALL #3, n = 6exp. (D) Metabolic status of T-ALL in high and low O<sub>2</sub> levels. MTG (i) and TMRE (ii) staining of a representative experiment (T-ALL #2) and MFI from T-ALL cultured in hypoxia reported to controls. Every experiment was done in triplicate. T-ALL #1, T-ALL #2, T-ALL #4, and T-ALL #5, n = 1exp for each T-ALL except for T-ALL #1, which was n = 2exp. (E) Lactate levels in T-ALL medium cultured in hypoxia. The blasts were cultured for 3 days in hypoxia or normoxia. The measure of lactate levels was performed on the culture medium according to the manufacturer protocol (lactate assay kit: 03183700; Roche). Shown are mean  $\pm$  standard deviation of lactate triplicate values. One experiment was done with each leukemia sample. (F) Relative mRNA expression levels of HIF-1 $\alpha$ , Glut3, VEGF, and CXCR4 genes. Tested on T-ALL #1, T-ALL #2, T-ALL #3, and T-ALL #4, n = 9exp. Statistics were done using the Friedman test: \*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .001. exp, experiment.



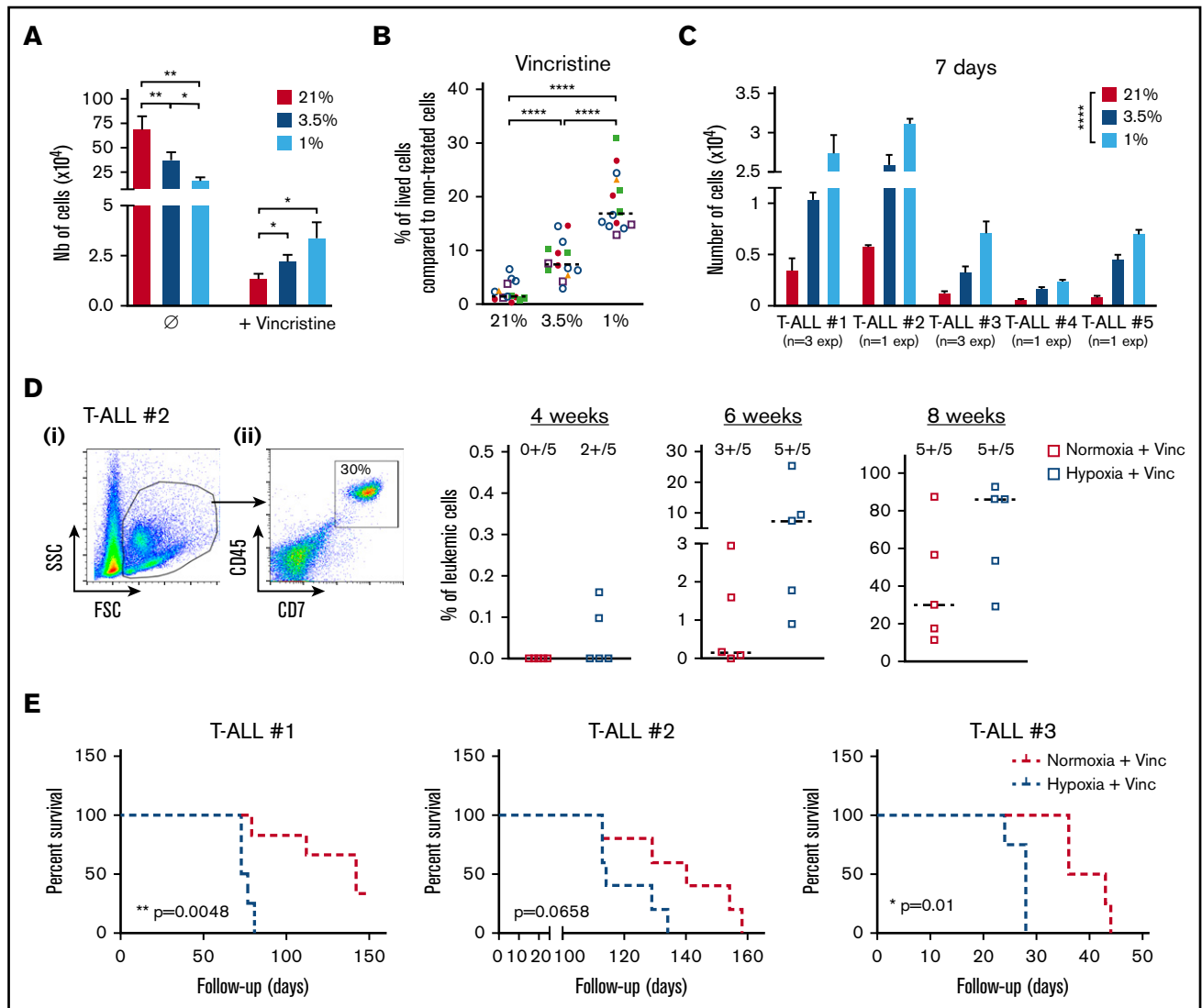
**Figure 2. Hypoxia impacts T-ALL cell regrowth activity in vitro and in vivo.** (A-B) Growth of T-ALL after hypoxia cultures have been stopped. (A) Leukemic cell numbers of T-ALL precultured in low and high O<sub>2</sub> levels after replating 7 days at 21% of O<sub>2</sub> with MS5-DL1 stromal cells. (B) Same except the secondary cultures were maintained for 28 days. Every experiment was done in triplicate. Shown are mean  $\pm$  SEM of cultures with each T-ALL. (C) Engraftment levels of T-ALL after cultures in low and high O<sub>2</sub> levels. (i) Representative flow cytometry analysis 8 weeks after transplantation of mouse #1 BM injected with T-ALL #2 precultured in normoxia. (ii) Kinetic of leukemia development in BM after transplantation of 500 cells of T-ALL #2 precultured in normoxia or hypoxia. Shown are percent of leukemic (human CD45<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>) cells. (D) Survival curves of mice transplanted with 500 leukemic cells isolated from cultures in normoxia or in hypoxia (4-5 mice per condition). Statistics were determined with the Friedman test and the log-rank (Mantel-Cox) test for mice survival: \*\**P* < .01, \*\*\**P* < .001.

further pointing out the importance of HIF-1 $\alpha$  levels for T-ALL chemoresistance in vivo.

### Hypoxia, mTORC1 activation, and chemoresistance

In response to hypoxia, cells rapidly activate a variety of adaptive mechanisms that limit energy expenditure through the inhibition of energy-intensive processes including protein translation.<sup>37</sup> Hence, a major mechanism implicates that mTOR activity is inhibited on hypoxia exposure.<sup>22</sup> In accordance, activation of the mTOR pathway was decreased in T-ALL cells in hypoxia, with a significantly lower phosphorylation of mTOR and of 2 targets of mTORC1: 4EBP1 and S6R (Figure 6A-B). Interestingly, treating T-ALL with rapamycin (Rapa), an inhibitor of the mTORC1 protein kinase, mimicked the effects of hypoxia. Indeed, Rapa inhibited in vitro

leukemic cell growth in normoxia (Figure 6C) by blocking cells in G0 and decreasing G1/S/G2-M progression (Figure 6D). Also, T-ALL blasts pretreated for 45 minutes with Rapa before an additional 3 days of anticancer drug treatment displayed a lower sensitivity to vincristine, cytarabine, or dexamethasone in normoxia (Figure 6E; supplemental Figure 4). Furthermore, only cells pretreated with Rapa could grow back in culture after they had undergone drug treatment (Figure 6F), comparably to what was observed with hypoxic drug-treated cells (Figure 3C). These observations support a cytostatic yet tumor-protective role of Rapa, as previously discussed.<sup>38</sup> Interestingly, the decrease of hypoxia-induced mTOR phosphorylation was abolished in HIF-1 $\alpha$  KD T-ALL cells (Figure 6G), indicating that HIF-1 $\alpha$  contributes to the inhibition of the mTORC1 pathway in hypoxia in T-ALL. In accordance, the



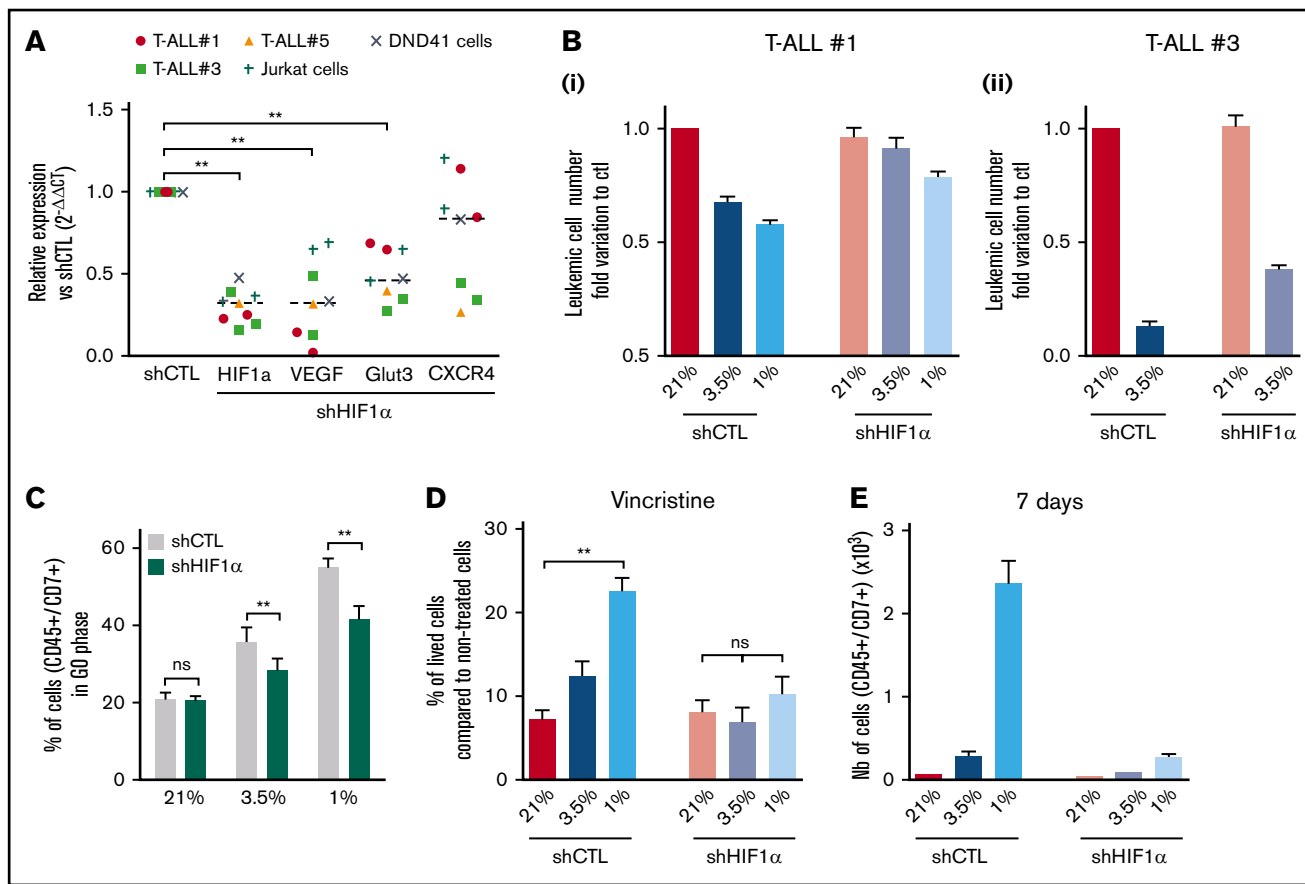
**Figure 3. Hypoxia enhances T-ALL chemoresistance.** (A-B) Effect of vincristine on T-ALL resistance in high and low  $O_2$ . (A) Numbers of live cells recovered after treatment during 72 hours with 10 nM (+vincristine) or without ( $\emptyset$ ) vincristine. Mean  $\pm$  SEM of triplicate cultures are represented. Shown are mean  $\pm$  SEM of cultures with T-ALL #1, T-ALL #2, T-ALL #3, T-ALL #4, and T-ALL #5,  $n = 9$  experiments. (B) Same result is presented in percentage of live cells after treatment (+vincristine in panel A) compared with nontreated ( $\emptyset$  in panel A) cells. Every experiment was done in triplicate. Every dot is the mean of those triplicates with T-ALL #1,  $n = 3$ exp; T-ALL #2,  $n = 5$ exp; T-ALL #3,  $n = 3$ exp; T-ALL #4,  $n = 2$ exp; and T-ALL #5,  $n = 1$ exp. (C) Leukemic cell production after 7 days in normoxia without treatment, following T-ALL treatment with vincristine in normoxia or hypoxia. Every experiment was done in triplicate. Shown are mean  $\pm$  SEM of cultures with each T-ALL. (D) Propagating activity of T-ALL treated ex vivo with vincristine in high or low  $O_2$  levels. Shown is a kinetic analysis (4, 6, and 8 weeks) of leukemia development in BM after transplantation of 500 leukemic cells of T-ALL #2 recovered from normoxic or hypoxic culture with vincristine treatment, represented in percent of leukemic cells. (i) Representative mouse. (ii) Analysis of 5 mice/group from T-ALL #2. (E) Survival of mice transplanted with 500 cells precultured in normoxia or in hypoxia with vincristine (+Vinc). T-ALL #1, T-ALL #2, and T-ALL #3, 4-5 mice per condition. Statistics were determined using the Friedman test and the log-rank (Mantel-Cox) test for mice survival: \* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ . exp, experiment.

expression levels of *REDD1/RTP801*, known as an inhibitor of mTORC1 that is induced by HIF1 $\alpha$  in hypoxia,<sup>39</sup> were upregulated in hypoxic T-ALL and downregulated in HIF-1 $\alpha$ -silenced T-ALL (supplemental Figure 6A-B). We also observed increased cell recovery when Rapa was added to shHIF-1 $\alpha$  T-ALL cells treated with vincristine in hypoxia compared with the same cells cultured in the absence of Rapa (Figure 6H; supplemental Figure 6C). Moreover, only Rapa-treated shHIF-1 $\alpha$  leukemic cells in hypoxia recovered high growth rates when vincristine was washed away (Figure 6I). Altogether, these results reveal that mTOR and HIF-1 $\alpha$

pathways interact and participate in hypoxia-mediated drug resistance in T-ALL.

## Discussion

Resistance to chemotherapy plays a crucial role in relapse of childhood ALL<sup>40</sup> but the molecular mechanisms responsible for this resistance are poorly understood. In this work, we showed that hypoxia participates in T-ALL chemoresistance. In solid cancers, it is well established that uncontrolled proliferation leads to profound



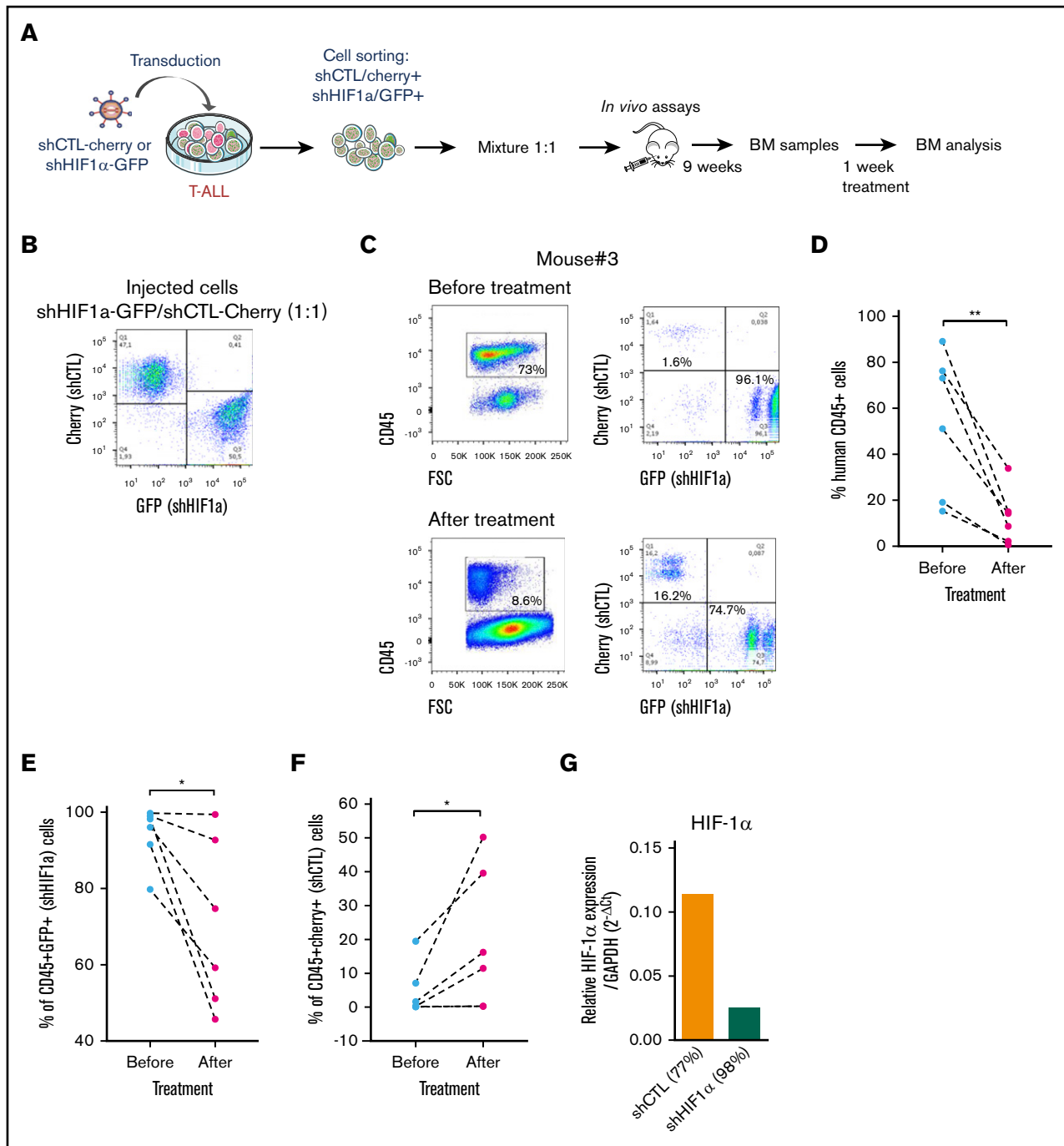
**Figure 4. Implication of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-related T-ALL chemoresistance.** (A) Relative mRNA expression of HIF-1 $\alpha$ , Glut3, VEGF, and CXCR4 genes in shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL reported to levels measured in shCTL/T-ALL controls. Every dot represents gene levels of 1 experiment compared with  $\beta$ 2m reporter gene levels. Tested on T-ALL #1, T-ALL #3, T-ALL #5, Jurkat, and DND41 cell lines. Shown are results of a total of 8 experiments. (B) Number of shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells after 4 days of coculture with MS5-DL1 stromal cells in normoxia or in hypoxia. Data are expressed as fold variation compared with control (shCTL 21%). Tested in triplicate in every experiment. T-ALL #1,  $n = 6$ exp (i); and T-ALL #3,  $n = 2$ exp (ii). (C) Decreased HIF-1 $\alpha$  modifies T-ALL cycling in hypoxia. Shown is the proportion of shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells in G0 phase in normoxia or in hypoxia. Shown are mean  $\pm$  SEM of cultures with T-ALL #1 and T-ALL #3,  $n = 4$ exp. (D) Decreased HIF-1 $\alpha$  increases chemosensitivity of T-ALL in hypoxia. Shown are the percentages of lived shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells recovered after treatment during 72 hours with vincristine compared with nontreated cells. Every experiment was done in triplicate. Shown are mean  $\pm$  SEM of cultures with T-ALL #1 and T-ALL #3,  $n = 8$ exp. (E) Leukemic cell production after 7 days in normoxia without treatment, following shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cell treatment with vincristine in normoxia or hypoxia. Shown are mean  $\pm$  SEM of technical triplicates of 1 experiment on T-ALL #1. (F) Survival of mice transplanted with 1000 shCTL/T-ALL or shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells isolated after cultures in normoxia or in hypoxia in presence of 10 nM vincristine. T-ALL #1, 5 mice per condition. Statistics were determined using the Wilcoxon test (A, C) or Friedman test (D-E) and the log-rank (Mantel-Cox) test for mice survival: \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ . exp, experiment.

local hypoxia, associated with tumor development, metabolic changes, metastatic spread, modulation of immune response, and increased mortality.<sup>41-43</sup> As in solid tumors, decreased oxygen tensions have also been observed during leukemic progression in bone marrow.<sup>43</sup> The aim of this work was to investigate to which extent hypoxia impacts T-ALL growth/propagation and what molecular cross talks are implicated.

We first demonstrated that short- (7 days) and long- (21 days) term hypoxia exposure induced limited growth and enhanced apoptosis and metabolic rewiring in T-ALL. In contrast with B-cell acute lymphoblastic leukemia,<sup>44</sup> we did not observe differential response depending on the duration of hypoxia exposure with different human T-ALL samples. T-ALL exposure to short-term and long-term hypoxia led to cell growth arrest, but recovered leukemic cells retained the ability to proliferate when moved in higher O<sub>2</sub>

conditions. These effects were not mediated by an indirect effect of hypoxia on feeder stromal cells that was described in studies in which the stromal cells promoted the maintenance of hematopoietic stem cells.<sup>45</sup> In our experiments, leukemia samples that are able to proliferate for several weeks without stromal cells were similarly impacted by hypoxia whether they had stromal support or not, indicating direct effect of hypoxia on leukemic cells growth. Of note, measuring interleukin-7 and CXCL12 transcript levels in MS5 cells in normoxia and hypoxia revealed enhanced ( $\times 1.8$ ) expression of CXCL12 but not of interleukin-7 at 1% O<sub>2</sub> (data not shown), indicating that low O<sub>2</sub> may nevertheless impact stromal cell cytokine release with potential effects on leukemic cells. Future work is necessary to further study these aspects.

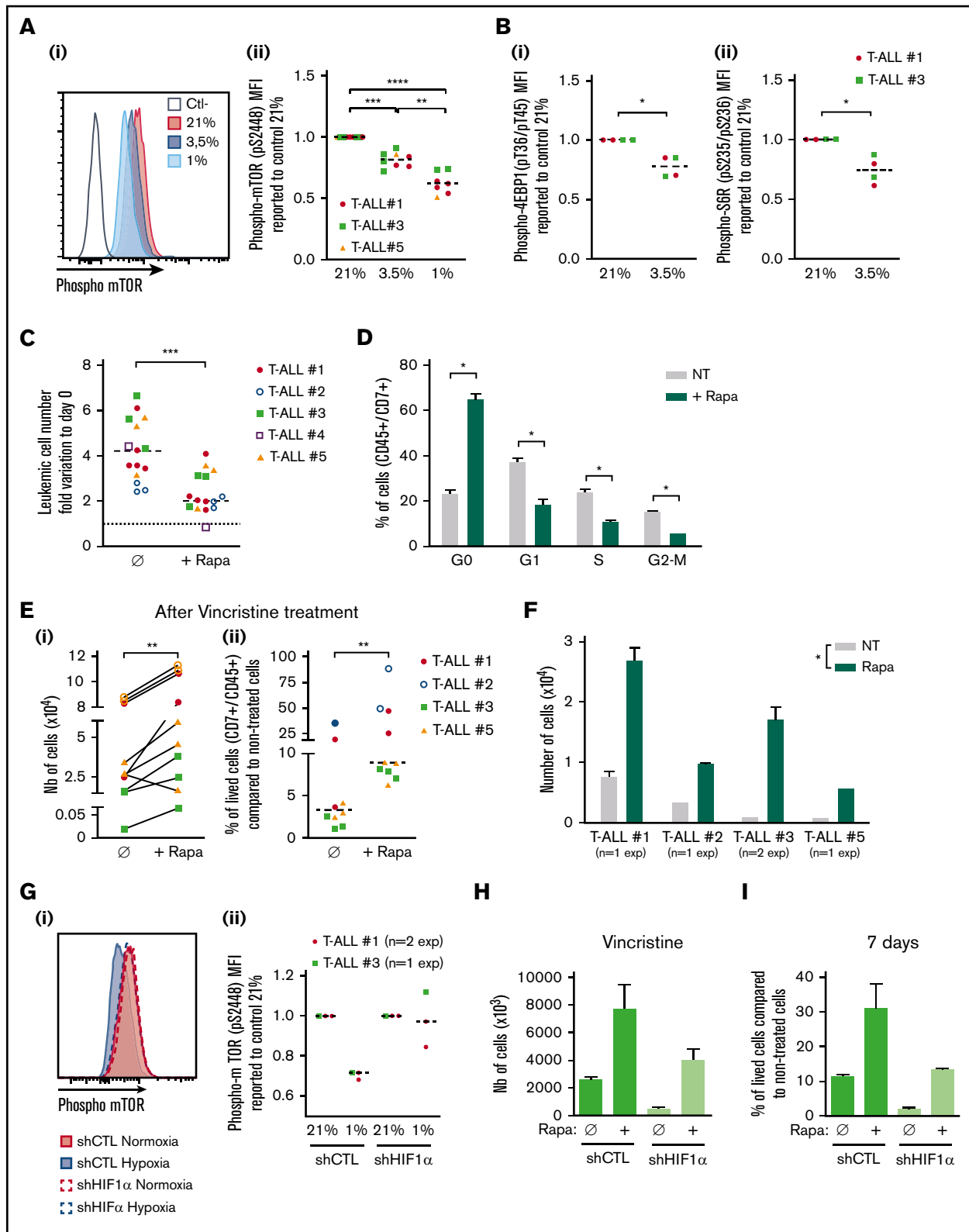
A previous study has shown that leukemia stem cells (LSCs) from T-ALL reside in hypoxic niches of the BM.<sup>46</sup> Interestingly,



**Figure 5. Role of HIF-1 $\alpha$  in the development and sensitivity of T-ALL in vivo.** (A) Protocol of the experimental settings. T-ALL#1 was transduced with shCTL (Cherry<sup>+</sup>) or shHIF-1 $\alpha$  (GFP<sup>+</sup>) vectors. Sorted shHIF-1 $\alpha$  (GFP<sup>+</sup>) cells were mixed at a 1:1 ratio with sorted shCTL (Cherry<sup>+</sup>) cells. A total of 10000 mixed leukemic cells were transplanted into NSG recipients. (B) Plots of the flow cytometry analysis of the GFP<sup>+</sup>/Cherry<sup>+</sup> cell mixture before mice injection. (C) The NSG mouse recipients were monitored for T-ALL development by BM cell samplings 9 weeks after transplantation. Shown are representative plots from mouse #3. GFP<sup>+</sup>/Cherry<sup>+</sup> percentage are given relative to gated human CD45<sup>+</sup> T-ALL cells before and after chemotherapeutic treatments. (D) Efficacy of chemotherapy in 6 mice measured before and after 1 week of drug treatment. The percentage of human CD45<sup>+</sup> leukemic cells in the BM is shown for each mouse. (E) Percentage of shHIF-1 $\alpha$ /GFP<sup>+</sup> cells and (F) of shCTL/Cherry<sup>+</sup> cells in human CD45<sup>+</sup> leukemic cells before and after treatment of mice. (G) HIF1 $\alpha$  expression in T-ALL#1 after transplantation in immune-deficient mice. Shown are results from the BM of 2 mice. BM cells were recovered after 1 week of chemotherapy treatment. Statistics were determined using the Wilcoxon test: \* $P < .05$ .

such LSCs were shown to be dependent on a molecular loop implicating HIF-1 $\alpha$  and WNT/ $\beta$ -catenin both being activated in hypoxia. In consequence, interfering with HIF-1 $\alpha$  or  $\beta$ -catenin

expression/activity reduced the T-ALL LSC frequency.<sup>46</sup> In accordance with these results, when T-ALL were cultured in hypoxia (eg, in HIF-1 $\alpha$  stabilization conditions before transplantation



**Figure 6. Relationship between hypoxia, HIF-1 $\alpha$  expression, mTOR activation, and chemoresistance in T-ALL.** (A) Phosphorylation of mTOR (pS2448) and (B) 4EBP1 and S6R. Shown are representative histograms (i) and MFI ratio obtained with leukemic cells harvested from hypoxia compared with normoxia cultures (Aii,Bi,Bii). Every dot is the mean of technical triplicates. In panel A, T-ALL #1, n = 4exp; T-ALL #3, n = 4exp; and T-ALL #5, n = 1exp. In panel B, T-ALL #1, n = 2exp; T-ALL #3, n = 1exp. (C) Effect of rapamycin (Rapa) on T-ALL growth in normoxia. Absolute leukemic cell number recovered from every culture condition. The data are expressed as fold variation between the number of cells recovered after 4 days of coculture in presence or absence of rapamycin compared with cells plated at day 0. Every dot is the mean of technical



in NSG mice), we observed that leukemic samples had at least conserved LSC activity even when their *ex vivo* growth and metabolic activities were severely modified. Better preservation and increased chemoresistance of leukemia-initiating cells under hypoxia could partly explain the results of a recent study showing the increased capacity of T-ALL cell lines treated with dexamethasone in hypoxia to generate T-ALL with a resistant phenotype to glucocorticoids.<sup>47</sup> Increased dormancy of T-ALL would allow a thinner selection of drug-resistant cells. We have previously observed a similar dormancy status of leukemic cells harvested from adipocyte-enriched BM compared with hematopoietic-enriched BM, indicating that such BM niches are chemoresistant niches.<sup>48</sup> However we were unable to demonstrate increased hypoxia in adipocyte-enriched BM. Expression analyses did not reveal any enrichment of hypoxia signature in T-ALL cells from adipocyte-rich vs -poor BM.

Besides specific interactions in BM niches, T-ALL cells endure variably severe hypoxic levels regarding their precise location. We observed significant effects of hypoxia on chemoresistance from the concentration of 3.5% O<sub>2</sub>, which is in the upper range of the O<sub>2</sub> concentration gradient in the BM.<sup>49</sup> Thus, our observations agree with the findings of the Lo Celso team, who shows that T-ALL infiltrates the BM and survives chemotherapy independently of stable interactions with specific microenvironments.<sup>15</sup> In fact the hypoxia found in the BM may favor the blast attraction, because HIFs orchestrate the expression of a panel of factors, such as CXCR4 and GLUT1, that participate in T-ALL spreading/growth/survival.<sup>50,51</sup>

In the present study, we brought to light the effect of hypoxia and its potential impact on T-ALL chemoresistance, especially regarding HIF-1 $\alpha$  expression pattern, supporting the observation of increased number of LSCs in hypoxic niches.<sup>46</sup> We indeed show that HIF-1 $\alpha$  slows down T-ALL growth through increased quiescence of leukemic cells, inducing drug resistance. In fact, HIF-1 $\alpha$  is overexpressed in many tumors, including some hematologic malignancies.<sup>52</sup> HIF-1 $\alpha$  can thus be overexpressed in some T-ALL as a consequence of disabling mutations of Von Hippel-Lindau,<sup>53</sup> and HIF-1 $\alpha$  inhibitors may improve therapeutics in many hemopathies without impacting the self-renewal and differentiation of normal HSCs.<sup>54,55</sup> Similarly, in acute promyelocytic leukemia, HIF-1 $\alpha$  antagonistic RNAs have antileukemic activity and extend survival of mice. HIF-1 $\alpha$  antagonistic RNAs in association with all-trans-retinoic acid (ATRA) eradicate leukemia, without affecting normal HSCs.<sup>56</sup> In our study, HIF-1 $\alpha$  silencing promoted T-ALL proliferation in hypoxia, enhancing their sensitivity to vincristine

commonly used for T-ALL treatment. Furthermore, T-ALL cells with low HIF-1 $\alpha$  expression outcompeted T-ALL cells with normal HIF-1 $\alpha$  levels *in vivo*, indicating that HIF-1 $\alpha$  is a brake for leukemia growth in mice. This might be particularly true in the first period of T-ALL infiltration, because their expansion is very slow, as elegantly previously shown in a very aggressive model of mixed-lineage leukemia–eleven-nineteen leukemia mouse B-cell acute lymphoblastic leukemia using intravital microscopy.<sup>57</sup> On the other hand, silencing HIF-1 $\alpha$  increased chemosensitivity, pointing to HIF-1 $\alpha$  as an interesting therapeutic target.

Here, we also describe that the mTORC1 pathway participates in T-ALL chemoresistance in relation with HIF-1 $\alpha$ . mTORC1 is a central regulator of cell metabolism because it promotes the synthesis of proteins, lipids, and nucleotides, as well as induces a glycolytic phenotype.<sup>58</sup> Because glycolysis is the only reliable source of ATP under the fluctuating O<sub>2</sub> pressures detected in the BM,<sup>59</sup> mTORC1 was expected to interact with HIF-1 $\alpha$  in T-ALL. Accordingly, we observed that activation of mTOR is diminished in T-ALL under hypoxia. Also, REDD1/RTP801, a target gene of HIF-1 $\alpha$  that inhibits mTORC1 activation in hypoxia,<sup>39</sup> was found to be sensitive to O<sub>2</sub> pressures and to HIF-1 $\alpha$  expression in T-ALL. However, we were not able to functionally implicate REDD1 in the hypoxia/mTOR-mediated chemoresistance loop as gain and loss of REDD1 function in T-ALL unexpectedly revealed a positive rather than negative action on leukemic growth (L.F. and B.U., unpublished data, 17 January 2017). REDD1 has paradoxical roles in carcinogenesis depending on the cellular context, acting as an oncogene or as a tumor suppressor gene.<sup>60-62</sup> Addressing REDD1 function in T-ALL will thus require additional work.

Interestingly, Rapa, a well-known inhibitor of mTORC1, mimicked the effects of hypoxia in normoxic T-ALL, including slow cell cycle progression and chemoresistance (ie, enhanced cell recovery after the cessation of drug treatment). These results outline potential adverse effects of using mTORC1 inhibitors in T-ALL treatment,<sup>63</sup> as also discussed previously.<sup>38</sup> In the past years, several PI3K/Akt/mTOR signaling pathway targeting small molecules have been developed, showing potential therapeutic efficacy in hematologic malignancies, alone or in combination with chemotherapeutic drugs.<sup>64</sup> However, the effects of mTOR inhibitors may vary depending on the pathology, and their use might worsen the development of certain leukemias. For instance, in mixed-lineage leukemia–driven leukemia, hyperactivation of mTOR pathway causes LSCs to enter the cell cycle, compromising their stability and reducing their capacity to generate leukemia.<sup>65</sup> Following this idea, use of mTOR inhibitors may therefore promote cell

**Figure 6. (continued)** triplicates. T-ALL #1, n = 5exp; T-ALL #2, n = 3exp; T-ALL #3, n = 3exp; T-ALL #4, n = 1exp; and T-ALL #5, n = 3exp. (D) Rapamycin decreases T-ALL cell cycle progression. Shown are proportions of leukemic cells in G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, and G<sub>2</sub>/M phases, during culture at 21% of O<sub>2</sub> in presence or absence of rapamycin. Shown are mean  $\pm$  SEM of triplicate cultures performed with T-ALL #1, T-ALL #2, and T-ALL #4, n = 6exp. (Ei) Rapamycin protects T-ALL from vincristine in normoxia. Shown are the absolute numbers of cells recovered after vincristine treatment in normoxia in presence or absence of rapamycin. (Eii) Same results are presented as percentage of live cells after vincristine treatment in presence (+Rapa) or in absence ( $\emptyset$ ) of rapamycin compared with nontreated cells. Every dot is the mean of technical triplicates from T-ALL #1, n = 2exp; T-ALL #2, n = 2exp; T-ALL #3, n = 3exp; and T-ALL #5, n = 3exp. (F) Leukemic cell number recovered 7 days after replating T-ALL pretreated with vincristine  $\pm$  rapamycin. Shown are mean  $\pm$  SEM of technical triplicate cultures. (G) HIF-1 $\alpha$  impacts on mTOR phosphorylation in low and high O<sub>2</sub> concentration. (i) Phosphorylation of mTOR (pS2448) in a representative experiment with T-ALL #1. (ii) Ratio of MFI from shCTL/T-ALL or shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells cultured in hypoxia compared with those cultured in normoxia. Every dot is the mean of technical triplicates obtained with T-ALL #1, n = 2exp; and T-ALL #3, n = 1exp. Statistics were determined using the Friedman test (A), Wilcoxon test (B-E,G), or Mann-Whitney test (F): \**P* < .05, \*\**P* < .01, or \*\*\**P* < .001. (H) Percentages of live shCTL/T-ALL and shHIF-1 $\alpha$ /T-ALL cells recovered after treatment during 72 hours in hypoxia with vincristine in presence (+Rapa) or in absence ( $\emptyset$ ) of rapamycin compared with nontreated cells. (I) Leukemic cell production after 7 days in normoxia without treatment after T-ALL. exp, experiment.

quiescence and thereby favor chemoresistance and relapse. Although the therapeutic advantages of using inhibitors of the PI3K/mTOR pathway to overcome steroid resistance in T-ALL are important, these conclusions were drawn from results obtained with cell lines and remain to be confirmed with T-ALL primary cells.<sup>66-68</sup> In fact, our experiments that were done with patient cells show that inhibition of mTOR in T-ALL slows down T-ALL propagation, which confers obvious interesting short-term anti-leukemic effects. However, Rapa mimics some biological effects of hypoxia, and it also induces a significant proportion of leukemic cells to escape drug treatment. Hence, the use of mTORC1 inhibitors for T-ALL patient treatment may have long-term adverse effects, with a potentially increased risk of relapse from quiescent chemoresistant leukemic cells.

## Acknowledgments

Mouse work was facilitated by Silvia Vincent-Naulleau, Julien Tilliet, and Caroline Devanand from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (IRCM/CEA) animal facility. The authors thank Julien Rucci for technical help during experiments, and Camille Gobeaux from Service de Diagnostic Biologique Automatisé (Hôpital Cochin) for lactate measurement. The lentivectors were produced by Guillaume Piton and Didier Busso from the CiGex Platform, cell sorting was performed by Nathalie Deschamps at the Flow Cytometry platform, and immunofluorescence was done at the Microscopy platform with help from Lamy Ibrahim (all from the Institute of Cellular and Molecular Radiobiology, Fontenay-aux-Roses, France). Raul Duran from Cabimer (Seville, Spain) and

Paul-Henri Roméo, from IRCM (Fontenay-aux-Roses, France) provided a critical review of the manuscript.

This work was supported by INSERM, CEA, Université de Paris, Université Paris Saclay, the Association Laurette Fugain, and Fondation ARC (Équipe Labellisée). L.F. was funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC). The laboratory for this work received the LNCC label.

## Authorship

Contribution: L.F. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript; L.F., J.C., S.C., L.R., C.L.M., and B.U. performed experiments; I.N. supervised the molecular experimental design; J.C., C.L.M., S.P., I.N., R.H., M.-L.A., and F.M. gave valuable advice during experiments and during the writing of the manuscript; T.L., A.P., A.B., and P.B. provided patient samples and clinical data; F.P. and B.U. coordinated and supervised the study and wrote the paper; and all authors reviewed the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: 0000-0003-1316-4306 J.C.A.P., 0000-0001-8363-1622; A.B., 0000-0003-0120-6089; I.N., 0000-0001-9566-6152; M.-L.A., 0000-0002-1726-1472; F.M., 0000-0002-6984-70960000-0001-8995-596XF.P.B.U., 0000-0001-6323-5737.

Correspondence: Benjamin Uzan, Laboratoire des Cellules Souches Hématopoïétiques et Leucémiques, UMR 1274, IRCM, CEA, 18 Route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France; e-mail: benjamin.uzan@cea.fr.

## References

1. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004;432(7015):307-315.
2. Taylor ST, Hickman JA, Dive C. Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of Bcl-X(L) and Bax by tumor microenvironmental factors. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(1):18-23.
3. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(9):611-622.
4. Jin L, Tabe Y, Konoplev S, et al. CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(1):48-58.
5. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-1043.
6. Marks DI, Paietta EM, Moorman AV, et al. T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood*. 2009;114(25):5136-5145.
7. Ceppi F, Cazzaniga G, Colombini A, Biondi A, Conter V. Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: prediction and prevention. *Expert Rev Hematol*. 2015;8(1):57-70.
8. Bhattacharya B, Mohd Omar MF, Soong R. The Warburg effect and drug resistance. *Br J Pharmacol*. 2016;173(6):970-979.
9. Kees UR, Ford J, Watson M, et al. Gene expression profiles in a panel of childhood leukemia cell lines mirror critical features of the disease. *Mol Cancer Ther*. 2003;2(7):671-677.
10. Wunderle L, Badura S, Lang F, et al. Safety and efficacy of BEZ235, a dual PI3-Kinase /mTOR inhibitor, in adult patients with relapsed or refractory acute leukemia: results of a phase I study. *Blood*. 2013;122(21):2675.
11. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008;322(5909):1861-1865.
12. Duan C-W, Shi J, Chen J, et al. Leukemia propagating cells rebuild an evolving niche in response to therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(6):778-793.
13. Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, et al. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*. 2013;13(3):285-299.
14. Weisberg E, Azab AK, Manley PW, et al. Inhibition of CXCR4 in CML cells disrupts their interaction with the bone marrow microenvironment and sensitizes them to nilotinib. *Leukemia*. 2012;26(5):985-990.



15. Hawkins ED, Duarte D, Akinduro O, et al. T-cell acute leukaemia exhibits dynamic interactions with bone marrow microenvironments. *Nature*. 2016; 538(7626):518-522.
16. Vukovic M, Sepulveda C, Subramani C, et al. Adult hematopoietic stem cells lacking Hif-1 $\alpha$  self-renew normally. *Blood*. 2016;127(23):2841-2846.
17. Vukovic M, Guitart AV, Sepulveda C, et al. Hif-1 $\alpha$  and Hif-2 $\alpha$  synergize to suppress AML development but are dispensable for disease maintenance. *J Exp Med*. 2015;212(13):2223-2234.
18. Guitart AV, Subramani C, Armesilla-Diaz A, et al. Hif-2 $\alpha$  is not essential for cell-autonomous hematopoietic stem cell maintenance. *Blood*. 2013;122(10):1741-1745.
19. Forristal CE, Winkler IG, Nowlan B, Barbier V, Walkinshaw G, Levesque JP. Pharmacologic stabilization of HIF-1 $\alpha$  increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood*. 2013;121(5):759-769.
20. Rouault-Pierre K, Lopez-Onieva L, Foster K, et al. HIF-2 $\alpha$  protects human hematopoietic stem/progenitors and acute myeloid leukemic cells from apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cell Stem Cell*. 2013;13(5):549-563.
21. Schepers K, Campbell TB, Passequé E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):254-267.
22. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721-732.
23. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148(3):399-408.
24. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010;29(5):625-634.
25. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(6):437-447.
26. Poglio S, Cahu X, Uzan B, et al. Rapid childhood T-ALL growth in xenograft models correlates with mature phenotype and NF- $\kappa$ B pathway activation but not with poor prognosis. *Leukemia*. 2015;29(4):977-980.
27. Sirven A, Ravet E, Charneau P, et al. Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther*. 2001;3(4):438-448.
28. Gerby B, Armstrong F, de la Grange PB, et al. Optimized gene transfer into human primary leukemic T cell with NOD-SCID/leukemia-initiating cell activity. *Leukemia*. 2010;24(3):646-649.
29. Lazrak M, Deleuze V, Noel D, et al. The bHLH TAL-1/SCL regulates endothelial cell migration and morphogenesis. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 7):1161-1171.
30. Armstrong F, Brunet de la Grange P, Gerby B, et al. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood*. 2009;113(8):1730-1740.
31. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(14):4587-4602.
32. Simpson IA, Dwyer D, Malide D, Moley KH, Travis A, Vannucci SJ. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(2):E242-E253.
33. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*. 2003;198(9):1391-1402.
34. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011;12(1):9-22.
35. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(2):225-239.
36. Samuels AL, Beesley AH, Yadav BD, et al. A pre-clinical model of resistance to induction therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4(8):e232.
37. Masoud GN, Li W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):378-389.
38. Villar VH, Nguyen TL, Terés S, Bodineau C, Durán RV. Escaping mTOR inhibition for cancer therapy: Tumor suppressor functions of mTOR. *Mol Cell Oncol*. 2017;4(3):e1297284.
39. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*. 2004;18(23):2893-2904.
40. Klumper E, Pieters R, Veerman AJ, et al. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995; 86(10):3861-3868.
41. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423-1437.
42. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3664-3671.
43. Jensen PO, Mortensen BT, Hodgkiss RJ, et al. Increased cellular hypoxia and reduced proliferation of both normal and leukaemic cells during progression of acute myeloid leukaemia in rats. *Cell Prolif*. 2000;33(6):381-395.
44. Silveira VS, Freire BMR, Borges KS, et al. Hypoxia-related gene expression profile in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(8):1751-1757.
45. Hammoud M, Vlaski M, Duchez P, et al. Combination of low O(2) concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*. 2012;227(6):2750-2758.
46. Giambra V, Jenkins CE, Lam SH, et al. Leukemia stem cells in T-ALL require active Hif1 $\alpha$  and Wnt signaling. *Blood*. 2015;125(25):3917-3927.
47. Gu L, Zhang G, Zhang Y. A novel method to establish glucocorticoid resistant acute lymphoblastic leukemia cell lines. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019; 38(1):269.

48. Cahu X, Calvo J, Poglio S, et al. Bone marrow sites differently imprint dormancy and chemoresistance to T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv*. 2017;1(20):1760-1772.
49. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*. 2014;508(7495):269-273.
50. Pitt LA, Tikhonova AN, Hu H, et al. CXCL12-producing vascular endothelial niches control acute T cell leukemia maintenance. *Cancer Cell*. 2015;27(6):755-768.
51. Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C, et al. cxcr4 is required for leukemia-initiating cell activity in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2015;27(6):769-779.
52. Colla S, Storti P, Donofrio G, et al. Low bone marrow oxygen tension and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  overexpression characterize patients with multiple myeloma: role on the transcriptional and proangiogenic profiles of CD138(+) cells. *Leukemia*. 2010;24(11):1967-1970.
53. Klijn C, Durinck S, Stawiski EW, et al. A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nat Biotechnol*. 2015;33(3):306-312.
54. Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P, Liu Y. Targeting HIF1 $\alpha$  eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4):399-411.
55. Wang Y, Liu Y, Tang F, et al. Echinomycin protects mice against relapsed acute myeloid leukemia without adverse effect on hematopoietic stem cells. *Blood*. 2014;124(7):1127-1135.
56. Coltella N, Valsecchi R, Ponente M, Ponzoni M, Bernardi R. Synergistic leukemia eradication by combined treatment with retinoic acid and HIF inhibition by EZN-2208 (PEG-SN38) in preclinical models of PML-RAR $\alpha$  and PLZF-RAR $\alpha$ -driven leukemia. *Clin Cancer Res*. 2015;21(16):3685-3694.
57. Jaracz-Ros A, Lewandowski D, Barroca V, Lavau C, Roméo P-H. MLL-ENL leukemia burden initiated in femoral diaphysis and preceded by mature B-cell depletion. *Haematologica*. 2011;96(12):1770-1778.
58. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*. 2017;169(2):361-371.
59. Schito L, Rey S, Konopleva M. Integration of hypoxic HIF- $\alpha$  signaling in blood cancers. *Oncogene*. 2017;36(38):5331-5340.
60. Horak P, Crawford AR, Vadysirisack DD, et al. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(10):4675-4680.
61. Kucejova B, Peña-Llopis S, Yamasaki T, et al. Interplay between pVHL and mTORC1 pathways in clear-cell renal cell carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2011;9(9):1255-1265.
62. Tirado-Hurtado I, Fajardo W, Pinto JA. DNA damage inducible transcript 4 gene: the switch of the metabolism as potential target in cancer. *Front Oncol*. 2018;8:106.
63. Bongiovanni D, Saccomani V, Piovani E. Aberrant signaling pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):E1904.
64. Hoshii T, Tadokoro Y, Naka K, et al. mTORC1 is essential for leukemia propagation but not stem cell self-renewal. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2114-2129.
65. Fang Y, Yang Y, Hua C, et al. Rictor has a pivotal role in maintaining quiescence as well as stemness of leukemia stem cells in MLL-driven leukemia. *Leukemia*. 2017;31(2):414-422.
66. Li Y, Buijs-Gladdines JGCAM, Canté-Barrett K, et al. IL-7 receptor mutations and steroid resistance in pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia: a genome sequencing study. *PLoS Med*. 2016;13(12):e1002200.
67. Hall CP, Reynolds CP, Kang MH. Modulation of glucocorticoid resistance in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia by increasing BIM expression with the PI3K/mTOR inhibitor BEZ235. *Clin Cancer Res*. 2016;22(3):621-632.
68. Silveira AB, Laranjeira ABA, Rodrigues GOL, et al. PI3K inhibition synergizes with glucocorticoids but antagonizes with methotrexate in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(15):13105-13118.

## Role of inflammatory microenvironment in T cell Acute Lymphoblastic Leukemia

**Background :** T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a malignant hematological disorder characterized by an increased proliferation and incomplete maturation of T lymphocyte precursors. The T-ALL diversity driven by multiple oncogenic events causes a variability in the response to drugs targeting the tumor cells. Despite our knowledge of these cell-intrinsic alterations, successful alternative therapeutic approaches have yet to be developed to improve patient outcome, supporting the importance of further understand the interaction between T-ALL and their microenvironment. Cellular and molecular actors in the microenvironment have been identified to impact several types of leukemia (B-ALL, B-CLL, AML and ATL). Recently, the supportive role of myeloid cells has been described in T-ALL. Moreover, interaction between receptors and ligands such as DL1, IL-18, IL-7, IGF1 and CXCL12 sustain proliferation, survival or initiation of T-ALL. Together, these results point microenvironment factors as major regulators of T-ALL.

**Aims :** Following previous work, we investigate whether and how an inflammatory microenvironment can support T-ALL to uncover new cellular or molecular mechanisms involved in T-ALL to unveil new potential therapeutic approaches.

**Methods :** We used mouse T-ALL cells with a constitutive activation of *Notch1* (ICN1). Additional T-ALL cells were isolated from mice with constitutive expression of TAL1 and LMO1 oncogenes. T-ALL cells were injected intravenously into immunocompetent syngeneic mice to assess T-ALL progression, evolution of immune cell populations and secreted factors in the plasma. We used depleting antibody, and chemicals to suppress immune cells in vivo to identify their role. NECA, an agonist of adenosine receptors, was injected to control inflammatory molecules secretion in vivo.

**Results :** We show that T-ALL enhance myeloid cell levels, such as neutrophils and resident monocytes in the blood, accompanied with an acute secretion of inflammatory molecules in the plasma. Depleting neutrophils does not modulate plasmatic inflammatory molecule secretion and T-ALL progression. Besides, depleting phagocytes including resident monocytes decreases T-ALL evolution without impacting inflammatory molecule secretion or mice survival. However, the inhibition of inflammatory molecule secretion by the microenvironment using NECA diminishes T-ALL progression with an increased proportion of leukemic cells in the G0 cell cycle phase resulting in enhanced mouse survival. Transcriptional analysis of leukemic cells highlights a deregulation of inflammatory response after NECA treatment. Focusing on the most decreased molecule in the plasma of the T-ALL mice treated with NECA, we uncover Hepatocyte Growth Factor (HGF), a common regulator of proliferation and migration of tumor cells as a potential molecular actor in T-ALL.

**Conclusion :** Altogether, we show that targeting innate immune cells like neutrophils or resident monocytes independently in vivo is not sufficient to modify inflammatory molecule secretion and to impact T-ALL mice survival. On the other hand, inhibiting inflammatory molecule secretion drastically decreases T-ALL progression, identifying HGF as a putative driver of T-ALL, and a promising target for new treatments.

**Keywords :** T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia, Inflammatory microenvironment, Immune cells, Inflammatory molecules

## Rôle du microenvironnement inflammatoire dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T

Introduction : Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale de précurseurs hématopoïétiques lymphoïdes T bloqués dans leur maturation. Les LAL-T comportent une diversité intrinsèque caractérisée par de multiples d'évènements oncogéniques qui entraîne une variabilité de réponse aux traitements actuels. Les patients qui ne répondent pas aux chimiothérapies ou qui subissent une rechute, sont souvent de mauvais pronostics et il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi les pistes, le microenvironnement tumoral comprenant différents acteurs cellulaires et moléculaires représente une cible prometteuse car il est impliqué dans de nombreuses leucémies (LAL-B, LCL-B, LAM, LTA). En effet, le rôle de support des cellules myéloïdes dans les LAL-T a récemment été démontré ainsi que l'interaction entre les cellules de LAL-T et les ligands comme DL1, IL-18, IL-7, IGF-1 ou CXCL12 qui supportent la prolifération, la survie, ou l'initiation leucémique. En somme, ces résultats montrent que les acteurs du microenvironnement sont des régulateurs majeurs des LAL-T.

Objectifs : Identifier de nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires du microenvironnement inflammatoire impliqués dans les LAL-T afin de déceler de nouvelles pistes thérapeutiques.

Méthodes : Nous avons utilisé 2 modèles de LAL-T murines injectées en souris syngéniques immunocompétentes. La première comporte une activation constitutive de *Notch1* (ICN1) et la deuxième a été isolée de souris comportant 2 oncogènes *TAL1* et *LMO1*. La progression leucémique ainsi que l'évolution de cellules immunitaires et la sécrétion de molécules inflammatoires dans le plasma ont été suivies dans les souris receveuses. Des anticorps ou molécules ciblant les cellules immunitaires ont été injectées pour identifier leur rôle au cours de la LAL-T. Dans un second temps un agoniste des récepteurs à l'adénosine, le NECA a été injecté pour contrôler la sécrétion de molécules inflammatoires.

Résultats : Les LAL-T favorisent le recrutement de cellules immunitaires comme les neutrophiles et les monocytes résidents dans le sang, accompagné d'une augmentation de la sécrétion de molécules inflammatoires dans le plasma. La déplétion des neutrophiles *in vivo* ne modifie pas la progression leucémique et n'impacte pas la sécrétion de molécules inflammatoires. De plus, la déplétion des phagocytes incluant les monocytes résidents diminue le pourcentage de cellules leucémiques dans les organes sans améliorer la survie des souris ou sans impacter la sécrétion de molécules inflammatoires. Cependant, l'inhibition de la sécrétion de molécules par le NECA diminue la progression leucémique et induit une accumulation de cellules leucémique en phase G0 du cycle cellulaire, accompagnée d'une augmentation de la survie de souris. L'analyse transcriptomique de cellules leucémiques provenant de souris traitées par le NECA a montré une diminution de l'activation de voies associées à l'inflammation comparé aux cellules contrôles. En se concentrant sur les molécules les plus fortement diminuées par le traitement NECA, nous avons identifié l'HGF, un régulateur commun de la prolifération et la migration de cellules tumorales comme acteur moléculaire potentiel dans la LAL-T.

Conclusion : En résumé, nous avons montré que cibler les cellules immunitaires innées comme les neutrophiles ou les monocytes résidents *in vivo* n'est pas suffisant pour diminuer la sécrétion de molécules inflammatoires ou améliorer la survie des souris LAL-T. Cependant, inhiber la sécrétion de molécules inflammatoires diminue drastiquement la progression leucémique et améliore la survie, ce qui nous a permis d'identifier l'HGF comme un potentiel acteur moléculaire majeur dans la LAL-T et une cible prometteuse pour de nouveaux traitements.

Mots Clés : Leucémie Aigüe Lymphoblastique T, Microenvironnement inflammatoire, Cellules immunitaires, Molécules inflammatoires