

## **Table des matières**

<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>ix</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xiii</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1. L'Hématopoïèse .....	1
a) Définition.....	1
b) Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	2
c) Les marqueurs des cellules hématopoïétiques humaines .....	4
d) Régulation de l'hématopoïèse .....	5
2. Les leucémies aiguës .....	10
a) Leucémogénèse .....	10
b) Classification des leucémies.....	12
c) Incidence.....	16
3. Le gène MLL.....	18
a) Le gène MLL dans l'hématopoïèse .....	18
b) Les réarrangements chromosomiques impliquant MLL.....	22
4. Les leucémies MLL .....	25
a) Les gènes de fusion MLL dans les leucémies aiguës.....	25
b) L'origine prénatale des leucémies .....	28
5. Modèles <i>in vivo</i> de leucémies MLL .....	29
6. Le séquençage à haut débit.....	30
a) Principe.....	31
b) Son apport et ses limites .....	32
7. Objectifs du projet de recherche.....	34
<b>II. Matériel et méthodes.....</b>	<b>35</b>

1. Purification des cellules souches et progénitrices issues de sang de cordon par sélection positive .....	35
2. Production d'ADN.....	36
3. Production des rétrovirus et titration .....	36
4. Infections des cellules CD34+ purifiées par les rétrovirus.....	37
5. Le modèle murin xénogénique .....	38
a) Les souris NSG.....	38
b) Irradiation sublétales des souris et injection intra-fémorale .....	39
c) Analyses .....	39
6. Cytométrie en flux .....	40
7. Culture cellulaire .....	41
a) Culture cellulaire <i>in vitro</i> .....	41
b) Culture cellulaire <i>ex vivo</i> .....	41
<b>III. Résultats et discussion.....</b>	<b>43</b>
1. Capacité des différentes fusions MLL à induire le processus leucémogénique .....	43
a) Variation du taux de transfert de gène selon la fusion .....	43
b) Culture <i>in vitro</i> .....	44
c) Caractérisation des leucémies aiguës humaines générées <i>in vivo</i> .....	48
d) Culture <i>ex-vivo</i> .....	60
e) Discussion et perspectives.....	61
2. Leucémies myéloïdes MLL-AF9 : absence d'évènements secondaires et identification de biomarqueurs.....	66
a) Modèle de leucémies aiguës MLL-AF9 générées à partir de sang de cordon unique : caractéristiques et avantages.....	66
b) Leucémies MLL-AF9 : oncogène suffisant au développement de la maladie .....	68
c) Comparaison des différents tissus et identification de biomarqueurs .....	68
d) RET : gène candidat potentiel comme biomarqueur des leucémies myéloïdes aiguës MLL-AF9 .....	71
e) Discussion et perspectives.....	75
<b>V. Conclusion .....</b>	<b>79</b>
<b>Références .....</b>	<b>81</b>

## *Liste des tableaux*

Tableau 1 : Les partenaires de fusion de MLL : localisation et fonctions.....	26
Tableau 2 : Caractéristiques des différentes méthodes de séquençage .....	32
Tableau 3 : Synthèse des résultats obtenus.....	52
Tableau 4 : Synthèse des leucémies obtenues <i>in vivo</i> en fonction des différents oncogènes .....	60

## Liste des figures

Figure 1: L'hématopoïèse.....	2
Figure 2 : Les différents types de division des CSH .....	3
Figure 3 : Différenciation terminale des cellules B.....	5
Figure 4 : Principales cytokines impliquées dans l'hématopoïèse .....	7
Figure 5 : Cellules affectées par les réarrangements chromosomiques et conséquences dans l'hématopoïèse.....	11
Figure 6 : Répartition des quatre grands types de leucémies .....	13
Figure 7 : Distribution des leucémies aiguës en fonction de l'âge des patients .....	17
Figure 8 : MLL « Mixed Lineage Leukemia » : localisation chromosomique du gène et domaines structuraux de la protéine .....	20
Figure 9 : Les différents types de réarrangements de la protéine MLL .....	23
Figure 10 : Distribution des différents réarrangements de MLL.....	24
Figure 11 : Classification des leucémies MLL en fonction de l'âge des patients et du phénotype leucémique .....	27
Figure 12 : Schéma du vecteur rétroviral comportant le gène de fusion MLL .....	36
Figure 13 : Représentation schématique du principe de cytométrie en flux .....	40
Figure 14 : Taux de transfert de gènes en fonction des différentes fusions MLL.....	44
Figure 15 : Courbe de croissance <i>in vitro</i> des cellules MLL.....	45
Figure 16 : Évolution de l'expression de la protéine EGFP au cours du temps dans les différentes cultures <i>in vitro</i> .....	47
Figure 17 : Analyse du poids des rates et des thymus.....	48
Figure 18 : Analyses par cytométrie en flux de cellules de moelle osseuse.....	50
Figure 19 : Bloc de différenciation terminale des cellules B issues de LLA-B .....	54
Figure 20 : Stade de différenciation des cellules B issues de LLA-B .....	56
Figure 21 : Expression du CD117 à la surface des cellules myéloïdes de la moelle osseuse .....	57
Figure 22 : État de différenciation des cellules myéloïdes de moelle osseuse (MO) issues de LMA .....	58
Figure 23 Prolifération cellulaire des leucémies obtenues .....	61
Figure 24 : Caractéristiques du modèle de LMA générées à partir de donneur unique .....	67
Figure 25 : Schéma illustrant la méthode utilisée pour l'identification de biomarqueurs intéressants des leucémies myéloïdes MLL-AF9.....	69
Figure 26 : Identification de biomarqueurs spécifiques aux LMA contenant la translocation MLL-AF9 .....	70
Figure 27 Validation de RET dans des échantillons cliniques.....	72
Figure 28 : Efficacité du modèle de shRNA sur l'expression de RET dans la lignée THP-1 .....	73
Figure 29 : Effet de la modulation du niveau d'expression de RET <i>in vivo</i> .....	74

## *Liste des abréviations*

ABL1 : Abelson leukemia virus oncogene 1  
AF4 : ALL-1 fused gene on chromosome 4  
AGM : Aorte – Gonade – Mésonéphros  
ALL1 : Acute lymphocytic leukemia 1  
BCR : Breakpoint cluster region  
CBF $\beta$  : Core-binding factor, Beta subunit  
CCL23 : Chemokine (C-C motif) ligand 23  
CCLE : Cancer cell line encyclopedia  
CCS : Cosmic calf serum  
CEBP $\alpha$  : CCAAT/Enhancer binding protein (C/EBP), Alpha  
cGy : centiGray  
c-MYB : Proto-oncogene C-Myb  
c-MYC : Proto-oncogene C-Myc  
CPB : CREB-binding protein  
CREB : cAMP response element-binding protein  
CSE : Cellules souches embryonnaires  
CSH : Cellule souche hématopoïétique  
CSH-CT : Cellule souche hématopoïétique à court terme  
CSH-LT : Cellule souche hématopoïétique à long terme  
CSL : Cellule souche leucémique  
CSF : Colony stimulating factor  
CXCL12 : Chemokine (C-X-C Motif) ligand 12  
CXCR4 : Chemokine (C-X-C Motif) receptor 4  
DMT : DNA méthyl transférase)  
EGFP : Enhanced green fluorescent protein  
ELL : Elongation factor RNA polymerase II  
ENL : Eleven-nineteen-leukemia  
EPO : Erythropoïétine

EPS15 : Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15  
ETV6 : Ets variant 6  
EVI1 : Ecotropic viral integration site 1  
FAB : French–American–British  
FACS : Fluorescence activated cell sorting  
FBS : Fetal bovine serum  
FLT3-L : Fms-like tyrosine kinase 3 ligand  
GATA : GATA binding protein  
G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor  
GFI-1 : Growth factor independent 1 transcription repressor  
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
HMG-1 : High-mobility group 1  
HOX : Homeobox  
HRX : Human homologue of the drosophila trithorax  
IFN : Interferon  
IL : Interleukine  
IMDM : Iscove's modified dulbecco's medium  
JAG 1 : Jagged 1  
JAK-STAT : Janus kinase/signal transducers and activators of transcription  
KMT2A : Lysine methyltransferase 2A  
LB : Luria broth  
LEDGF : Lens epithelium-derived growth factor  
LIF : Leukemia inhibitory factor  
LLA : Leucémie lymphoblastique aigue  
LLA-B : Leucémie lymphoblastique aigue de type B  
LLA-T : Leucémie lymphoblastique aigue de type T  
LLC : Leucémie lymphoïde chronique  
LMA : Leucémie myéloblastique aigue  
LMC : Leucémie myéloïde chronique  
LMO : LIM (Lin11/Isl1/Mec3) domain only  
LRP 5/6 : Low density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6

LTR : Long terminal repeat  
LYL1 : Lymphoblastic leukemia associated hematopoiesis regulator 1  
MBD1 : Methyl binding domain protein  
M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor  
MEM : Minimum essential medium  
MEN1 : Multiple endocrine neoplasia type 1  
MKL1 : Megakaryoblastic leukemia (translocation) 1  
MLL : Myeloid/Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia  
MLLT3 : Myeloid/lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia; translocated to, 3  
MPP : Progéniteur multipotent  
MSCV : Murine stem cell virus  
MYH11 : Myosin, heavy chain 11, smooth muscle  
NK : Natural killer  
NOD : Non obese diabetic  
NPM1 : Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein b23, numatrin)  
NSG : NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PBS : Phosphate buffered saline  
PBX1 : Pre-B-cell leukemia Homeobox 1  
PcG : Polycomb-group  
PCR : Polymerase chain reaction  
PML : Promyelocytic leukemia  
PRC : Polycomb repressive complex  
PTD : Partial tandem duplication  
RAR $\alpha$  : Retinoic acid receptor, Alpha  
RBC : Red blood cell  
RBM15 : RNA binding motif protein 15  
RET : Ret proto-oncogene  
RPN1 : Ribophorin I  
RUNX : Runt-related transcription factor  
SCF : Stem cell factor

Scid : Severe combined immune deficiency  
SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1  
SEC : Super elongation complex  
SET- 1A/1B : Nuclear proto-oncogene (SET domain-containing protein 1A)  
shRNA : short hairpin RNA  
SMD : Syndrome myélodysplasique  
SNL : Speckled nuclear localization  
s-shRNA : scrambled shRNA  
TAD : Transcription activation domain  
TCF3 : Transcription factor 3  
TCGA-AML : The Cancer genome atlas for acute myeloid leukemia  
TCLX : T-Cell leukemia Homeobox  
TCR : Récepteurs des cellules T  
TGF : Transforming growth factor  
TNF : Tumor necrosis factor  
TPO : thrombopoïétine  
TrxG : Trithorax-group  
VSV-G : Vesicular stomatitis virus G glycoprotein  
WHO : World health organization



## ***Remerciements***

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Frédéric Barabé, pour sa confiance, son soutien ainsi que pour sa disponibilité tout au long de ma maîtrise, me permettant de vivre une expérience enrichissante professionnellement.

Je remercie également les membres de mon équipe, particulièrement Anne Bergeron pour ses conseils, son efficacité et sa très grande gentillesse ; Jessica Simard, pour son aide et son enthousiasme. Un grand merci à Joey Chevarie et Malika Laouedj, qui ont rendu mon expérience au sein de ce laboratoire des plus agréables et qui m'ont beaucoup aidé pour la réalisation de mon projet, me poussant à la réflexion.

Je tiens également à remercier tous mes collègues et amis de laboratoire pour leur générosité, leur encouragements et leur amitié. Ce sont des personnes extraordinaires que j'ai eu la chance de côtoyer au quotidien et qui m'ont apporté énormément de choses tout au long de ce parcours, autant sur le plan professionnel que personnel.

Finalement je tiens à remercier mes parents, ma sœur, mon conjoint et toute ma famille pour leurs encouragements, leur soutien et leur amour inconditionnel.

# ***I. Introduction***

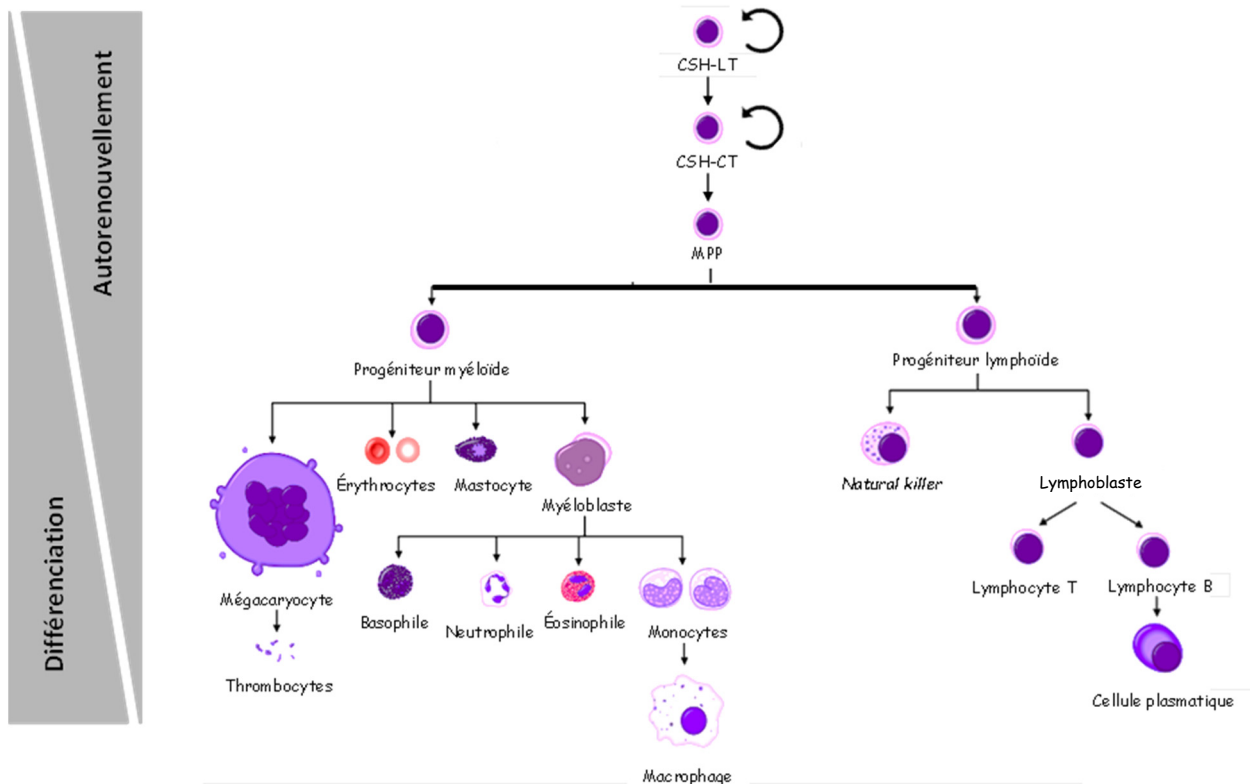
## **1. L'Hématopoïèse**

### **a) Définition**

L'hématopoïèse est un processus physiologique hiérarchique qui assure un remplacement continu et régulier des cellules sanguines. Pour un adulte en santé, c'est environ  $10^{12}$  cellules qui sont quotidiennement remplacées [1]. Au cours du développement fœtal, elle a d'abord lieu dans le sac vitellin, la région AGM (Aorte – Gonade – Mésonéphros) puis le foie et enfin la rate. C'est seulement au 5<sup>ème</sup> mois de la vie fœtale que la moelle osseuse va commencer à produire des leucocytes et des plaquettes, et plus tardivement des globules rouges. La moelle osseuse devient le siège principal de l'hématopoïèse à la naissance. Le besoin de l'hématopoïèse est accru au cours des premières années de développement, presque tous les os sont donc impliqués. A l'âge adulte, seule la moelle des vertèbres, des côtes, du crâne, du bassin et la partie proximale des fémurs est hématopoïétique. Le besoin est tout juste satisfait. Cependant, en cas de maladies empêchant la moelle osseuse de produire suffisamment de cellules sanguines, la rate et le foie sont capables de retrouver une activité hématopoïétique : on parle alors d'hématopoïèse extra-médullaire [2-4].

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) résident donc dans la moelle osseuse, site primaire de l'hématopoïèse. Dans certain cas, les cellules vont migrer vers d'autres organes hématopoïétiques. C'est le cas des cellules T qui vont terminer leur maturation dans le thymus. Généralement, on distingue les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Les lymphocytes sont produits, se développent et sont sélectionnés dans les organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus), et ils sont activés pour exercer leurs fonctions effectrices dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques) [5, 6].

La grande majorité des cellules sanguines ont une durée de vie limitée. Cela peut aller de 8 à 10 jours pour les plaquettes, 1 à 3 jours pour les neutrophiles, 120 jours pour les globules rouges, et de quelques mois à plusieurs années pour les lymphocytes. Le remplacement de ces cellules est donc crucial pour la survie d'un individu car elles assurent des fonctions vitales comme le transport de l'oxygène (érythrocytes), la coagulation (mégacaryocytes/thrombocytes), et la défense immunitaire contre des pathogènes (leucocytes) [7]. Les cellules matures proviennent de deux grandes lignées hématopoïétiques : la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde. Toutes ces cellules aux fonctions très diverses sont issues d'une même cellule : la CSH (figure 1).



**Figure 1: L'hématopoïèse**

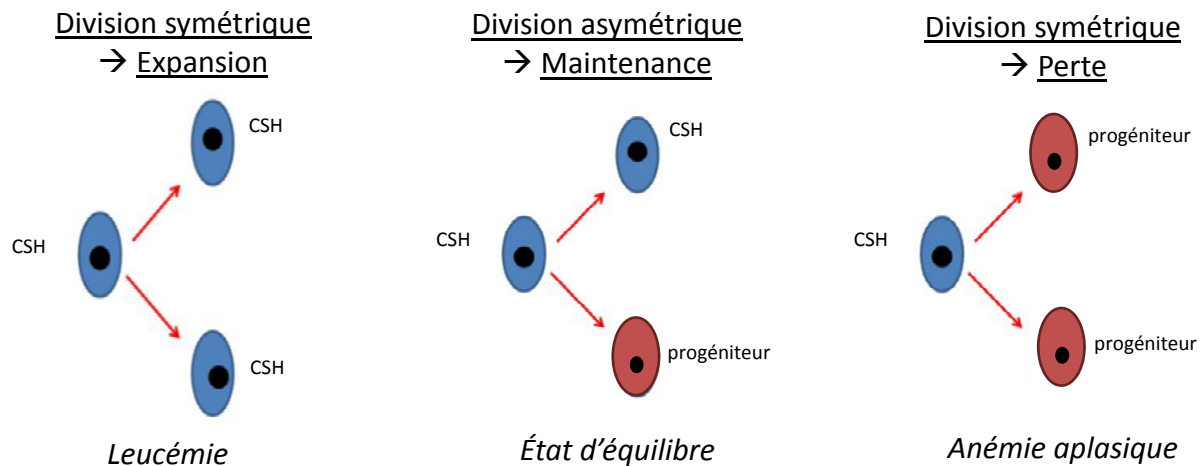
Les cellules souches hématopoïétiques à court terme (CSH-CT) sont issues des CSH à long terme (CSH-LT). Ces deux types cellulaires possèdent un fort potentiel d'auto-renouvellement (flèche circulaire). Les CSH-CT vont se différencier en progéniteurs multipotents (MPP) qui vont être à l'origine des deux grandes lignées : myéloïde et lymphoïde. Par une succession de division, les cellules vont perdre leur capacité de s'auto-renouveler et ainsi aboutir à une cellule mature entièrement différenciée.

### b) Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Les CSH ont été mises en évidence dans les années 1960 [8-10]. Aujourd'hui, même si leurs rôles et leurs propriétés fonctionnelles sont clairement définis, la recherche sur les CSH est encore très active. Les CSH ont été initialement étudiées dans le but de répondre à des besoins cliniques comme par exemple protéger un individu ayant été exposé à une dose d'irradiation ou de chimiothérapie, ou encore traiter un individu atteint d'un cancer ou bien d'une déficience immunitaire [11, 12]. Aujourd'hui, de nombreuses recherches sur les CSH ont pour but l'amélioration des thérapies nécessitant des greffes de CSH.

Les CSH constituent une rare population des cellules hématopoïétiques capables de produire toutes les cellules matures du sang [13]. Elles représentent seulement une infime

fraction des cellules de la moelle (entre 0.01% et 0.05%). L'interaction dynamique et réciproque des CSH avec son microenvironnement gouverne en grande partie leur survie et leur prolifération [14]. Deux caractéristiques sont spécifiques aux cellules souches hématopoïétiques : la différenciation et l'auto-renouvellement. La différenciation confère à la CSH le potentiel de générer n'importe quelle lignée spécialisée du sang. L'auto-renouvellement se caractérise par un type de division où l'une des cellules filles générées va garder l'identité de la mère. Cette caractéristique est cruciale pour la CSH car elle assure la production suffisante des cellules souches tout au long de la vie. Ce type de division peut être symétrique, ce qui va augmenter le nombre de cellules souches, ou bien asymétrique, ce qui préserve alors un nombre constant de ces cellules (Figure 2). Dans certaines pathologies, des anomalies de divisions peuvent être observées. C'est le cas des leucémies aiguës où la succession trop importante de divisions symétriques entraîne l'accumulation de blastes leucémiques. Au contraire, en cas d'anémie aplasique, une déplétion progressive des CSH est observée. La CSH possède également un haut potentiel prolifératif ainsi que la capacité d'entrer en quiescence, état dans lequel se trouve majoritairement la CSH.



**Figure 2 : Les différents types de division des CSH**

Adapté de Cellot, S., et al., Sustained in vitro trigger of self-renewal divisions in *Hoxb4hiPbx1(10)* hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 2007. 35(5): p. 802-16.

Les CSH se classent en deux catégories : les CSH à long terme (CSH-LT) et les CSH à court terme (CSH-CT). Ce sont les CSH-LT qui sont les plus primitives et qui vont se différencier en CSH-CT. Ces dernières vont ensuite donner naissance aux progéniteurs multipotents (MPP) qui, à chaque division, vont restreindre leur potentiel de différenciation pour aboutir une cellule mature et spécialisée (figure 1).

Au cours de cette différenciation, les CSH perdent rapidement leur potentiel d'auto-renouvellement. En effet, les CSH-CT et MPP ne peuvent s'auto-renouveler uniquement durant quelques semaines avant de s'épuiser [15]. En contrepartie, ces cellules vont rentrer dans une phase de prolifération rapide afin d'augmenter leur nombre [16].

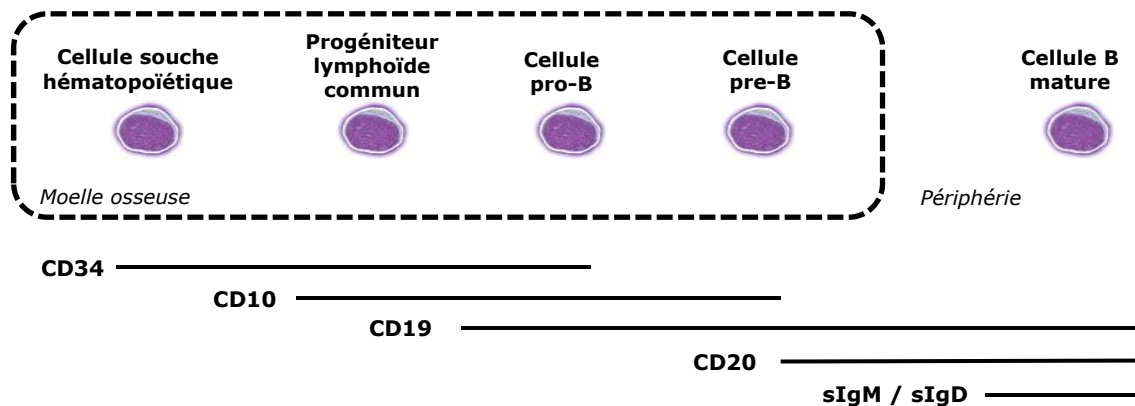
L'étude des CSH est rendu difficile en raison du nombre très restreint de ces cellules dans la moelle osseuse. La cytométrie en flux est aujourd'hui couramment utilisé pour isoler les cellules souches et les progéniteurs, et ce grâce à leurs marqueurs de surface.

CD34 est le premier marqueur de surface à avoir été identifié et permet d'enrichir une population en CSH [17]. Il permet cependant d'isoler aussi bien les CSH que les progéniteurs plus ou moins différenciés. Plus tard, CD90 (ou Thy1), en combinaison avec CD34, a permis de mettre en évidence une population de cellules capables de recréer différentes lignées cellulaires [18]. D'autres marqueurs de surface comme CD117 (ou c-Kit) sont aussi ciblés afin d'isoler les CSH. L'absence des marqueurs de lignée CD3, B220, CD11b, Gr1, Ter19 (Lin-), ou bien de marqueurs de progéniteurs plus différenciés tels que CD45RA ou CD38 est aussi un moyen d'isoler les CSH [19].

### **c) Les marqueurs des cellules hématopoïétiques humaines**

Différents marqueurs de surface définissent le type cellulaire, l'appartenance à une lignée, ainsi que le niveau de maturation dans la lignée. Le CD45 est le marqueur spécifique des cellules hématopoïétiques humaines. Le marqueur principal des CSH est le CD34+. De plus, l'absence du marqueur CD38 (CD38-) ainsi que des marqueurs de lignées (Lin-) est aussi un moyen de caractériser les CSH. Il est également possible d'identifier une lignée cellulaire en fonction de l'expression de certains marqueurs de surface. Par exemple, la lignée myéloïde est caractérisée par le marqueur CD33 alors que la lignée lymphoïde B est caractérisée par le marqueur CD19.

Certains marqueurs sont spécifiques à une lignée et vont permettre d'identifier le niveau de maturation d'une cellule dans une lignée. Par exemple, lors de la différenciation terminale des cellules B, différents marqueurs vont être exprimés à la surface de la cellule au fur et à mesure de la maturation (figure 3).



**Figure 3 : Différenciation terminale des cellules B**

Tout au long de la différenciation des cellules B, différents marqueurs vont être exprimés à la surface des cellules. L'absence ou la présence de ces marqueurs permet de définir le stade de différenciation.

#### d) Régulation de l'hématopoïèse

De nombreux acteurs qui interagissent avec les CSH vont réguler leur maintien en agissant sur divers états cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'auto-renouvellement ou bien la quiescence. Tous ces phénomènes vont se dérouler au sein de la niche hématopoïétique qui joue un rôle essentiel dans le développement des CSH, leur fournissant un environnement permissif et sélectif.

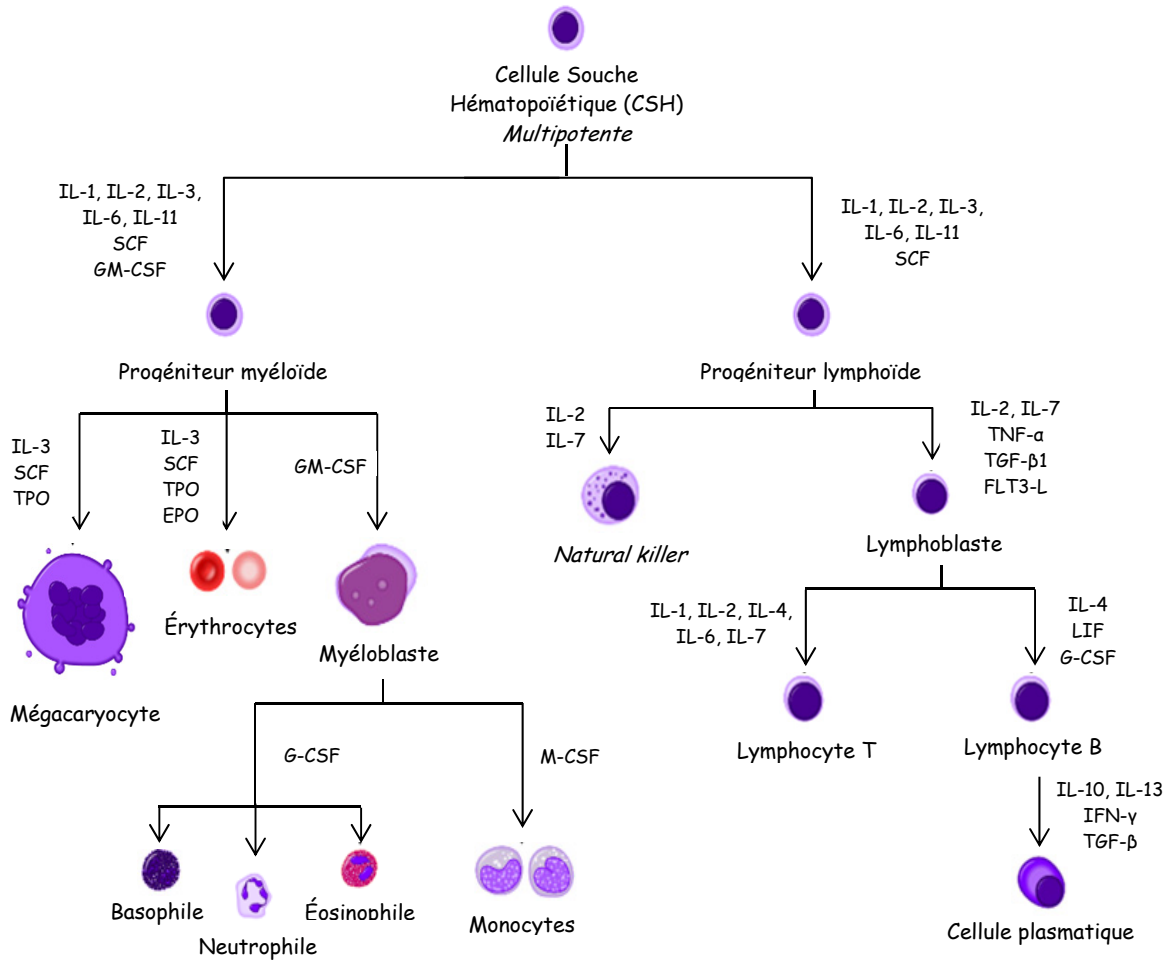
##### *i. Le microenvironnement*

La niche hématopoïétique constitue le microenvironnement médullaire qui participe à l'organisation générale de la moelle. Il va permettre aux CSH d'acquérir la bonne conformation et d'interagir avec les autres types cellulaires, assurant ainsi l'hématopoïèse. Il existe donc un contact très étroit entre les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, cellules épithéliales et adipocytes). Ce microenvironnement fournit en grande partie les molécules nécessaires à la différenciation et à la prolifération des cellules hématopoïétiques. C'est d'ailleurs l'étude du stroma médullaire dans la régulation de l'hématopoïèse qui a révélé l'existence de niche pour les CSH capable de contrôler leur auto-renouvellement et leur engagement dans une lignée spécifique [20, 21].

## *ii. Cytokines et facteurs de transcription*

Les CSH sont sensibles à leur environnement. Ainsi, plusieurs cytokines jouent un rôle clé dans leur régulation. Il a été démontré chez la souris que les cytokines telles que l'IL-3 (interleukine 3), IL-6, IL-11, le SCF (Stem Cell Factor), le ligand FLT-3 (FLT3-L), l'EPO (érythropoïétine) et la TPO (thrombopoïétine) sont des régulateurs clés des CSH et des progéniteurs capables d'influencer la survie, la prolifération et la différenciation [22-31].

Les cellules hématopoïétiques expriment donc les récepteurs d'un grand nombre de cytokines qui contrôlent des voies de différenciation distinctes et permettent l'engagement des cellules dans une voie définie selon les cytokines présentes (figure 4). Tous ces facteurs n'agissent pas au même niveau. Certains comme le SCF, IL-3, IL-6, FLT3-L vont agir au niveau des progéniteurs primitifs, alors que d'autres comme les facteurs stimulant les colonies (CSF) agiront sur des progéniteurs plus tardifs et auront un rôle plus spécifique à une lignée [32]. Par exemple, le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) va agir sur des précurseurs granulocytes pour induire la formation de neutrophiles.



**Figure 4 : Principales cytokines impliquées dans l'hématopoïèse**

*In vitro*, de nombreuses équipes ont tenté d'induire l'expansion des CSH. Dans la majorité des cas, on observe une différenciation des cellules souches et donc une perte de la capacité d'auto-renouvellement. Ces observations suggèrent que ces cytokines jouent un rôle prépondérant sur la différenciation des CSH et non sur l'auto-renouvellement, ce qui conduit à leur épuisement [26, 33-35]. Cependant, l'environnement des cellules étant modifié lors d'expérimentation *in vitro*, cela pourrait aussi être dû à l'absence de stroma, tissu de soutien essentiel au maintien des CSH. La difficulté de maintenir des CSH en culture avec un cocktail de cytokines suggère qu'un contrôle intrinsèque aux cellules hématopoïétiques est également impliqué. En effet, un large répertoire de molécules ainsi que des facteurs de transcription jouent un rôle dans la régulation intrinsèque des cellules hématopoïétiques et interviennent dans les voies de signalisation de développement.



Plusieurs facteurs de transcription jouent un rôle dans le maintien des CSH, leur différenciation et leur engagement dans les différentes lignées. Comme les cytokines, tous ces facteurs n'interviennent pas au même moment. Certains facteurs agissent au niveau des cellules souches fœtales mais ne sont pas requis pour le maintien des cellules souches adultes. Le profil transcriptionnel varie donc selon le stade de développement. Par exemple, RUNX1 et TAL1 sont deux facteurs essentiels durant le développement embryonnaire des CSH [36] mais l'inactivation de ces facteurs n'a aucun effet sur les CSH adultes [37-40]. Certains facteurs ont un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement et la survie des CSH adultes. C'est le cas de GATA3, c-MYC, c-MYB, GFI-1 et ETV6. Lorsque ces facteurs sont absents, on observe une altération des fonctions intrinsèques des CSH.

La voie Notch joue un rôle essentiel dans le maintien des CSH. Il a été démontré que le ligand de Notch Delta-1 entraîne une augmentation du nombre de cellules souches. En effet, lorsque des cellules souches ayant une expression constitutive du récepteur Notch sont cultivées avec un cocktail de cytokines adéquates, on observe une prolifération importante de cellules qui restent dans un état indifférencié, et ce après 25 jours de culture [41]. Ainsi, il semblerait que l'activation soutenue de la voie de signalisation Notch augmente la capacité d'auto-renouvellement des CSH, accompagnée d'un blocage de la différenciation [42]. D'autres études *in vivo* ont montré que l'inactivation de Notch1 et/ou JAG1 (son ligand) n'affectait pas l'homéostasie des CSH, même après 8 semaines [43]. Cela suggère que, bien qu'importante dans certains aspects de régulation, la voie Notch ne semble pas être indispensable pour la survie des CSH.

La voie de signalisation Wnt semble essentielle pour le maintien des propriétés fonctionnelles des CSH. Cette voie implique la liaison de la protéine Wnt à différents complexes récepteurs et co-récepteurs tels que Frizzled et LRP5/6. La voie Wnt est également importante dans l'auto-renouvellement des CSH [44, 45]. Il semblerait que les voies Notch et Wnt agissent en synergie pour maintenir un nombre constant de CSH [46].

Le récepteur c-kit et son ligand SCF sont à la tête d'une voie de signalisation essentielle pour les CSH, associée à plusieurs réponses cellulaires incluant la survie, la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhérence [47, 48]. Le récepteur c-kit appartient à la famille des récepteurs tyrosine kinase. Plusieurs mutations dans le gène codant pour le récepteur ou pour son ligand ont été caractérisées *in vivo*, ce qui a permis de mieux comprendre son rôle. Il a été démontré qu'une seule mutation dans le domaine tyrosine kinase de c-kit diminue fortement l'intensité de cette voie de signalisation [49]. De plus, chez la souris, l'absence de c-kit ou de son ligand cause la mort des souris *in utero* ou juste après la naissance et se caractérise souvent par une anémie sévère [47].

La voie de signalisation des Smads joue également un rôle dans l'activité des CSH. En effet, les signaux transmis par la superfamille des TGF- $\beta$  vont permettre la phosphorylation

des protéines Smads qui vont alors migrer vers le noyau et jouer un rôle de facteurs de transcription [50]. Lorsque la voie de signalisation Smad est inhibée par la délétion de Smad4, une diminution significative de la capacité de reconstitution des CSH est observée [51]. Cela suggère que cette voie est nécessaire pour l'auto-renouvellement des CSH.

De nombreux autres facteurs vont interagir avec les CSH et influencer les différentes réponses cellulaires. Par exemple, la voie de signalisation JAK-STAT (Janus kinases / Signal Transducers and Activators of Transcription) est impliquée dans la survie des cellules souches [52, 53]. Également, il a été démontré que la perte de fonction de CXCR4, récepteur membranaire de CXCL12 (ou SDF-1 pour « stromal cell-derived factor 1 »), entraîne une diminution du maintien de la quiescence des CSH [54].

### *iii. Régulation épigénétique*

De nombreuses études ont montré que les modifications épigénétiques peuvent changer l'expression de plusieurs gènes en modifiant la structure de la chromatine [55]. Cela influence l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN et altère le profil transcriptionnel des cellules [56]. La modification de la chromatine est en grande partie régulée par des modifications post-traductionnelles des histones, qui va soit permettre l'accès à la chromatine, soit l'empêcher [57]. Le rôle possible de l'épigénétique au niveau des cellules souches a émergé d'études réalisées sur les cellules souches embryonnaires (CSE) pluripotentes. Ces études ont montré que les CSE présentaient une structure de la chromatine moins condensée, rendant celle-ci plus accessible aux facteurs de transcription [58, 59]. Aujourd'hui, de nombreuses évidences laissent supposer un rôle important de la signature épigénétique dans la relation CSH-différenciation [60]. Des changements dans l'expression de gènes spécifiques à une lignée ont été observés et corrélient avec les changements observés dans la structure de la chromatine au niveau des régions promotrices, durant la différenciation [61, 62]. Les protéines du groupe Polycomb (PcG) sont également impliquées dans les processus épigénétiques des CSH et agissent en réprimant des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la différenciation. Le complexe PcG joue un rôle au niveau de la modification des histones. Il est composé de deux complexes multi-protéiques : PRC1 et PRC2 (Polycomb Repressive Complex 1 et 2). Le groupe trithorax (trxG) va également agir dans la régulation de l'hématopoïèse. Contrairement au complexe PcG qui maintient un état réprimé de la chromatine, le complexe trxG va permettre l'accessibilité de la chromatine et ainsi activer la transcription. Ce complexe joue donc un rôle essentiel au cours de l'hématopoïèse et induit la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, notamment en régulant de façon positive les gènes HOX [63]. Le gène MLL (Mixed Lineage Leukemia) fait partie du complexe trxG et sera présenté dans ce mémoire.

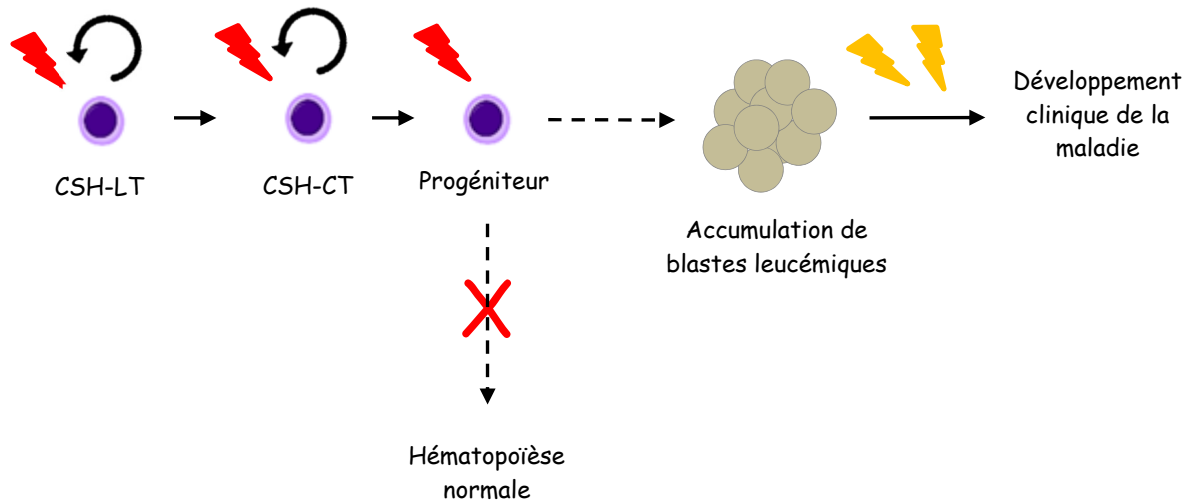
Il existe de nombreuses autres marques de régulation épigénétique des CSH. Certaines études ont montré que des marques telles que la méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4), l'acétylation de l'histone 3 et l'absence de méthylation des îlots CpG étaient colocalisées dans des régions régulatrices et correspondaient à une activation des gènes spécifiques de lignée. Au contraire, en absence de ces marques, ces régions régulatrices présentaient une augmentation de la méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27) ce qui entraîne la répression de la transcription [64].

Ainsi, la régulation épigénétique semble jouer un rôle important dans le processus hématopoïétique, d'où les signatures différentes observées entre les CSH et les progéniteurs.

## 2. Les leucémies aigues

### a) Leucémogénèse

Les leucémies sont un groupe de maladies hétérogènes caractérisées par un contrôle dérégulé de la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules hématopoïétiques. La pathologie apparaît très souvent à la suite d'un réarrangement chromosomique (translocation, délétion, inversion, duplication en tandem...) ou bien une mutation de l'ADN affectant des oncogènes. Cet événement va conférer un avantage de survie à la cellule et la rendre instable. Les cellules matures spécialisées du sang ne seront plus produites. L'accumulation d'autres événements génétiques et/ou épigénétiques va alors être responsable du développement de la maladie clinique (figure 5). Pour certaines leucémies il est prouvé que certains événements comme une translocation chromosomique, peuvent se produire *in utero* et qu'ainsi, des événements ultérieurs favorisent de façon plus ou moins précoce l'apparition de la maladie [65-67].



**Figure 5 : Cellules affectées par les réarrangements chromosomiques et conséquences dans l'hématopoïèse**

Les réarrangements chromosomiques (flèches rouges) comme les translocations peuvent survenir dans les cellules souches hématopoïétiques à long terme (CSH-LT), à court terme (CSH-CT) ou bien les progéniteurs (myéloïdes ou lymphoïdes) entraînant une accumulation de blastes leucémiques. L'instabilité de ces cellules va engendrer l'accumulation d'autres événements génétiques et/ou épigénétiques (flèches jaunes) aboutissant au développement de la maladie clinique.

Le processus leucémogénique prend origine dans la CSH. Ces altérations permettent à la cellule leucémique un auto-renouvellement et une prolifération clonale anarchique. Cela entraîne un envahissement des cellules sanguines anormales qui sont alors incapables d'accomplir leur fonction.

L'origine de la cellule ciblée par la transformation leucémique est encore discutée. Plusieurs caractéristiques sont communes à la cellule souche leucémique (CSL) et à la CSH comme la capacité d'auto-renouvellement illimité ou le niveau d'expression de la télomérase [68, 69]. De ce fait, la cellule souche est une cible potentielle de la transformation oncogénique. Par ailleurs, des expériences ont montré que suite à la transfection de plusieurs oncogènes dans des progéniteurs, il a été possible de restaurer des propriétés d'auto-renouvellement chez ces progéniteurs qui n'ont pas ce potentiel. Ces cellules transfectées ont par la suite été capables d'induire des leucémies chez la souris [65]. L'hypothèse que la transformation oncogénique se produit chez des cellules progénitrices plus matures est donc également probable. Cependant, du fait que chez l'homme les études se font généralement sur les échantillons cliniques obtenus chez un patient déjà atteint, la nature de la cellule ciblée par la transformation reste encore inconnue.

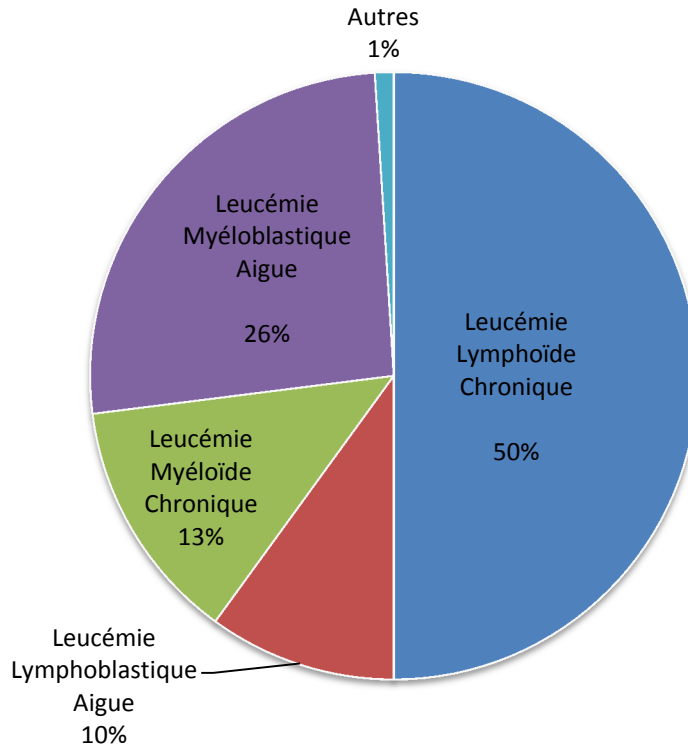
## b) Classification des leucémies

Il existe plusieurs types de leucémies classées en fonction de différents critères. Dans un premier temps, certains critères vont permettre de classer les leucémies en quatre grands groupes dont la distribution diffère dans la population (figure 6). La rapidité à laquelle la maladie se développe et évolue est un premier critère. Les leucémies aiguës débutent de manière soudaine et se développent en quelques jours ou quelques semaines. Les leucémies chroniques se développent de manière plus lente, au fil des mois voire des années. De plus, les leucémies chroniques sont caractérisées par des cellules leucémiques plus matures contrairement aux leucémies aiguës dont les cellules leucémiques sont bloquées à un stade de maturation beaucoup plus précoce. Ensuite, en fonction de la lignée cellulaire à partir de laquelle la leucémie se développe, on peut subdiviser les leucémies en deux autres groupes : les leucémies lymphoïdes (ou lymphoblastiques), qui prennent naissance dans les cellules sanguines appartenant à la lignée lymphoïde, et les leucémies myéloïdes (ou myéloblastiques), qui prennent naissance dans les cellules sanguines appartenant à la lignée myéloïde.

On peut donc classer les leucémies en quatre grands groupes :

- Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)
- Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)
- Leucémie Lymphoblastique Aigue (LLA)
- Leucémie Myéloblastique Aigue (LMA)

Il existe également des formes mixtes ou non différenciées, qui sont des formes plus rares de leucémies.



**Figure 6 : Répartition des quatre grands types de leucémies**  
*Source : Société de leucémie et lymphome du Canada*

A partir de cette classification de base, différents types de leucémies peuvent être définis. Les différences reposent sur des critères morphologiques, immunologiques, cytochimiques et cytogénétiques. Deux grands systèmes de classification existent : le système de classification de l’OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et le système de classification FAB (French-American-British).

La classification FAB, publiée en 1976, se base sur des données morphologiques, immunophénotypiques, cytochimiques. La classification de l’OMS, plus récente et plus utilisée, dont la dernière édition «WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008 » est apparue en 2008 [70], a intégré les facteurs génétiques aux autres facteurs dans la classification. Nous nous concentrerons sur les leucémies aiguës tout au long de ce chapitre.

*i. Les leucémies lymphoblastiques aiguës selon la classification de l'OMS*

Le système de l'OMS classe les LLA selon le type de lymphocytes (cellules B ou T) et le degré de maturation (précurseurs ou matures).

- Leucémie lymphoblastique aiguë de type B (LLA-B)

Les LLA-B correspondent aux néoplasies de précurseurs lymphoïdes engagés dans la lignée lymphocytaire B. L'OMS divise les LLA-B en 2 groupes :

- ➔ Les LLA-B associées à des anomalies génétiques récurrentes
- ➔ Les LLA-B non associées à des anomalies génétiques récurrentes

Pour les anomalies récurrentes des LLA-B, on retrouve :

- t(9;22)(q34;q11.2) produisant le gène de fusion BCR-ABL1
- les translocations impliquant un réarrangement de MLL (11q23) : principalement la t(4;11)(q21;q23) et la t(11;19)(q23;p13.3)
- t(12;21)(p13;q22) conduisant à la fusion ETV6-RUNX1
- l'hyperploïdie, soit un nombre de chromosomes compris entre 51-57
- l'hypoploïdie, soit un nombre de chromosomes inférieur à 45
- t(5;14)(q31;q32) conduisant à la fusion IL3-IgH et entraînant la surexpression d'IL3
- t(1;19)(q23;p13.3) conduisant à la fusion TCF3-PBX1

Pour les LLA-B non associées à des anomalies génétiques récurrentes, l'immunophénotypage est alors utile pour identifier l'appartenance des blastes à la lignée lymphocytaire B et le degré de différenciation des cellules B (pro-B, B commune, pré-B). La leucémie de Burkitt est traitée comme une phase leucémique du lymphome de Burkitt (syndromes lymphoprolifératifs B) vu la rareté des patients présentant une leucémie avec envahissement exclusif de la moelle et du sang périphérique.

- Leucémie lymphoblastique aigue de type T (LLA-T)

Pour les LLA-T, l'immunophénotypage identifie et classe les blastes selon leur degré de différenciation et/ou de blocage dans la ligné lymphocytaire T (pro-T, pré-T, corticale, médullaire). Parmi ces leucémies, les anomalies génétiques récurrentes sont les suivantes :

- Les translocations impliquant les locus  $\alpha$  et  $\delta$  des récepteurs des cellules T (TCR) situés sur la bande chromosomique 14q11.2, ou bien les locus  $\beta$  et  $\gamma$  situés respectivement sur les locus 7q35 et 7p14-15 des TCR. Cela provoque la surexpression de gènes codant pour des facteurs de transcription (par exemple TLX1, TLX3, MYC, TAL1, LMO1, LMO2, LYL1)
- Des translocations provoquant la formation de gènes de fusion (par exemple la fusion MLL-ENL associée à la translocation t(11;19)(q23;p13.3)
- Des délétions provoquant la perte de gènes suppresseurs de tumeurs
- Des mutations activatrices de gènes

#### *ii. Les leucémies myéloblastiques aigues selon la classification de l'OMS*

On peut distinguer quatre groupes de LMA selon cette classification. Un premier groupe se caractérise par la présence d'anomalies génétiques récurrentes, à savoir des réarrangements chromosomiques ou des mutations génétiques. On y trouve :

- t(8;21)(q22;q22) conduisant au gène de fusion RUNX1-RUNX1T1
- inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) formant la fusion CBF $\beta$ -MYH11
- t(15;17)(q24;q21) conduisant à la fusion PML-RAR $\alpha$
- t(9;11)(p22;q23) conduisant au gène de fusion MLLT3-MLL
- inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) conduisant au gène de fusion RPN1-EV11
- t(1;22)(p13;q13) associée à RBM15-MKL1
- les mutations NPM1 ou CEBP $\alpha$  qui ont été classées comme deux entités provisoires

Le deuxième groupe regroupe les LMA avec changements myélodysplasiques, par exemple un syndrome myélodysplasique (SMD) ayant évolué vers une LMA.

Le troisième groupe des LMA sont les LMA secondaires, survenues suite à des traitements chimio-thérapeutiques ou d'une radiothérapie.

Toutes les LMA non-classifiables dans les trois premiers groupes sont regroupées dans le quatrième groupe. Les critères morphologiques et immunophénotypiques sont notés afin de d'identifier l'appartenance à la lignée myéloïde et le stade de maturation.



### *iii. Les leucémies mixtes*

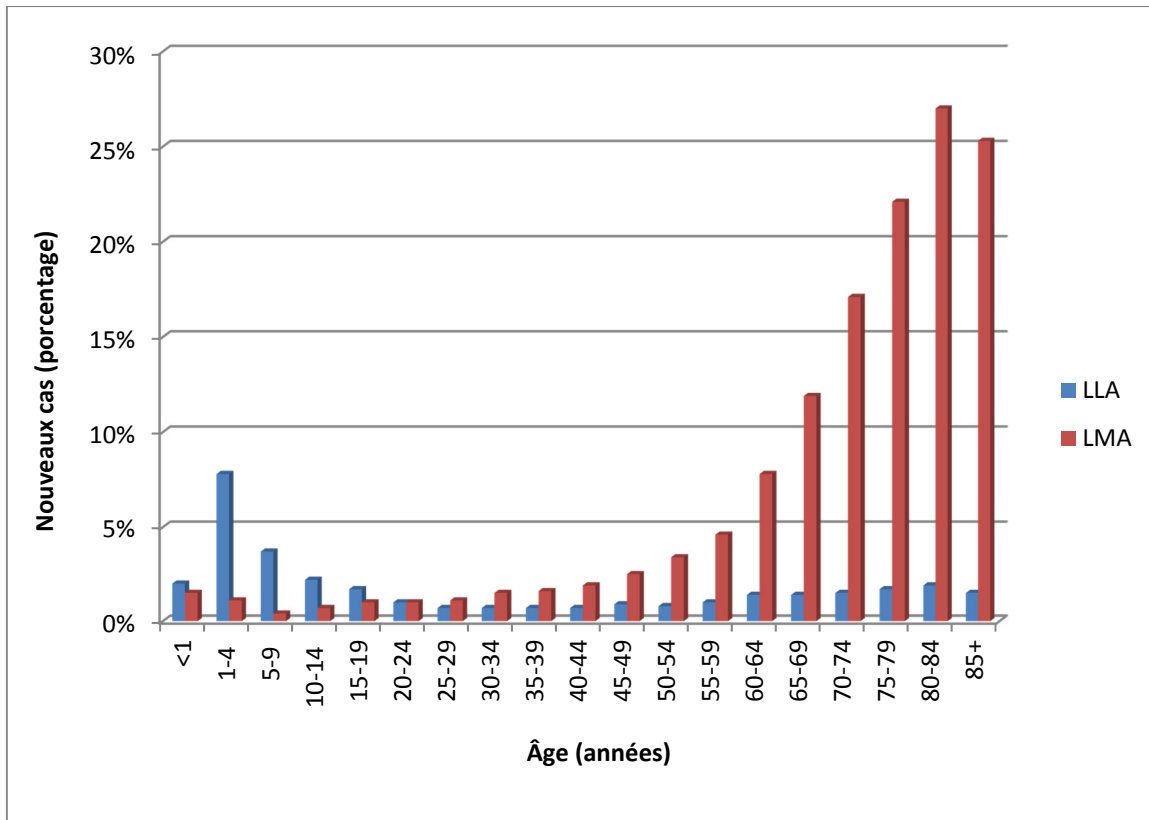
Certaines leucémies n'entrent pas dans le système de classification de l'OMS ni celui du FAB. On considère ces leucémies comme des leucémies mixtes (ou bi-phénotypiques), c'est-à-dire qui présentent les caractéristiques à la fois myéloïde et lymphoïde.

#### **c) Incidence**

Aux États-Unis, environ 16 000 nouveaux cas de leucémies aiguës sont diagnostiqués chaque année, dont 75% sont des LMA et 25% des LLA.

Depuis l'identification du chromosome de Philadelphia, il y a plus de 50 ans, les études sur les altérations chromosomiques spécifiques dans les cancers humains ont un impact majeur sur le diagnostic et le choix du traitement pour les patients atteints de maladies hématologiques [71]. Les techniques d'analyses permettent aujourd'hui une identification rapide des réarrangements chromosomiques lors d'un diagnostic de leucémie. Grâce à de nombreuses études corrélatives, de nombreux réarrangements spécifiques sont utilisés pour évaluer les risques et permettre ainsi de choisir une thérapie plus spécifique. Ce paradigme a bien été démontré dans le cas de LLA pédiatriques. Par exemple, les patients atteints d'une LLA avec une translocation  $t(1;19)$  ont un risque plus élevé d'un échec du traitement. Le traitement de ces patients est réalisé avec une combinaison plus agressive d'agents chimio-thérapeutiques et permet ainsi un taux de survie à long terme comparable à ceux des enfants ayant un risque standard [72].

Malgré l'augmentation de la qualité des procédures diagnostiques et thérapeutiques, les taux de mortalité demeurent élevés. Les LLA et LMA peuvent toucher aussi bien les enfants que les adultes bien que la répartition soit différente (figure 7). En effet, alors que les LMA sont les leucémies aiguës majoritairement présentes chez les personnes de plus de 60 ans, les LLA représentent quant à elles la majorité des leucémies aiguës chez les enfants en bas âge. Chez les nourrissons et les jeunes enfants (0 à 5ans), les LLA représentent environ 80% des leucémies aiguës [73].



**Figure 7 : Distribution des leucémies aiguës en fonction de l'âge des patients**  
 Source : National cancer institute (2012) - <http://seer.cancer.gov/>

La LLA est donc plus fréquente chez les enfants en bas âge. Elle représente 34% des cancers pédiatriques selon les statistiques canadiennes sur le cancer. C'est donc le 1<sup>er</sup> cancer diagnostiqué chez l'enfant, devant les tumeurs du système nerveux central. Les formes chroniques sont très rares chez ces patients, et le pronostic est meilleur pour les LLA. Le taux de survie à 5 ans pour les LLA est de 80% chez les enfants et environ 40% chez les adultes [74-76].

Les LLA-T représentent seulement un tiers des LLA mais l'immunophénotype T est le plus fréquemment associé au mauvais pronostic des patients. Les LLA-B sont les leucémies les plus diagnostiqués chez les enfants avec près de 4000 nouveaux cas chaque année aux États-Unis [77]. Les nouvelles thérapies permettent chez les enfants une rémission dans 85% des cas et un taux de guérison élevé, contrairement à ce qui s'observe chez les adultes où les rechutes sont nombreuses [78]. En effet, bien que la toxicité accrue liée aux traitements soit une caractéristique des LLA adultes, l'âge est un facteur pronostique dominant associé aux LLA. De plus, il semblerait que des facteurs biologiques tels que les différences immunologiques ou encore les caractéristiques génétiques attribuables aux

différents sous-groupes de LLA aient un impact sur l'efficacité de la thérapie et donc sur les possibles rechutes [79, 80].

Concernant les LMA, l'incidence augmente avec l'âge. En effet, la LMA survient le plus souvent chez les adultes de plus de 60 ans. Incurable il y a 50 ans, aujourd'hui les patients de 60 ans et moins atteints d'une LMA ont un taux de survie à 5 ans qui oscille entre 35 et 40%. Cependant, ce chiffre diminue chez les patients de 60 ans et plus pour atteindre seulement 5 à 15% [81]. En effet, les fortes doses d'agents chimio-thérapeutiques reçues en traitement, bien que tolérées, sont peu bénéfiques chez les personnes âgées [82]. En effet, une personne âgée présente plus de risques d'être atteinte d'autres affections médicales qui font qu'il lui est difficile de faire face aux effets secondaires des traitements de la LMA.

### 3. Le gène MLL

Tout au long de ce mémoire, nous nous concentrerons sur les leucémies aiguës impliquant le gène MLL.

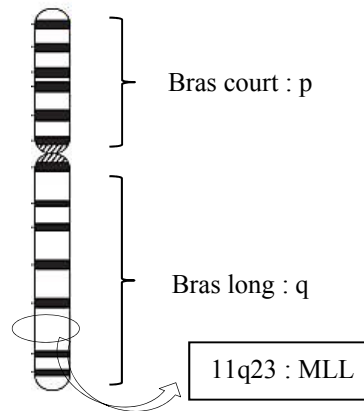
#### a) Le gène MLL dans l'hématopoïèse

Le gène MLL (Mixed Lineage Leukemia), aussi appelé ALL-1 (Acute Lymphoblastic Leukemia), HTRX-1 ou HRX (Human homologue of the drosophila trithorax), ou encore KMT2A (Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2A), est une histone méthyl transférase impliquée dans la régulation épigénétique de la transcription. Il est composé de 37 exons qui codent pour une protéine nucléaire de 430 kDa et il se situe sur la bande chromosomique 11q23 (figure 8). La protéine MLL possède des paralogues qui forment la famille MLL. Cette famille de protéines est composée de MLL, MLL2, MLL3, MLL4, SET1A et SET1B [83], qui possèdent toutes une activité histone méthyl transférase spécifique de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4).

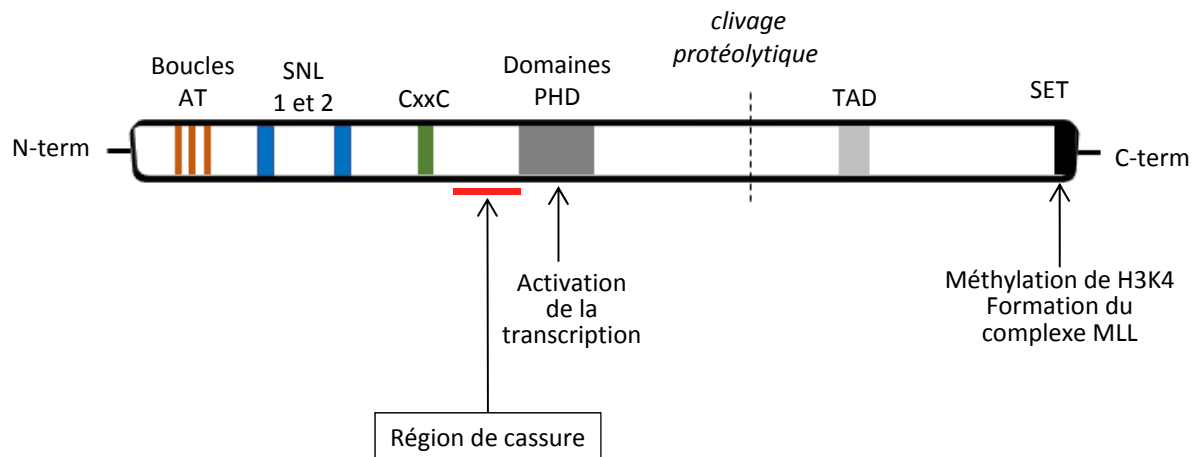
La protéine MLL joue un rôle crucial au cours du développement embryonnaire et de l'hématopoïèse [84]. Le gène MLL exerce son potentiel leucémogénique seulement après fusion avec un large choix de gènes partenaires [85]. La conséquence de cette fusion est la création d'une protéine de fusion possédant une nouvelle fonction [86-88]. Un certain nombre de gènes partenaires sont des composants du « super elongation complex » (SEC) [89] qui assure la fonction régulatrice de l'élongation de la transcription. Les protéines de fusion MLL vont cibler la chromatine en liant, entre autres, la protéine Menin (codée par MEN1 : Multiple Endocrine Neoplasia type 1) et le facteur LEDGF (Lens epithelium-

derived growth factor) à la partie conservée N-terminal de MLL. Il va alors se produire une activation des gènes tels que HoxA9 et HoxA10 qui sont couramment surexprimés dans les leucémies MLL [90]. De cette manière, de nombreux gènes de fusion MLL ont la capacité de déréguler la transcription de leur cible en interférant avec le contrôle de la machinerie transcriptionnelle [91].

A)



B)



**Figure 8 : MLL « Mixed Lineage Leukemia » : localisation chromosomique du gène et domaines structuraux de la protéine**

Le gène MLL est situé sur la bande chromosomique 11q23, au niveau du bras long (q) du chromosome (A). Plusieurs domaines structuraux composent la protéine MLL comme les boucles AT (« AT rich »), les signaux de localisation nucléaire (SNL « speckled nuclear localization »), un domaine CxxC riche en cystéine, plusieurs domaines à doigts de zinc (domaines PHD), le domaine d'activation de la transcription (TAD) et le domaine à activité histone méthyltransférase H3K4 (domaine SET).

L'importance de la protéine MLL pour le développement axial du squelette et pour la régulation des gènes HOX a été démontré chez des souris mutantes dont le gène MLL avait été entièrement inactivé ou bien possédant la protéine MLL tronquée [92-94]. L'inactivation totale du gène entraîne en effet le décès *in utero* des embryons homozygotes. La mutation partielle de MLL chez des souris entraîne quant à elle un défaut de l'hématopoïèse avec une diminution du nombre ainsi que de la capacité de différenciation des CSH fœtales (notamment dans la lignée myéloïde) [94, 95]. Des expériences ont également caractérisé le rôle de MLL dans l'hématopoïèse adulte. En effet, l'utilisation d'un modèle de souris chimériques a montré que les cellules déficientes en MLL n'étaient pas capables de générer des cellules myéloïdes et lymphoïdes adultes [96]. De plus, il a été démontré que la protéine MLL n'est pas nécessaire pour activer la transcription de certains gènes HOX, mais qu'elle est nécessaire pour le maintien de la transcription [97].

Des expériences *in vitro* faites sur des progéniteurs hématopoïétiques de souris dont MLL avait été inactivé ont montré que la protéine MLL est aussi cruciale pour le développement hématopoïétique [84, 94, 98]. MLL est également requis durant l'embryogenèse pour la spécification ou l'expansion des CSH [96]. Du fait que les gènes HOX jouent un rôle clé dans la régulation du développement hématopoïétique, la dysfonction hématopoïétique des cellules déficientes pour MLL est susceptible d'être attribuée à la dérégulation des gènes HOX dans les cellules hématopoïétiques souches ou progénitrices. Il existe donc un lien fort entre le gène MLL, la régulation des gènes HOX et l'hématopoïèse [99].

La protéine MLL possède plusieurs domaines fonctionnels lui conférant une activité importante (figure 8). Parmi ces domaines, trois motifs courts, appelés boucles AT (AT hooks) ainsi que le domaine CxxC, ont une activité de liaison à l'ADN permettant la régulation de la transcription de gènes grâce à une liaison directe à l'ADN. Les boucles AT, qui présentent la séquence homologue des protéines HMG-1 (high-mobility group 1), vont lier les régions riches en adénine et thymine (AT-rich) situées au niveau du petit sillon de l'ADN [100, 101]. La région CxxC riche en cystéine (cystein-rich CxxC region) représente la séquence homologue de deux protéines impliquées dans la régulation épigénétique de la transcription via la méthylation : DMT (DNA méthyl transférase) et MBD1 (methyl binding domain protein 1) [102, 103]. Comme la DMT, le domaine CxxC possède une activité de liaison à l'ADN sur les îlots CpG non méthylés contrairement à MBD1 qui lie les séquences CpG méthylées [104]. La protéine MLL est aussi connue pour son activité de répression de la transcription en recrutant des complexes répresseurs tels que HDAC (histone déacétylase) ou des protéines du complexe polycomb [105].

Positionnées entre les boucles AT et le domaine CxxC, deux courtes séquences sont présentes : SNL1 et SNL2 (speckled nuclear localization). Elles vont servir de guide à la protéine pour sa localisation nucléaire. La protéine MLL possède également un domaine PHD (domaine en doigt de zinc) qui possède un rôle régulateur de la chromatine et permet

la fixation de MLL au niveau de la lysine 4 de l'histone 3. Un domaine d'activation de la transcription (TAD) est aussi présent et va lier directement des co-activateurs tels que CPB qui va à son tour se lier au facteur CREB phosphorylé pour induire l'acétylation des histones 3 et 4 (H3 et H4) et promouvoir la transcription des gènes. Le domaine SET, en C-terminal, va quant à lui avoir une activité histone méthyltransférase H3K4 en méthylant le résidu lysine 4 de l'histone 3. Cela va agir sur la structure de la chromatine et sur la régulation transcriptionnelle des gènes HOX [99, 106].

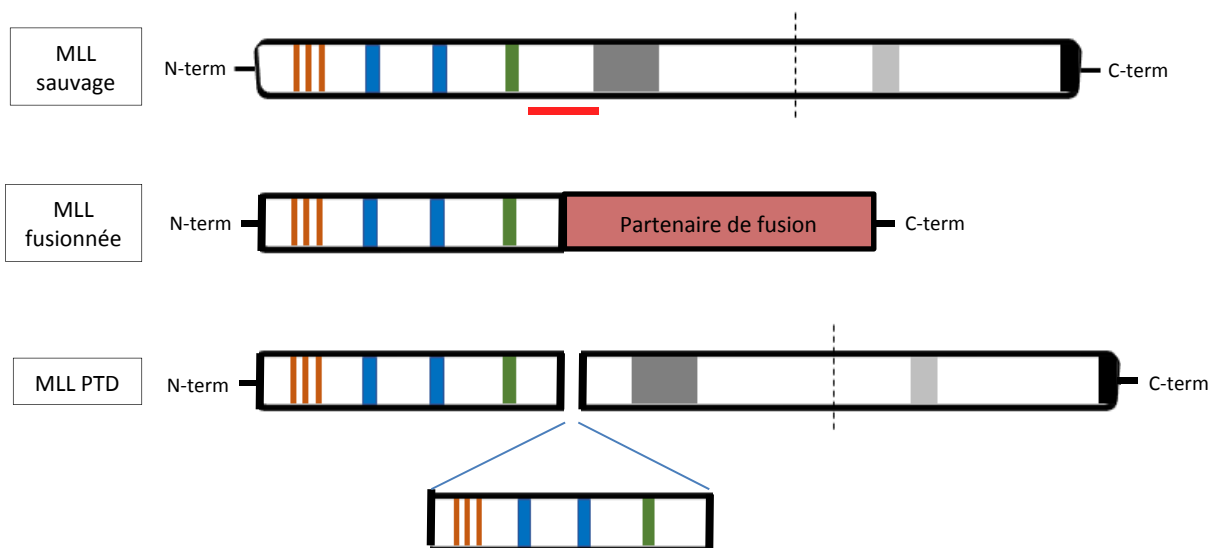
La protéine est produite sous forme entière mais se retrouve rapidement clivée par la taspase-1. Deux fragments vont être produit : MLL-C, protéine de 180 kDa et MLL-N, protéine de plus grande taille, de 320 kDa [107].

Lors de la translocation et de la formation de gènes de fusion MLL, les protéines de fusion ainsi formées retiennent toujours les boucles AT, les motifs SNL 1 et 2 et le domaine CxxC. Inversement, le domaine PHD, le domaine de transactivation (TAD) et le domaine SET des protéines MLL sont remplacés par la séquence de la protéine partenaire.

## **b) Les réarrangements chromosomiques impliquant MLL**

### *i. Les différents types de réarrangements impliquant MLL*

Les réarrangements du gène MLL sont retrouvés dans environ 5% des LMA et 22% des LLA [108]. Plusieurs types de réarrangement ont été identifiés. Les translocations, les duplications en tandem ou les amplifications sont des réarrangements chromosomiques récurrents. Le PTD (partial tandem duplication) est un autre type de réarrangement présent dans les leucémies MLL et qui résulte de la duplication d'une région génomique qui va être insérée au niveau du site de cassure du gène MLL (figure 9). Le réarrangement PTD est fréquemment rencontré dans les cas de LMA adultes, en association avec la trisomie 11 [109]. Parmi tous ces réarrangements, les translocations sont les plus fréquentes (environ 60%).



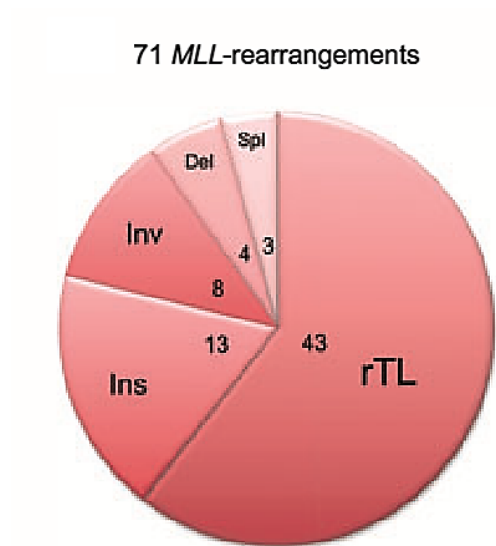
**Figure 9 : Les différents types de réarrangements de la protéine MLL**

Lors d'une translocation MLL, la partie N-terminale de la protéine va être fusionnée à une protéine partenaire alors que la partie C-terminale sera remplacée par la protéine de fusion, formant une nouvelle protéine chimère. Dans certains cas, la protéine MLL peut subir une duplication partielle en tandem (PTD) et la partie dupliquée sera insérée au niveau de la région de cassure (trait rouge). Le trait discontinu représente le site de clivage normal de la protéine.

## *ii. Les translocations MLL*

Les translocations sont les réarrangements les plus courants parmi ceux impliquant MLL (Figure 10) [110]. Elles sont généralement responsables de leucémies aigües agressives. Les translocations impliquant MLL sont également présentes dans près d'un tiers des leucémies secondaires [111].





**Figure 10 : Distribution des différents réarrangements de MLL**

Parmi les 71 réarrangements MLL répertoriés, la majorité implique une translocation chromosomale réciproque (rTL). On retrouve également des insertions (Ins), des inversions (Inv) et des délétions (Del). *Tiré de : Marschalek, R., Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins. Br J Haematol, 2011. 152(2): p. 141-54.*

Toutes les translocations 11q23 agissent de la même façon : la portion 3' du gène est supprimée et la portion 5' va alors fusionner avec un autre gène, conduisant à l'expression d'une protéine chimérique. Ce sont seulement les 1400 premiers acides aminés de la protéine MLL qui vont être retenus dans la protéine chimérique. Le domaine SET, en 3' du gène, et qui joue un rôle majeur dans la fonction de la protéine MLL (méthylation H3K4), sera perdu lors de la translocation.

## 4. Les leucémies MLL

Les leucémies MLL représentent 8 à 10% de tous les cas de leucémies aiguës. La séquence du gène MLL a pu être définie dans les années 1990. Plusieurs années après, des modèles de leucémies murines et humaines utilisant entre autres les techniques de transferts de gènes *via* les rétrovirus ont été établis. Depuis, les progrès importants des techniques telles que les puces à ADN ou le séquençage à haut débit ont fourni une meilleure compréhension du processus leucémogénique causé par les réarrangements MLL. Comme son nom le suggère, les réarrangements de MLL peuvent être retrouvés aussi bien dans des leucémies myéloïdes, lymphoïdes ou mixtes.

### a) Les gènes de fusion MLL dans les leucémies aiguës

Aujourd'hui, plus de 70 gènes de fusion ont été caractérisés. Les partenaires de fusions de MLL peuvent être classés en 2 catégories, selon leur localisation : les partenaires cytoplasmiques, qui ont généralement un rôle au niveau de la signalisation, et les partenaires nucléaires, qui sont impliqués dans plusieurs aspects de la régulation transcriptionnelle (table 1) [99, 106].

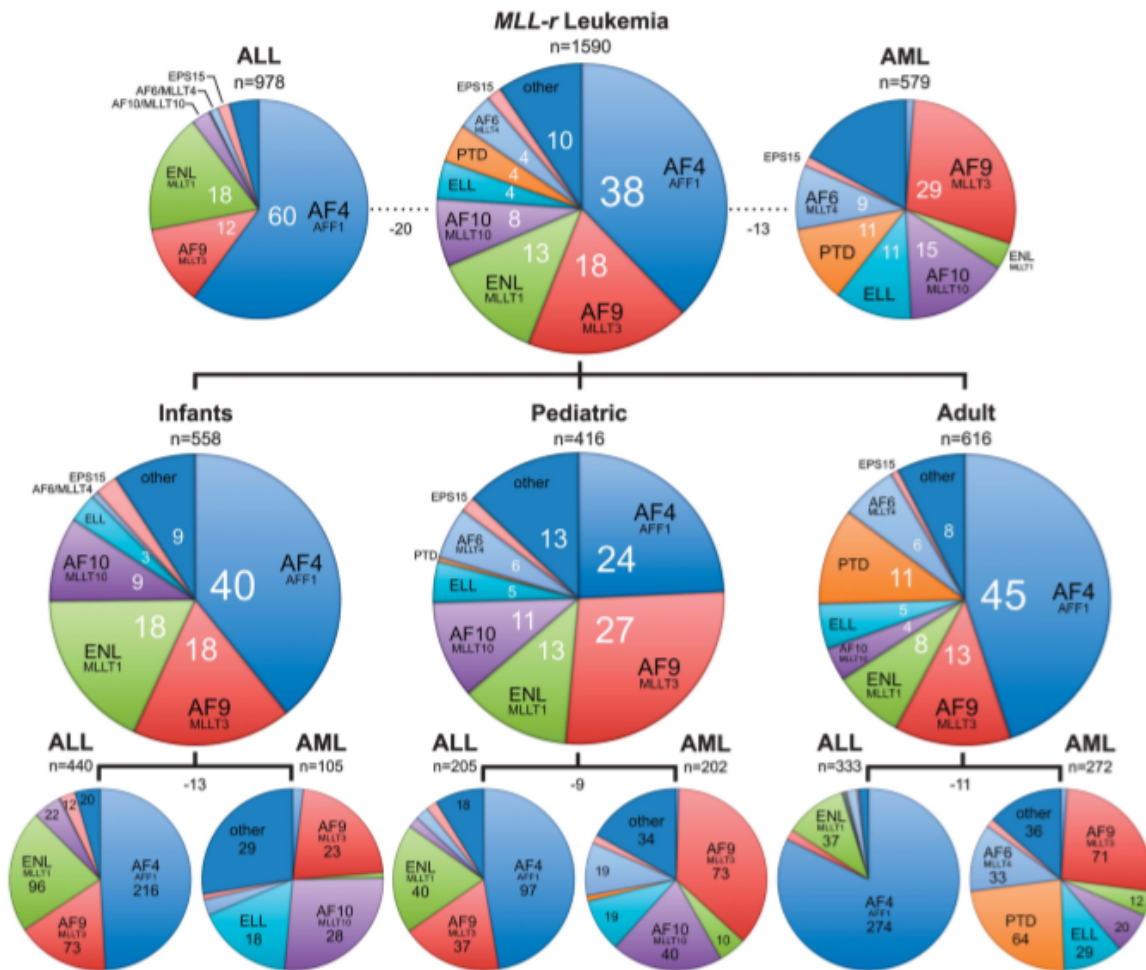
**Tableau 1 : Les partenaires de fusion de MLL : localisation et fonctions**

Tiré de : Li, Z., D. Liu, and C. Liang, *New insight into the molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. Leukemia*, 2005. 19(2): p. 183-190.

Gene	Chromosome locus	Functions
<i>Nuclear fusion partner</i>		
AF4	4q21	Transcriptional activator
AF9	9p22	Transcriptional factor
AF10	10p12	Transcriptional factor
ELL	19p13.1	RNA polymerase II transcription elongation factor
ENL	19p13.3	Transcriptional activator
AFX	Xq13	Forkhead transcriptional factor
LAF4	2q11	Transcriptional activator
AF3p21	3p21	Not known
FKHRL1	6q21	Forkhead transcriptional factor
CBP	16p13	Transcriptional coactivator, histone acetylase
P300	22q13	Transcriptional coactivator, histone acetylase
AF17	17q21	Transcriptional factor, upregulated by $\beta$ -catenin
<i>Cytoplasmic fusion partner</i>		
AF6	6q27	Maintenance of cell-cell junctions and cell polarity
Septin 6	Xq22	Septin family
ABI1	10p11.2	Regulation of endocytosis, cell motility
LARG	11q23.3	Activation of Rho GTPases
GAS7	17p13	Actin assembly/crosslinking of actin filaments
EEN	19p13.3	Regulation of endocytosis
FBP17	9q34	Not known
GMPS	3q25	Guanosine monophosphate synthetase
GRAF	5q31	Negative regulator of RhoA
AF9q34	9q34	Ras GTPase-activating protein
GPHN	14q24	Gly and GABA receptors assembly
CBL	11q23.3	Negative regulator of receptor tyrosine kinases
LASP1	17q21	Not known

Parmi les réarrangements MLL, 6 fusions sont prédominantes (figure 11). Ces fusions représentent à elles seules plus de 80% des réarrangements MLL. On retrouve :

- MLL-AF4, t(4;11)
- MLL-AF9, t(9;11)
- MLL-ENL, t(11;19)
- MLL-ELL, t(11;19)
- MLL-AF6, t(6;11)
- MLL-AF10, t(10;11)



**Figure 11 : Classification des leucémies MLL en fonction de l'âge des patients et du phénotype leucémique**

Parmi les 1590 leucémies MLL répertoriées, une classification a été faite en fonction de l'âge des patients ('Infants' : 0-1an / 'Pediatric' : 1-18ans / 'Adult' : >18ans) ainsi que du phénotype leucémique ('AML' : Acute Myeloid Leukemia / 'ALL' : Acute Lymphocytic Leukemia'). *Tiré de : Meyer, C., et al., The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. Leukemia, 2013. 27(11): p. 2165-76.*

Selon le type phénotype leucémique, certaines fusions sont plus prédominantes. Par exemple, pour les LLA, les translocations les plus courantes sont MLL-AF4, MLL-ENL, MLL-AF9, MLL-AF10, MLL-AF6 et MLL-EPS15. Ces six réarrangements MLL représentent près de 94% des LLA diagnostiquées. Concernant les LMA, le spectre est plus large, mais neuf translocations sont récurrentes et représentent environ 80% des LMA. On y trouve : MLL-AF9, MLL-ENL, MLL-AF10, MLL-ELL, MLL-AF6.

## b) L'origine prénatale des leucémies

Aujourd'hui, de nombreuses évidences suggèrent une origine prénatale de la majorité des leucémies infantiles (chez les < 1an). Les leucémies infantiles, qui sont majoritairement des LLA-B, sont associées à un mauvais pronostic et surtout un temps de latence très court [67]. L'acquisition d'altérations chromosomiques et génétiques *in utero* durant l'hématopoïèse fœtale serait donc probable étant donnée la nature et la rapidité de développement de la maladie. Ces réarrangements chromosomiques semblent nécessaires et suffisants et correspondraient à un premier évènement prénatal responsable de la formation d'un clone pré-leucémique. Dans le cadre d'un réarrangement MLL, la fusion MLL aurait un puissant effet de dérégulation de l'expression génique. Cet effet peut être obtenu par une perturbation de la transcription de gènes, ou encore par la dérégulation d'une ou plusieurs voies de signalisation dans les cellules. Une autre alternative plausible est qu'une fois formée, la protéine de fusion MLL favorise l'accumulation changements génétiques supplémentaire via, par exemple, l'expansion clonale très rapide, l'instabilité génétique, ou encore l'inhibition des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Tout ceci entraînerait alors l'apparition de la maladie clinique.

Plusieurs études qui portent sur les jumeaux monozygotes rapportent la concordance de la leucémie entre les jumeaux [65-67]. Le premier cas a été décrit en 1882 dans la littérature allemande. Des évidences suggèrent également une origine clonale de la leucémie chez ces jumeaux identiques. Cette idée a été suggérée des années auparavant, lorsqu'en 1962, Wolman suggéra une origine *in utero* de la leucémie chez l'un des 2 jumeaux, et que celle-ci serait transmise *via* la vascularisation qui est commune aux jumeaux [112, 113]. La leucémie se développerait donc suite à une anomalie génétique acquise chez l'un des 2 jumeaux. Le clone leucémique serait alors partagé à l'autre jumeau par la circulation, d'où l'origine clonale unique retrouvée. D'autres évidences sont venues appuyer cette hypothèse comme le fait que le point de cassure à l'origine des gènes de fusion a lieu dans des régions introniques appelées BCR (Breakpoint Cluster Regions), et que ces points de cassures sont en effet identiques dans les cellules leucémiques des jumeaux monozygotes [114]. Ces séquences représentent des marqueurs de clonalité spécifiques et permettent d'appuyer l'hypothèse de l'origine monoclonale prénatale des leucémies.

Plusieurs études ont comparé les séquences de fusion des blastes de jumeaux monozygotes. Ainsi, 19 paires de jumeaux monozygotes concordant pour la leucémie ont été analysées. La même séquence de fusion a été retrouvée pour chaque paire de jumeaux, ce qui a permis d'établir l'origine prénatale chez ces jumeaux monozygotes [115-117].

Aujourd'hui plus de 70 cas de jumeaux monozygotes concordants pour la leucémie ont été rapportés, dont la moitié sont des leucémies infantiles (0-1an). Le taux de concordance des leucémies aiguës pédiatriques varie entre 5% et 25% entre la naissance et 15 ans, avec un

taux plus élevé chez les nourrissons [66]. En effet, chez les nourrissons le taux de concordance varie entre 60% et 100%, et la leucémie est cliniquement détectable chez les 2 enfants à seulement quelques semaines d'intervalles. Au contraire, moins de 1% des leucémies aiguës sont concordantes chez les adultes. Concernant les gènes de fusion MLL, l'initiation de la leucémogénèse par le gène de fusion MLL-AF4 semble être étroitement associée à une transition rapide vers la maladie. En effet, c'est la translocation la plus fréquente observée chez les nourrissons et qui est à l'origine de LLA-B.

Ensemble, ces études indiquent l'existence d'une origine prénatale de la leucémie infantile où les premiers événements génétiques ont lieu *in utero* et permettent de définir la monoclonalité.

## 5. Modèles *in vivo* de leucémies MLL

Afin de mieux comprendre les leucémies MLL, des modèles expérimentaux ont été développés. Dans un premier temps, le développement de modèles de souris hétérozygotes (Mll+/-) et de souris déficientes pour MLL (Mll-/-) a permis de mettre en évidence le rôle de MLL dans l'hématopoïèse, dans le développement du squelette axial ainsi que dans l'expression des gènes Hox [86, 92, 96]. Par la suite, des modèles de leucémies MLL ont été générés. Un des 1<sup>ers</sup> modèles de leucémie MLL consistait à surexprimer MLL-AF9 dans la souris. Pour cela, un knock-in a été élaboré. La séquence du gène partenaire AF9 a été intégrée dans un des allèles MLL endogènes *via* la recombinaison homologue, au niveau des CSE [118]. Les souris ont alors développé des LMA comparables à celles observées chez les patients présentant une translocation MLL-AF9. Des modèles semblables ont été développés avec MLL-AF4 et MLL-PTD [119, 120]. Cependant, bien que ces modèles permettent de reproduire de façon assez fidèle ce que l'on observe chez l'homme, ils sont limités par le fait que la surexpression de certains allèles tel que MLL-CBP (CREB-binding protein) entraîne la mort des embryons [121]. Afin d'améliorer le modèle de leucémie MLL, une approche de translocation chromosomique permettant de retranscrire ce qui se passe lors des translocations entre MLL et un partenaire de fusion a été mise en place. Pour cela, des sites loxP sont insérés au niveau de la région de cassure de MLL ainsi que des partenaires de fusion. Ainsi, grâce à la recombinaison Cre, la recombinaison entre les deux sites loxP va pouvoir se faire [122]. Aujourd'hui, la transduction rétrovirale (ou lentivirale) de gènes de fusion MLL dans des cellules de la moelle osseuse est couramment utilisée comme modèle de leucémie MLL. Cette approche a permis des progrès significatifs dans la compréhension du processus leucémique et ce grâce à une meilleure compréhension du rôle de la fusion MLL dans la transformation leucémique [123]. Ces études ont généré des informations précieuses concernant les mécanismes

sous-jacents causés par les gènes de fusion MLL. L'utilisation de cette méthode dans des cellules de moelle osseuse de souris a montré qu'il est possible de transformer aussi bien des CSH que des cellules progénitrices plus différenciées. Ces cellules ayant été transformées sont alors capables d'induire des leucémies murines [124].

Cependant, bien que ces modèles murins permettent une meilleure compréhension du processus leucémique, les résultats expérimentaux semblent être biaisés du fait que dans la majorité des cas, les leucémies obtenues présentent un phénotype myéloïde. En effet, les LLA-B semblent difficiles à générer. Chez les patients, les fusions MLL telle que MLL-ENL sont responsables aussi bien de LLA-B que de LMA. Cependant, MLL-ENL est incapable d'induire des LLA-B chez la souris [124]. Une équipe a cependant réussi à générer des LLA-B murines avec MLL-AF4. Mais là encore, seulement 40% des leucémies obtenues présentaient un phénotype lymphoïde, ce qui ne reflète pas parfaitement ce qui se passe chez l'homme où la majorité des leucémies MLL-AF4 sont des LLA de type B.

En utilisant la même stratégie rétrovirale, un modèle de leucémies humaines a été élaboré. En effet, il est possible de transformer des cellules hématopoïétiques primaires humaines en cellules leucémiques capables de générer des leucémies aiguës humaine dans des souris immunodéficientes [125]. Ces modèles *in vivo* de leucémies humaines permettent aujourd'hui de reproduire de façon fidèle le processus leucémique.

## 6. Le séquençage à haut débit

Pendant plus de 30 ans, le séquençage par la méthode Sanger a été utilisé pour lire le code génétique des organismes vivants. La réalisation la plus emblématique de cette approche est sans doute la réalisation du projet phare de la génétique à la fin des années 1990, le décryptage du génome humain. Les dernières générations de séquenceur à capillaire, utilisant la technique Sanger, permettent aujourd'hui de lire jusqu'à 2 millions de base en une demi-journée. Mais au début des années 2000, des machines dotées d'un débit de 50 à 1000 fois supérieur sont apparues sur le marché. Ces séquenceurs de « nouvelle » génération ont permis de s'affranchir d'un certain nombre de biais de la méthode Sanger comme la nécessité de cloner l'ADN à séquencer. C'est grâce notamment à la lecture de plusieurs millions de séquences en parallèle que ces nouveaux séquenceurs à « haut débit » ont pu révolutionner les analyses en génomique. Depuis, la baisse des coûts et la mise à disposition d'appareils automatisés permettent à ces méthodes de devenir incontournables et d'aborder ainsi les études en génomique d'une façon différente.

## a) Principe

Il existe plusieurs appareils permettant le séquençage à haut débit. Trois technologies sont apparues de façon quasi simultanée : le pyroséquençage, le séquençage avec des terminateurs réversibles et le séquençage par ligation. Globalement, leurs technologies sont assez proches et fonctionnent en 3 étapes : la préparation et l'amplification des molécules d'ADN à analyser, l'incorporation des bases complémentaires du brin à analyser, et la lecture de la séquence proprement dite (table 2).

Dans la technique de pyroséquençage (ou séquençage 454), l'ADN va être amplifié par PCR en émulsion (« polymerase chain reaction ») après avoir subi une fragmentation et après avoir été immobilisé sur une bille. La PCR est réalisée en émulsion afin d'effectuer plusieurs millions de réactions indépendante dans un seul tube. Les fragments vont être déposés sur plaque où le diamètre des puits permet l'incorporation d'une seule bille et donc d'un seul fragment d'ADN. Le séquençage par synthèse, base par base, avec émission de lumière, est alors introduit. Cette méthode permet d'obtenir jusqu'à 1 million de séquences pouvant atteindre 600 paires de bases (pb). Les erreurs majeures de séquences proviennent des insertions/délétions dues aux régions homopolymères (répétitions identiques de la même base).

Pour la méthode de séquençage avec terminateurs réversibles (Illumina), l'amplification de l'échantillon à analyser ne s'effectue pas en solution mais sur un support solide. La réaction de séquençage est alors réalisée directement sur le support où l'ADN a été amplifié. L'ADN a préalablement été fractionné de façon aléatoire en fragment de 200 pb puis dénaturé en simple brin. A chaque cycle de séquençage, les 4 bases, associées chacune à un fluorochrome différent, vont être incorporées. Une lecture laser est effectuée à chaque cycle permettant de détecter les bases incorporées. Le clivage des fluorochromes permet ensuite l'incorporation de la base suivante lors du prochain cycle. Cette méthode permet l'acquisition en parallèle de plus de 3 milliards de séquences de 150 pb de long. Chaque position étant lue l'une après l'autre, les erreurs principales de cette technologie sont des erreurs de substitution d'une base par une autre.

La technique de séquençage par ligation (Applied Biosystems) va amplifier, de la même façon que dans la méthode de pyroséquençage, mais cette fois les séquences à amplifier seront fixées à un support solide au lieu d'une plaque. Le séquençage s'effectue ensuite par un système assez complexe de cycles de ligation et de clivage. Cette technique va permettre non seulement la lecture de la séquence mais inclut un système de correction des erreurs d'incorporations. Avec cette méthode, il est possible de lire jusqu'à 1 milliard de séquences en parallèle de 75 pb de long. Le système incorporé de correction d'erreurs associé à l'utilisation de la ligase rend cette technologie très fiable.



**Tableau 2 : Caractéristiques des différentes méthodes de séquençage**



Fournisseur	Roche	Illumina	Applied Biosystem
Technologie	454 GS FLX 454 GS Junior	Genome Analyzer HiSeq MiSeq	SOLiD 550XL
Méthode de séquençage	Pyroséquençage	Termineurs réversibles	Ligation
Méthode d'amplification	PCR en émulsion	PCR « bridge »	PCR en émulsion
Capacité de séquençage / lecture	35 à 700 Mb	8 Gb à 600 Gb	1 Gb à 500 Gb
Taille des lectures	300 à 600 bases	2 x 150 bases	2 x 75 bases
Coût moyen des lectures	3,5 K\$	15 K\$	10 K\$
Durée de séquençage	7h à 15h	6 à 12 jours	~4 jours

### b) Son apport et ses limites

Le champ d'application de ces nouvelles méthodes de séquençage est très vaste. En effet, du moment où il est possible d'obtenir un brin d'ADN, le séquençage à haut débit peut être utilisé. Ces technologies sont capables de couvrir plusieurs technologies employées jusqu'à présent comme les puces à ADN, la PCR quantitative à haut débit ou le séquençage classique de Sanger. Le séquençage *de novo*, c'est-à-dire la capacité à fournir la séquence de génomes inconnus en se substituant à la méthode traditionnelle du séquençage de Sanger, ou bien les analyses fonctionnelles font partie des applications possibles avec le séquençage à haut débit. Les analyses fonctionnelles vont permettre de quantifier le nombre et le type d'éléments biologiques présents. Il est par exemple possible de déterminer quelles quantités et quels types d'ARN s'expriment dans une cellule (RNA-Seq), de détecter les

phénomènes de transcription qui sont utilisés pour la régulation à travers les longs ARN non codants et toute la famille des petits ARN (Small RNA-Seq), de connaître les régions de l'ADN où se fixent les facteurs de transcription (ChIP-Seq) et de déterminer les modifications épigénétiques d'un génome en cartographiant ses sites de méthylation (MeDIP-Seq).

Face à cette escalade technologique et à l'effervescence autour des applications potentielles, il faut considérer le fait que cette technologie, encore jeune, fait face à plusieurs limitations. Les biais techniques sont encore au début de leur caractérisation, de même que la capacité de ces outils à quantifier précisément les événements biologiques complexes (épissage alternatif, site de fixation à l'ADN des facteurs de transcription...). Les quantités de données générées sont énormes, savoir quoi garder et pendant combien de temps est donc essentiel. Des questions importantes se posent également sur le traitement des résultats obtenus. Si par exemple dans le cas des puces à ADN on dispose de plus de 15 ans de recul technologique et de méthodologies statistiques bien déterminées pour corriger les données brutes et obtenir des résultats fiables, ce n'est pas du tout le cas en ce qui concerne les résultats du séquençage à haut débit. Normalisation ou modèle statistique à appliquer ne sont toujours pas déterminés sans ambiguïtés. Finalement, des questions éthiques se posent concernant le séquençage du génome des patients. Tous les aspects éthiques concernant ces outils doivent être envisagés et débattus afin d'offrir une réponse appropriée.

## 7. Objectifs du projet de recherche

Grace au développement de modèles de greffons humains dans des souris immunodéficientes, il est possible aujourd'hui de transformer des cellules hématopoïétiques primaires en cellules leucémiques qui, une fois injectées dans ces souris, vont être capables de développer des leucémies humaines.

Dans un premier temps nous nous sommes demandé si toutes les fusions MLL avaient le même potentiel pour générer des leucémies. En utilisant ce modèle, nous allons transformer des CSH humaines, purifiées à partir de sang de cordon, en cellules leucémiques. Pour cela, 4 gènes de fusion de MLL vont être testés, soit MLL-ENL, MLL-AF9, MLL-ELL et MLL-AF4. L'objectif ici est de tester la capacité de ces 4 gènes de fusion à initier le processus leucémogénique et ainsi les comparer.

Dans un second temps, nous avons voulu voir si, dans un modèle contrôlé, nous pouvions déterminer la collaboration de plusieurs facteurs cruciaux nécessaires à la genèse des leucémies MLL. Le même modèle sera utilisé avec pour seule différence notable : l'utilisation de CSH de sang de cordon unique, c'est-à-dire issues d'un seul donneur. Cela permettra ainsi d'isoler une variable à la fois. De cette façon, nous pourrons évaluer dans un premier temps le rôle du *background* génétique dans le développement de la leucémie. De plus, il sera intéressant d'évaluer le besoin, ou non, d'évènements secondaires, et éventuellement identifier des marqueurs ou des voies spécifiques dans le but d'une thérapie ciblée.

## ***II. Matériel et méthodes***

### **1. Purification des cellules souches et progénitrices issues de sang de cordon par sélection positive**

Le sang de cordon ombilical humain est recueilli immédiatement après l'accouchement, avec le consentement de la mère. Ces échantillons proviennent de l'hôpital de l'Hôtel-Dieu de Lévis ainsi que du CHU de Québec en partenariat avec Héma-Québec, avec approbation du comité d'éthique. Ces échantillons, entre 80 ml et 150 ml par donneur, sont traités dans des conditions stériles et récoltés dans des poches contenant une solution anticoagulante. Une fois recueillis au laboratoire, ces poches (les plus vieilles datant de 72h au maximum) sont mises en communs et traitées toujours en conditions stériles. Un cocktail de pré-enrichissement (5µl/ml) est ajouté (*StemSep Human Progenitor Enrichment Cocktail, Stem Cell Technologies*). Après 10min d'incubation à température pièce (Tp), le sang est dilué dans un volume de PBS (« Phosphate Buffered Saline ») contenant 2% de sérum fœtal de veau (CCS : « Cosmic Calf Serum »), et les différents composants du sang sont séparés par centrifugation 30 min à 1200 RPM (Rotation Per Minute), sans frein, grâce à un gradient de Ficoll.

Les cellules mononuclées sont ensuite récupérées, diluées dans une solution de PBS+2% CCS et centrifugées à nouveau pendant 10 min à 1200 RPM. Le culot est récupéré et resuspendu avec une concentration finale d'environ  $200 \times 10^6$  cellules/ml. Un volume de tampon de lyse RBC (« Red Blood Cell ») est ajouté à la suspension cellulaire. Les cellules sont ensuite incubées 15min à Tp avec l'anticorps anti-CD34 à 10ng/ml (*human CD34+ positive selection kit, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada*). L'anticorps est ensuite couplé à des billes magnétiques (5ng/ml) pendant 10min à Tp. Le tube contenant la suspension cellulaire est alors placé dans une colonne aimantée afin d'attirer les cellules marquées avec l'anticorps anti-CD34. Après 15min d'incubation dans l'aimant et 2 lavages, les cellules fixées sont récupérées, diluées dans du PBS+2%CCS et centrifugées 10min à 1200 RPM. Finalement, le culot est resuspendu dans une solution de MEM- $\alpha$  (« Minimum Essential Medium »), les cellules sont comptées et le pourcentage de cellules CD34+ purifiées est analysé par cytométrie en flux.

## 2. Production d'ADN

Nos différents gènes de fusion MLL sont insérés dans un vecteur d'expression rétroviral MSCV (« Murine Stem Cell Virus »). Ce vecteur contient également la séquence codante pour la protéine fluorescente EGFP (« Enhanced Green Fluorescent Protein ») qui est sous la dépendance du promoteur humain PGK. Aux extrémités du vecteur on retrouve 2 séquences LTR (« Long Terminal Repeat ») qui vont permettre l'intégration de notre ADN d'intérêt dans les cellules hôtes (figure 12). En 5' le LTR contient le promoteur qui permet l'expression du gène de fusion MLL. Le vecteur contient également la séquence codante pour le gène de résistance à l'ampicilline, ce qui nous permet de sélectionner uniquement nos bactéries transformées.



Figure 12 : Schéma du vecteur rétroviral comportant le gène de fusion MLL

L'ADN est produit en grande quantité en vue de la production de particule virale. Pour cela, on introduit notre vecteur, par la méthode de choc thermique, dans une souche de bactéries compétentes d'*E. Coli*, les DH5- $\alpha$ . La solution est ensuite étalée sur une gélose LB (« Luria Broth ») contenant de l'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et incubée toute la nuit à 37°C. Le lendemain, les colonies sont repiquées dans un milieu LB contenant toujours de l'ampicilline. Dans un premier temps, les colonies sont déposées dans un volume de 3ml, et après 60min à 37°C, la solution est transférée dans un volume de 500ml final, le tout placé à 37°C toute la nuit. L'ADN est finalement extrait avec le kit *QIAGEN Plasmid Maxi Kit*, selon le protocole décrit par le fabricant.

Tout au long de ce projet de recherche, nous nous sommes concentrés spécifiquement sur 4 gènes de fusion MLL : MLL-AF9, MLL-ENL, MLL-ELL et MLL-AF4 [125]. La production de ces différents vecteurs est réalisée de façon identique.

## 3. Production des rétrovirus et titration

Les rétrovirus sont produits dans la lignée cellulaire 293T, par la méthode standard de transfection au phosphate de calcium. Pour cela, 3 plasmides sont mis en commun et transfectés dans les 293T : notre plasmide MSCV contenant notre gène de fusion d'intérêt, un plasmide VSV-G « Vesicular Stomatitis Virus G glycoprotein » qui code pour les protéines d'enveloppe et qui permet ainsi l'assemblage des particules virales, et un plasmide Psy-env qui contient les gènes Gag et Pol (Gag permettant l'encapsulation de

l'ARN et Pol la transcription inverse). Une fois notre ADN transfecté dans les 293T, les cellules sont laissées à 37°C, dans des pétris contenant une solution d'IMDM (« Iscove's Modified Dulbecco's Medium », HyClone®) contenant 10% de CCS. Après 48h, une première récolte est effectuée. Pour cela, le surnageant est récupéré, filtré et ultra-centrifugé (2h à 22000 RPM) de façon stérile. Une deuxième récolte est faite à 72h, en procédant de la même façon. Les culots obtenus sont resuspendus dans 500µl et congelés à -80°C en vue de leur utilisation ultérieure.

Afin de déterminer le titre viral de nos échantillons de virus obtenus, la lignée cellulaire Hela est utilisée. Un nombre fixe de cellules Hela (environ  $5 \times 10^5$  cellules/puits – plaque de 24 puits) est infecté avec des concentrations croissantes de virus, dans une solution IMDM+10%CCS. Après 48h d'infection, les cellules sont récoltées et l'expression de l'EGFP est analysée par cytométrie en flux afin d'évaluer le pourcentage de cellules Hela transduites par nos rétrovirus, et ainsi déterminer le titre viral de nos échantillons.

#### **4. Infections des cellules CD34+ purifiées par les rétrovirus**

Avant de commencer les infections, les cellules CD34+ purifiées sont déposées dans une plaque 12 puits à une concentration d'environ  $1 \times 10^6$  cellules/puits. De la rétronectine est préalablement étalée au fond des puits (1 mg/ml) et ces puits sont recouverts de PBS pendant environ 8h à Tp. La rétronectine promeut l'adhérence des progéniteurs hématopoïétiques et adsorbe les particules rétrovirales, augmentant ainsi l'efficacité de la transduction. Les cellules sont incubées une nuit à 37°C dans 1ml de milieu GT (« Gene Transfer Media ») composé de X-Vivo 10 (BioWhittaker®), 1% de BSA (« Bovine Serum Albumin », Roche®) et 1% et de L-Glutamine (Gibco®) à 2mM. Un cocktail de cytokines recombinantes humaines (5µl/ml) ainsi que la molécule UM729 (1µg/ml) [126] sont également ajoutés dans le milieu d'infection. Le cocktail de cytokines contient du SCF (100 ng/ml), FLT3-L (100 ng/ml), G-CSF (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml) et TPO (15 ng/ml). Le lendemain matin, les cellules sont infectées avec 500µl de notre production virale (le titre viral doit être  $\geq 5 \times 10^6$  particules virales/ml) et le volume complété à 1ml avec une solution GT. Les cellules sont alors incubées 6h à 8h, à 37°C. En fin de journée, le milieu est remplacé par du milieu frais et les cellules sont remises à 37°C toute la nuit. De la même façon, 3 autres infections sont réalisées au cours des 3 jours suivants. Une fois les 4 infections réalisées, les cellules sont récoltées, lavées, et resuspendues dans une solution de PBS, prêtes à être injectées dans la souris.

Afin de savoir le pourcentage de transfert de gènes, l'expression de l'EGFP sera analysée par cytométrie en flux, nous permettant ainsi de déterminer le pourcentage de cellules transduites.

## 5. Le modèle murin xénogénique

Les souris sont un très bon modèle d'étude de laboratoire, notamment grâce à leurs similitudes avec l'humain. En effet plus de 99% des gènes de la souris ont leurs homologues chez l'humain [127]. Dès les années 80, des modèles de souris immunodéficientes capables de supporter un greffon humain ont été développés. Depuis, plusieurs croisements entre différentes lignées de souris possédant différentes mutations ont été faits en vue d'optimiser l'utilisation du modèle. Ainsi, l'humanisation des modèles murins permet d'étudier le développement de maladies, les interactions cellulaires, ou encore l'effet de certains médicaments sur des cellules humaines, plutôt que sur des cellules murines qui se comportent différemment de leurs homologues humains.

### a) Les souris NSG

Les souris utilisées au laboratoire sont des souris immunodéficientes NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG). Ces souris possèdent les caractéristiques des souris NOD/SCID en plus de la déficience pour la chaîne  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2. Elles proviennent initialement du laboratoire Jackson.

Concernant les souris NOD (« Non Obese Diabetic »), elles se caractérisent par une déficience fonctionnelle des cellules NK (« Natural Killer »), une absence des molécules du complément, des macrophages défectueux et un déficit de sécrétion d'IL-1, entraînant un défaut dans la fonction et la différenciation des cellules présentatrices d'antigènes [128, 129].

Pour ce qui est des souris *Scid* (« Severe Combined Immune Deficiency »), les caractéristiques principales sont l'absence de fonctionnalité des cellules NK, des lymphocytes T et B ainsi que du système du complément [130].

Les souris NOD/*Scid* possèdent donc des déficiences de l'immunité innée, ainsi qu'une fonction des NK amoindrie et des macrophages défectueux, ce qui permet une bonne efficacité dans la prise de greffe [130]. Ce modèle a cependant tendance à développer spontanément des tumeurs, notamment des lymphomes thymiques, ce qui réduit considérablement leur espérance de vie [131].

Le modèle NSG possède en plus la déficience pour la chaîne  $\gamma$  du récepteur de l'IL-2, ce qui se caractérise par un arrêt de la différenciation des cellules NK et des lymphocytes T à un stade primitif et une absence de signalisation via les cytokines de la chaîne  $\gamma$  [132]. Cela représente une nette amélioration par rapport aux modèles précédents. Pour résumer, ce modèle de souris NSG est dépourvu en cellules NK matures en plus de la déficience en lymphocytes B et T. Cela permet une bonne prise de greffe des cellules humaines injectées.

De plus, ces souris sont résistantes au développement de lymphomes et peuvent donc survivre à plus long terme, même après une irradiation sublétales [131]. C'est le modèle des souris humanisées qui est le plus utilisé actuellement.

### **b) Irradiation sublétales des souris et injection intra-fémorale**

Les souris NSG utilisées pour les protocoles ont entre 8 et 10 semaines. Elles sont soumises à une irradiation sublétales de 200cGy, 24h avant la transplantation de cellules humaines. L'irradiation a pour but d'éliminer le système immunitaire résiduel de l'hôte et donc favoriser la prise de greffe [133].

Les cellules sont ensuite injectées en intra-fémorale, en prenant soin de désinfecter la zone ciblée. Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane tout le long de la procédure. L'injection intra-fémorale est préférée à celle en intraveineuse car pour favoriser la prise de greffe, la domiciliation et la rétention des cellules hématopoïétiques souches et progénitrices humaines dans la moelle osseuse sont nécessaires. La prise de greffe va donc conduire à la repopulation de la moelle osseuse et à la reconstitution complète du système immunitaire.

Les souris sont mises sous antibiotiques durant un mois post injection. Pour cela, une solution de liquamycine est mélangée à l'eau, à une concentration de 0,066ml/200ml d'eau. Les souris sont ensuite surveillées pendant 20 à 22 semaines.

### **c) Analyses**

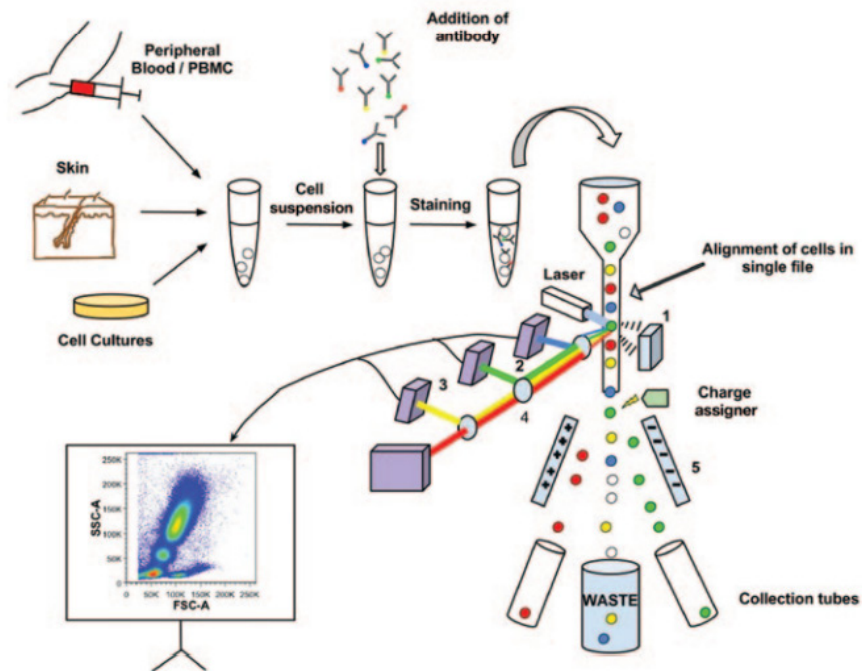
Les souris sont suivies tout au long du développement de la maladie et sont analysées dès qu'apparaissent des signes cliniques de la maladie, qui se manifeste notamment par un amaigrissement, un pelage désordonné ou encore lorsque la souris devient moins active et s'isole. Si aucun signe clinique n'est observé, les souris sont analysées 20 à 22 semaines post-injection.

Le sang périphérique est récupéré par ponction cardiaque et différents tissus sont prélevés (thymus, foie, rate). Les os du bassin, les tibias et les fémurs sont aussi récupérés afin d'en extraire les cellules de la moelle osseuse. Le thymus et la rate sont pesés et pour extraire les cellules des différents tissus, les organes sont simplement broyés et mis en suspension dans une solution de PBS+5%CCS.



## 6. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'analyser différentes caractéristiques des cellules ou particules issues d'un même échantillon. Les cellules en suspension passent devant un faisceau laser et la lumière émise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer la population selon différents critères (figure 12). Certains appareils permettent également de faire un tri, c'est-à-dire séparer physiquement des sous-populations de cellules selon des critères définis. Les cellules ainsi isolées (purifiées) peuvent alors servir pour d'autres expériences.



**Figure 13 : Représentation schématique du principe de cytométrie en flux**

Adapté de : Richard R. Jahan-Tigh, Caitriona Ryan, Gerlinde Obermoser and Kathryn Schwarzenberger, *Journal of Investigative Dermatology* (2012) 132, e1. doi:10.1038/jid.2012.282

De façon courante, la cytométrie en flux est utilisée pour l'immunophénotypage, l'étude du cycle cellulaire et de l'apoptose, l'analyse de la prolifération cellulaire, l'étude des voies de signalisation, la mesure du niveau d'expression des gènes avec protéines fluorescentes. Dans notre cas, la cytométrie en flux nous permet essentiellement d'identifier

l'immunophénotype des cellules. Nos différents échantillons à analyser sont mis en contact avec des anticorps spécifiques des antigènes que l'on veut observer. Pour cela, les cellules à analyser sont incubées 30min à 4°C (1µl d'anticorps [BD Bioscience] pour environ 500 000 cellules). Ces anticorps sont couplés à un fluorochrome qui, suite à son passage devant le faisceau laser, émet une lumière d'une longueur d'onde précise.

Les analyses de cytométrie en flux sont réalisées sur l'appareil FACS Calibur (BD Bioscience®) et analysées avec le logiciel FlowJo®. Pour nos expériences, les cellules sont marquées avec 3 à 4 anticorps simultanément (donc 3 à 4 fluorochromes). Les différents anticorps utilisés sont les suivants : CD45 APC, CD19 PE, CD19 PerCP-Cy5, CD33 PerCP-Cy5, CD33 APC, CD20 PerCP-Cy5, CD10 APC, HLA-DR PE, CD34 APC, CD34 PerCP-Cy5, IgD PE, IgM PerCP-Cy5, CD117 PerCP-Cy5, CD38 PE, CD14 PE, CD11b PerCP-Cy5, CD235a PE.

## 7. Culture cellulaire

### *a) Culture cellulaire in vitro*

Une partie des cellules CD34+ transduites avec nos rétrovirus est remise en culture, parallèlement à l'injection intra-fémorale dans les souris. On suit alors la courbe de croissance de ces cellules pour savoir comment ces cellules se comportent dépendamment de l'oncogène qu'elles ont intégré. Bien que la croissance *in vitro* ne peut refléter à l'identique ce qui se passe *in vivo*, cela nous permet, lorsque les différences sont marquées, d'avoir une idée de comment nos cellules vont se comporter *in vivo*. De plus, les cellules sont analysées chaque semaine par cytométrie en flux pour suivre l'évolution de l'EGFP (et donc l'évolution des cellules transduites). Pour cela, les cellules sont déposées dans un milieu contenant de l'IMDM +15%CCS à une concentration moyenne de  $4 \times 10^5$  cellules/ml. Un cocktail de cytokines qui contient de l'IL-3 (2 ng/ml) et du SCF (20 ng/ml) est ajouté au milieu. Chaque semaine, les cellules sont comptées afin de suivre leur cinétique de croissance et  $2 \times 10^6$  de cellules sont remises en culture dans du milieu frais.

### *b) Culture cellulaire ex vivo*

Les cellules extraites de la moelle osseuse des souris leucémiques sont, en partie, remises en culture afin de suivre là encore leur cinétique de croissance. Cela nous permet de savoir s'il est possible d'immortaliser ces cellules qui ont été transduites en les maintenant en culture sur un long terme. Pour cela, si les cellules leucémiques ont un phénotype lymphoïde, on les dépose en culture dans une solution qui va maintenir ce phénotype, c'est à dire un milieu contenant du MEM-α avec 20% de FBS (« Fetal Bovine Serum »), 5% de

plasma humain et 1% d'une solution de Pénicilline/Streptomycine à 100mM. Un cocktail de cytokines est ajouté au milieu et il contient de l'IL-3 (10 ng/ml), IL-7 (66 ng/ml), SCF (100 ng/ml), FLT3-L (10 ng/ml). Si les cellules leucémiques ont un phénotype myéloïde, ce sera alors un milieu favorisant le maintien de ce phénotype myéloïde, c'est-à-dire une solution d'IMDM+15%CCS et les cytokines IL-3 (2 ng/ml) et SCF (20 ng/ml).

De la même façon que pour les cultures *in vitro*, les cellules sont passées chaque semaine,  $2 \times 10^6$  de cellules sont remis en culture et la cinétique de croissance est observée.

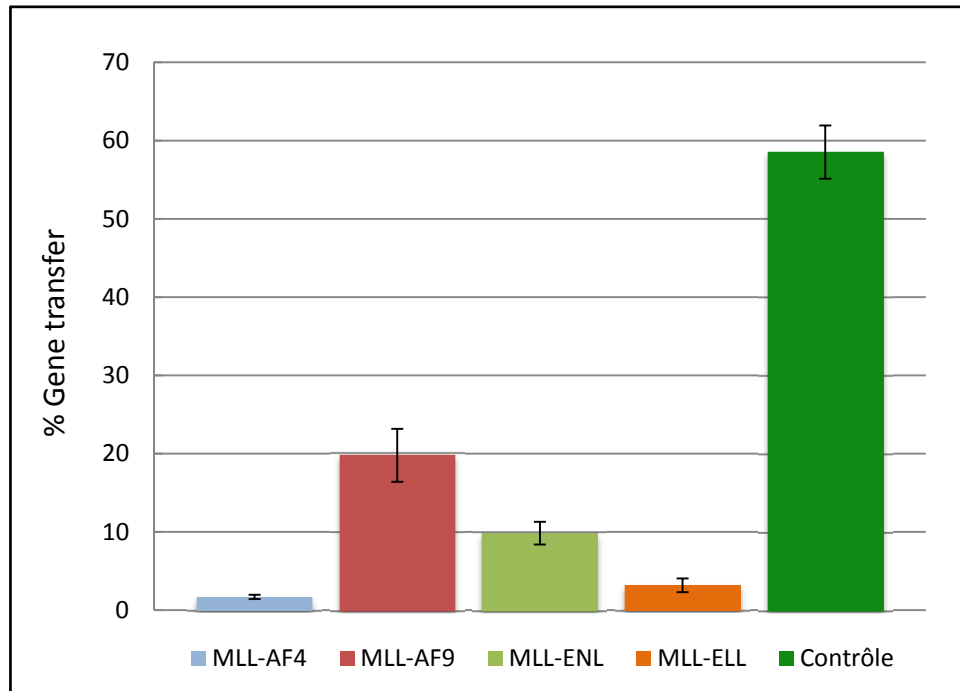
### ***III. Résultats et discussion***

#### **1. Capacité des différentes fusions MLL à induire le processus leucémogénique**

Dans cette partie, le but est de tester la capacité des 4 gènes de fusion MLL, soit MLL-AF9, MLL-ENL, MLL-AF4 et MLL-ELL, d'induire le développement de la maladie. Une fois la leucémie développée, l'intérêt est de pouvoir comparer ces 4 fusions, dans un même contexte, afin d'éventuellement identifier des caractéristiques particulières qui vont dépendre de la fusion. Outre le fait de tester le potentiel leucémique de ces oncogènes, il serait donc intéressant de pouvoir caractériser les leucémies dépendamment des oncogènes ayant permis la transformation leucémique (rapidité, agressivité, différence phénotypique, profil d'expression génique).

##### **a) Variation du taux de transfert de gène selon la fusion**

Afin de transformer nos cellules hématopoïétiques souches et progénitrices CD34+, celles-ci ont été infectées par des rétrovirus. Avant d'injecter ces cellules dans les souris, l'expression de la protéine EGFP est analysée afin de connaître le pourcentage de cellules ayant été transduites (figure 13). En effet, le vecteur possédant la séquence de la protéine fluorescente EGFP dans sa séquence, il est facile de suivre son expression dans nos cellules CD34+. Dépendamment de l'oncogène, on constate que nos virus n'ont pas la même capacité à infecter les cellules. Lorsqu'on regarde nos cellules contrôles, c'est-à-dire qui n'expriment pas de protéine de fusion MLL mais uniquement la protéine EGFP (qui est sous la dépendance du promoteur humain PGK), on peut voir que le taux de transfert de gène est élevé, avec une moyenne de 58.5%. Les cellules ayant été transformées avec les différentes fusions MLL ont des pourcentages de transfert de gène nettement inférieur. Généralement, on observe tout de même un bon taux de transfert avec la fusion MLL-AF9, avec une moyenne de 23.3%. Les cellules infectées avec MLL-ENL présentent également un bon taux de transfert, bien que moins important qu'avec MLL-AF9, avec une moyenne de 13.1%. Pour ce qui est des fusions MLL-AF4 et MLL-ELL, le taux de transfert de gène est plus faible. Il est en moyenne de 3.1% avec MLL-ELL et seulement 1.7% avec MLL-AF4



**Figure 14 : Taux de transfert de gènes en fonction des différentes fusions MLL**

Les cellules CD34+ ont été transduites avec différents vecteurs contenant un gène de fusion MLL ainsi que la séquence codante pour protéine fluorescente EGFP. Afin de connaître l'efficacité de la transduction, le pourcentage d'EGFP est déterminé pour chaque échantillon (MLL-AF4 : n=8 ; MLL-AF9 : n=9 ; MLL-ENL : n=8 ; MLL-ELL : n=8 ; Contrôle : n=7).

### *b) Culture in vitro*

Les cellules CD34+ transduites avec les différentes fusions MLL sont mises en culture. Cela permet de suivre la prolifération et la survie *in vitro* de ces cellules. La figure 14 nous montre la croissance cellulaire cumulative (en log) des différentes fusions MLL en fonction du temps. Lorsque les cellules sont déposées en culture juste après le cycle d'infection, la plupart des cellules présentes n'ont pas été transduites (*cf* pourcentage de transfert de gènes et marquage à l'EGFP). La vitesse de prolifération varie en fonction des expériences, ce qui est sans doute dû aux cellules CD34+ initiales, mais généralement la tendance reste la même. Les cellules vont proliférer rapidement pendant les 30 premiers jours de culture, indépendamment de la fusion. On peut voir une augmentation de 2.5 à 3 logs en moyenne, en seulement 30 jours. À ce stade, on observe généralement un ralentissement de la croissance, sur une période de 7 à 10 jours.

Les cellules contrôles EGFP arrêtent alors de proliférer, se maintiennent quelques jours puis une phase de déclin s'amorce, généralement après 40 jours. Avec les cellules MLL-ENL et MLL-AF9, on observe une reprise de la croissance et une prolifération rapide. Les

cellules prolifèrent jusqu'à 120 jours, avec là encore une augmentation de 2 à 3 log depuis le jour 30. Après environ 120 jours de culture, ces cellules arrêtent de proliférer et meurent rapidement.

Pour les cellules MLL-AF4 et MLL-ELL, après les 30 premiers jours de culture, ces cellules arrêtent elles aussi de proliférer et contrairement aux cellules contrôles EGFP, les cellules vont se maintenir. Elles ne prolifèrent cependant pas de façon abondante comme c'est le cas avec MLL-AF9 par exemple, mais bien que la croissance est ralentie, les cellules survivent pendant encore 30 à 40 jours.

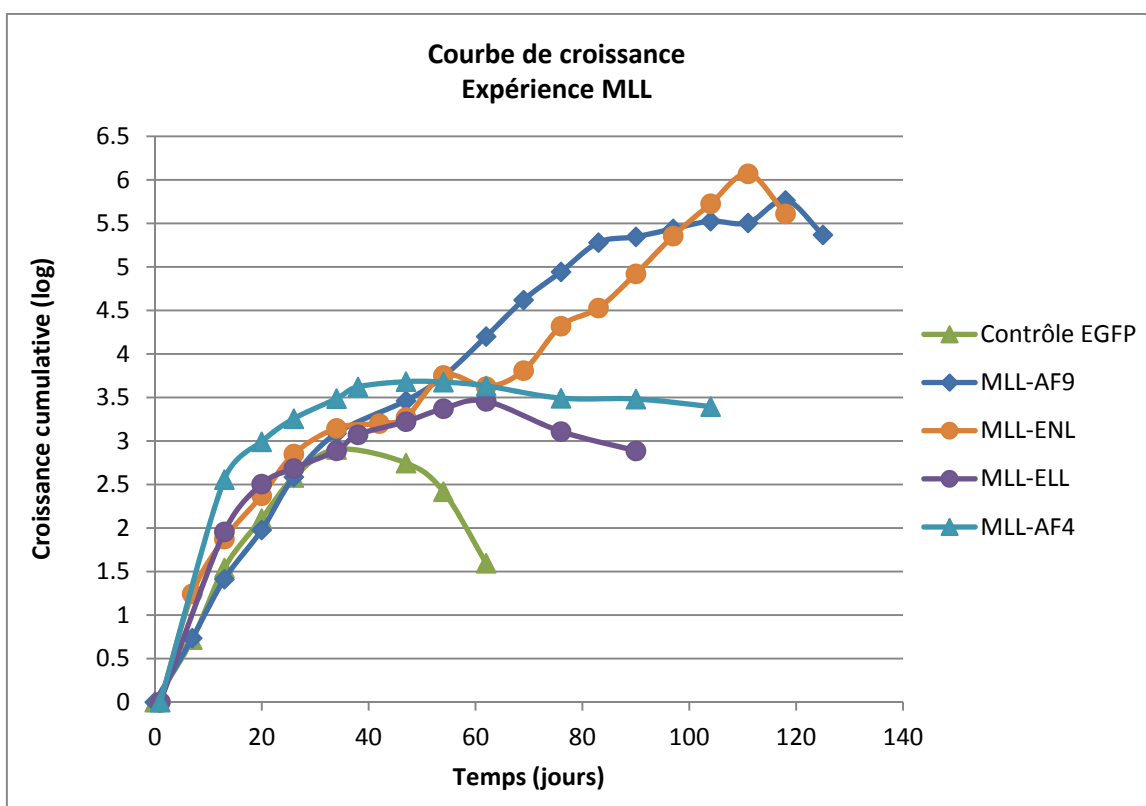


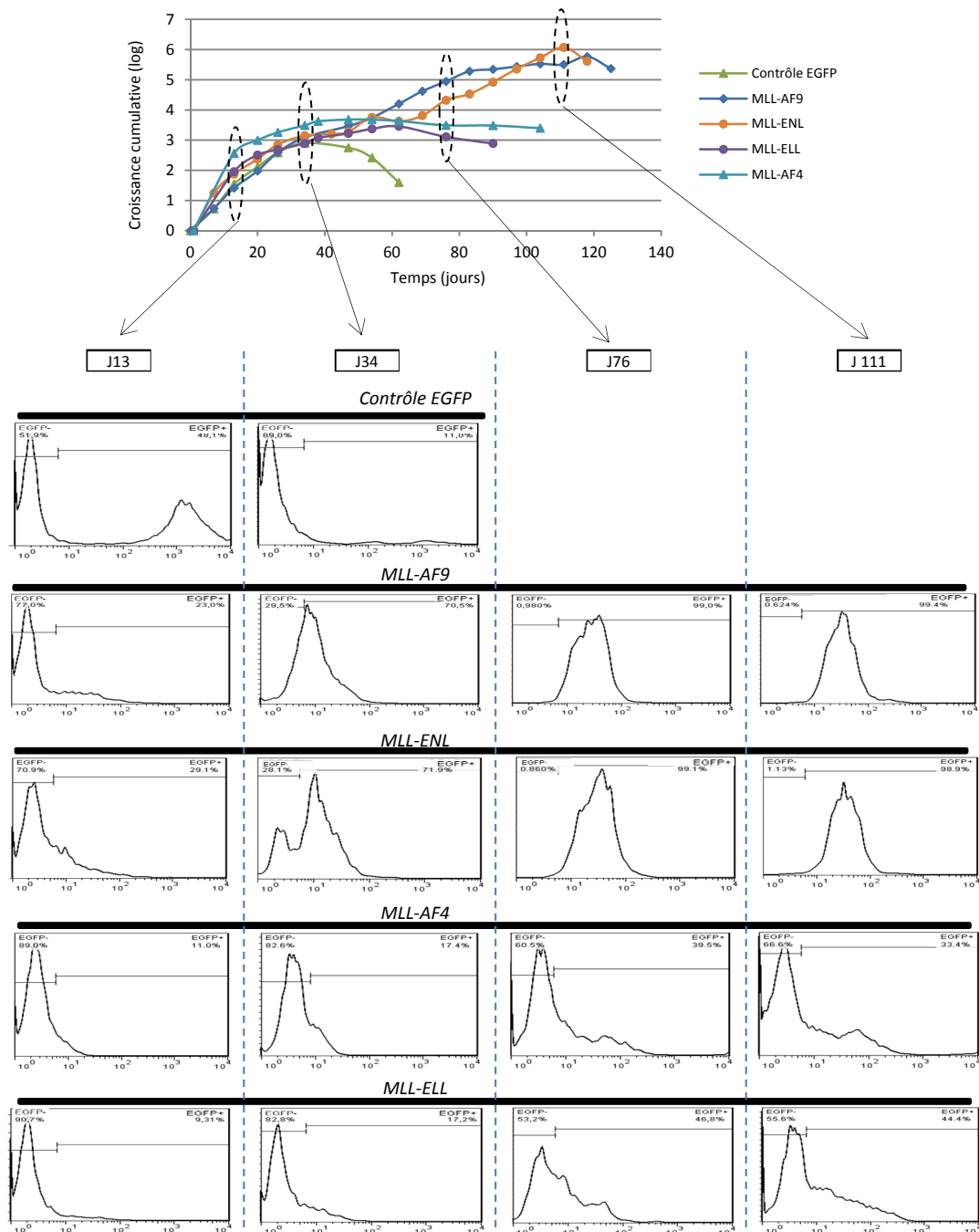
Figure 15 : Courbe de croissance *in vitro* des cellules MLL

Globalement, les cellules transduites avec un gène de fusion MLL possèdent un avantage de survie contrairement aux cellules contrôles. Cependant, cet avantage ne semble pas suffisant aux cellules pour s'immortaliser.

Tout au long de la culture *in vitro*, on suivra l'évolution de l'expression de la protéine fluorescente EGFP qui est le marqueur nous permettant de suivre les cellules ayant été transduites. Comme nous le montre la figure 15, le pourcentage de cellules EGFP varie au

cours du temps et le profil d'expression de l'EGFP n'est pas le même selon les fusions MLL. Généralement, les cellules qui prolifèrent bien en culture vont voir leur pourcentage de cellules EGFP augmenter au cours du temps. Les cellules qui survivent au-delà de 100 jours vont généralement toutes exprimer l'EGFP, c'est le cas pour MLL-AF9 et MLL-ENL qui présentent un pourcentage d'EGFP de près de 100% au jour 76 et au jour 111. Les cellules contrôles vont présenter un ralentissement de leur croissance au fil des jours ce qui se caractérisera par une diminution importante du nombre de cellules. Certaines cellules vont survivre en culture avec un pourcentage de cellules EGFP+ variable. C'est le cas ici des cellules MLL-ELL parmi lesquelles on retrouve, même après 76 jours de culture, près de 50% de cellules qui n'expriment pas l'EGFP.

Ces résultats suggèrent que selon l'oncogène, les cellules transduites vont prendre l'avantage sur les cellules non transduites et ainsi permettre de stimuler la prolifération et améliorer la survie. Dans certain cas, la transformation ne semble pas suffisante pour permettre aux cellules de prendre le dessus et ainsi proliférer abondamment, même si celle-ci permet aux cellules de survivre plus longtemps que les contrôles. En effet, les cellules contrôles perdent rapidement la capacité de proliférer (cf. figure 14), ce qui correspond à la diminution du pourcentage de cellules EGFP positives observées (figure 15). Bien que ces cellules ont été transduites, elles se retrouvent avec aucun avantage de survie par rapport aux cellules non transduites. Les cellules transduites, de même que les cellules souches non transduites, vont rapidement se différencier et mourir.



**Figure 16 : Évolution de l'expression de la protéine EGFP au cours du temps dans les différentes cultures *in vitro***

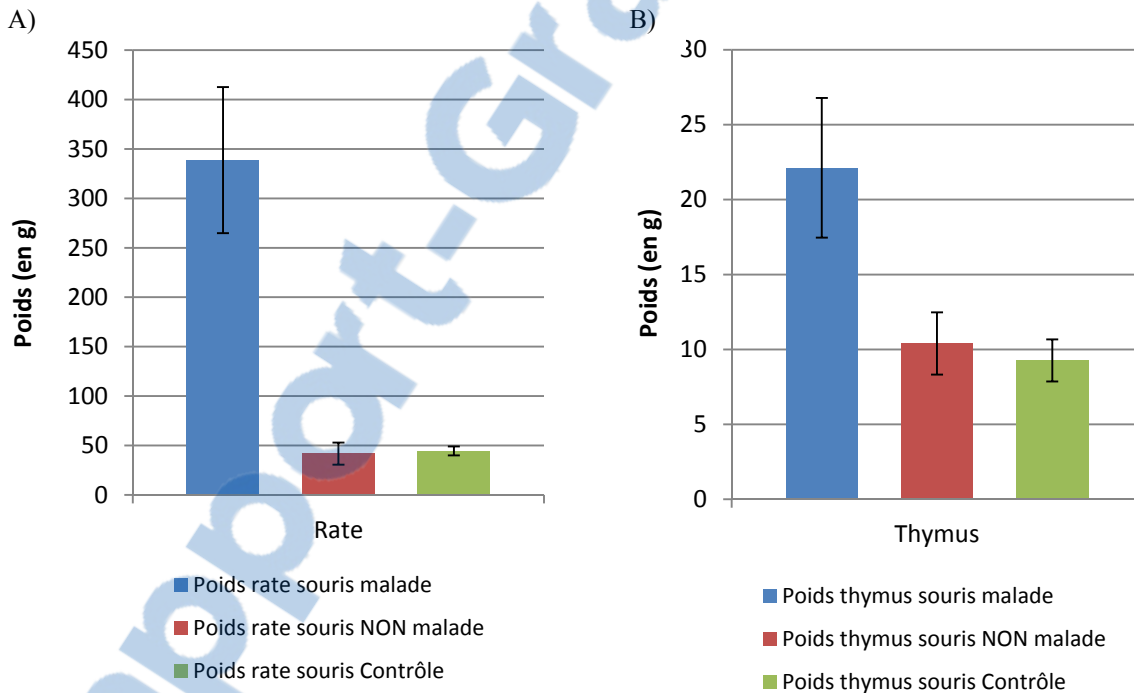
Tout au long de la culture *in vitro* (graphique du haut), le pourcentage de cellules EGFP+ est analysé pour chaque fusion MLL (représenté en dessous). Cela nous permet de suivre l'évolution des cellules ayant été transduites au cours du temps. Dans cette figure, l'analyse de l'expression de l'EGFP est présentée au jour 13, au jour 34, au jour 76 et au jour 111.



### c) Caractérisation des leucémies aiguës humaines générées *in vivo*

#### i. Analyses histologiques

Afin de savoir si nos souris ont développé des leucémies et caractériser celles-ci, les souris sont sacrifiées et le thymus et la rate vont être prélevés et pesés. Ces organes lymphoïdes primaires (le thymus) et secondaire (la rate) jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. Leur analyse permet de savoir si les cellules leucémiques ont d'une part infiltrés ces organes, mais aussi de savoir en quelle proportion ces cellules ont envahi ces tissus. Lorsque les souris développent des symptômes avant 22 semaines post-injection, on observe généralement une splénomégalie ainsi qu'une augmentation de la taille du thymus, ce qui va de pair avec une augmentation du poids de ces organes (figure 16). En effet, le poids du thymus ainsi que celui de la rate des souris malades sont nettement supérieur à celui des souris qui ne sont pas tombés malades. Les souris non malades ont quant à elle un poids de thymus et de rate semblable à celui des souris contrôles.



**Figure 17 : Analyse du poids des rates et des thymus**

Les rates et les thymus des souris analysées sont pesés. On observe une différence notable entre le poids des rates des souris malades ( $n=21$ ) et celui des souris non malades ( $n=12$ ), alors que les rates des souris contrôles ( $n=7$ ) ont un poids semblable à celui des souris non malades (A). La différence est tout aussi notable concernant le poids des thymus où les thymus des souris malades ( $n=21$ ) ont un poids environ 2 fois supérieur à ceux des souris non malades ( $n=12$ ) et contrôles ( $n=7$ ) (B).

## *ii. Prise de greffe et phénotype leucémique*

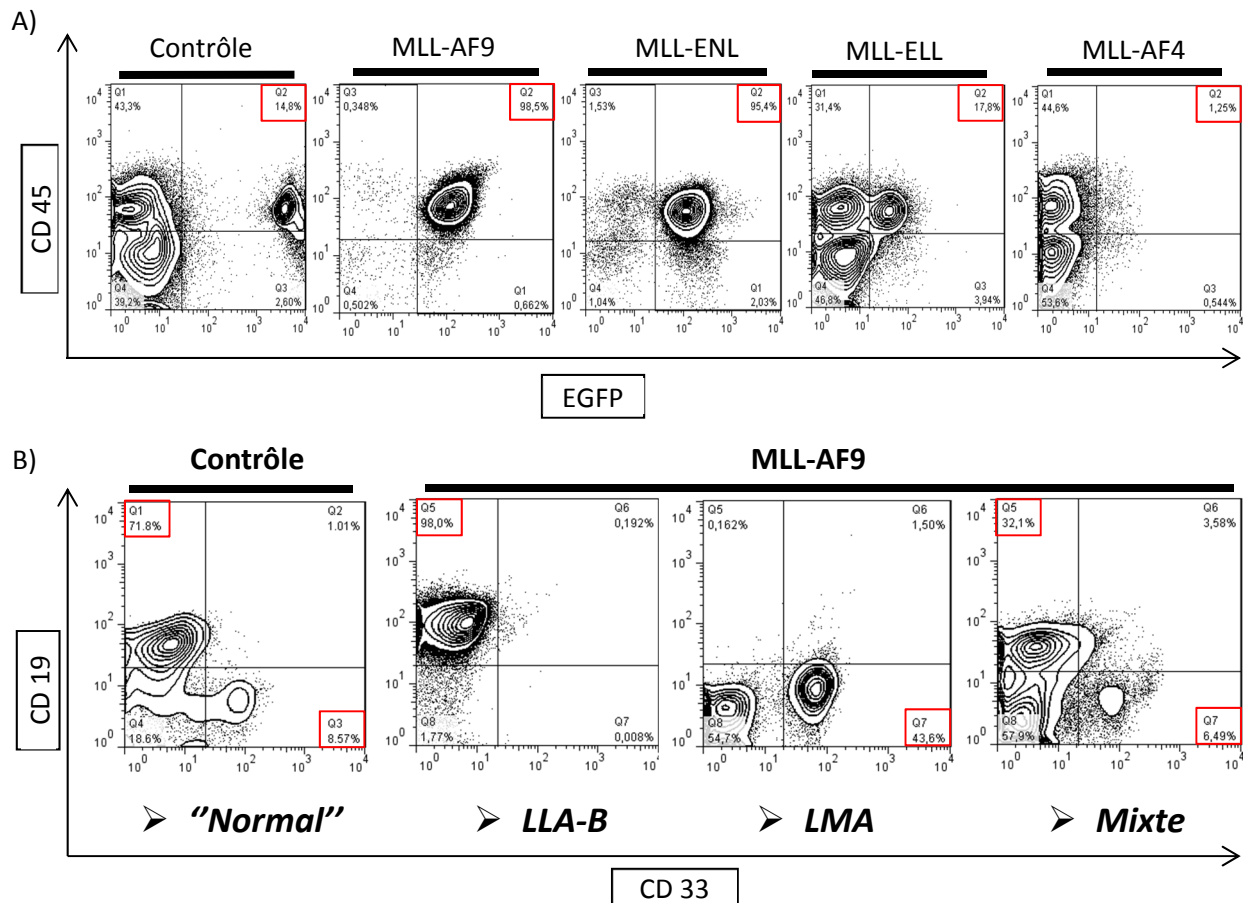
Dans un premier temps, après avoir sacrifié les souris, le but est de savoir s'il y a bien eu une prise de greffe et ainsi quantifier le greffon humain en cytométrie en flux par l'expression du CD45 humain, marqueur des cellules hématopoïétiques, ainsi que l'expression de l'EGFP, dans les cellules de la moelle osseuse. Les cellules exprimant le CD45 représentent donc le greffon humain, qu'elles soient positives ou négatives pour l'EGFP. Lorsque les souris développent une leucémie, les cellules vont être positives pour le CD45 ainsi que l'EGFP. Cette population CD45+/EGFP+ correspond aux cellules humaines, transduites avec l'oncogène d'intérêt et qui ont donc subi une transformation en cellules leucémiques. Au contraire, si on a une population de cellules qui est positive pour le CD45 mais pas pour l'EGFP, elle correspond aux cellules humaines non transduites. On peut également retrouver, parmi nos cellules analysées, une population de cellules CD45-/EGFP-. Ces cellules correspondent alors à des cellules murines.

Les différentes populations sont présentées dans la figure 17-A. On remarque que pour la souris contrôle, 3 populations différentes sont présentes. L'une d'entre elle correspond à des cellules humaines transduites, positives pour le CD45 et l'EGFP (quadrant supérieur droit). Une seconde population correspond aux cellules humaines non transduites, positives pour le CD45 mais négatives pour l'EGFP (quadrant supérieur gauche). Et une dernière population correspond à des cellules murines, qui sont donc négatives pour le CD45 et l'EGFP (quadrant inférieur gauche). Pour les différentes fusions MLL présentées dans cette figure, les populations observées varient. Avec MLL-AF9 et MLL-ENL, la quasi-totalité des cellules analysés sont des cellules humaines leucémiques (CD45+/EGFP+). Avec MLL-ELL, comme pour le contrôle, 3 populations sont visibles. Enfin, avec MLL-AF4, on ne distingue pas de cellules exprimant l'EGFP, ce qui signifie que pour cette souris analysée, bien que la greffe ait fonctionné, aucune leucémie ne s'est développée.

Une fois que l'on a déterminé et quantifié le greffon humain, on va identifier le phénotype leucémique. Pour cela, on va cibler la population de cellules doubles positives (CD45+/EGFP+). C'est sur cette population que les analyses de cytométrie en flux, avec les différents marqueurs étudiés, vont être réalisées par la suite.

Pour définir le phénotype leucémique, on regarde l'expression du CD19 (marqueur de cellules lymphoïdes B) et du CD33 (marqueur de cellules myéloïdes). Un greffon normal d'une souris contrôle présente 2 populations distinctes, l'une CD19+ qui est bien souvent majoritaire, et l'autre CD33+ (figure 17-B, graphique de gauche). Pour les autres souris, les populations présentes vont varier en fonction du phénotype leucémique. Dans la figure 17-B, l'analyse de 3 souris injectées avec le même oncogène (ici MLL-AF9) a révélé 3 phénotypes différents. Dans le graphique de gauche, on peut voir que 98% des cellules expriment uniquement le CD19. On a donc une LLA de type B. Lorsque les cellules

expriment uniquement le CD33, on est dans le cas d'une LMA. C'est ce que l'on voit sur le graphique du centre où environ 43% des cellules analysées sont positives pour le marqueur de surface CD33. Dans le cas d'une leucémie mixte, 2 populations distinctes vont être définies, c'est ce que nous montre le graphique de droite où 32,1% des cellules sont CD19+/CD33- et 6,49% des cellules sont CD33+/CD19-. Ainsi, dans ce cas, les mêmes cellules initiales transformées avec MLL-AF9 ont donné 3 phénotypes leucémiques distincts.



**Figure 18 : Analyses par cytométrie en flux de cellules de moelle osseuse**

Dans un premier temps, le greffon humain est quantifié grâce au marqueur CD45 (A), et les cellules exprimant spécifiquement l'EGFP et le CD45 sont sélectionnées. Le phénotype leucémique est caractérisé à partir de cette population double positive. Pour cela, les marqueurs CD19 (caractéristique des leucémies lymphoïdes B) et CD33 (caractéristique des leucémies myéloïdes) comme c'est le cas ici de 3 souris MLL-AF9 et d'une souris contrôle (B).

De cette façon on peut ainsi déterminer pour chacune des souris analysées si, dans un premier temps, il y a présence d'un greffon humain et le quantifier et, dans un second temps, caractériser le phénotype leucémique (Tableau 3).

Concernant les souris contrôles, on peut voir que sur les 26 souris injectées, 13 d'entre elles avaient un pourcentage de cellules humaines présentes dans leur moelle (on parle de greffon humain) variant entre 1% et 20%. Parmi ces 13 souris possédant un greffon humain, des cellules exprimant l'EGFP étaient détectées pour 7 d'entre elles. On parle de phénotype « normal » pour ces souris.

Pour les 58 souris injectées avec MLL-AF9, 51 d'entre elles présentaient un greffon humain généralement supérieur à 50%. Non seulement la greffe fonctionne bien avec MLL-AF9, mais dans la majorité des cas, ces souris développent aussi des leucémies. En effet, 46 de ces 51 souris ont développé des leucémies. Dans près de 60% des cas, les leucémies développées étaient des LLA-B. On retrouve également des LMA ainsi que des leucémies mixtes en proportion semblable.

Avec MLL-AF4, les résultats sont plus variables. Plus de la moitié des souris (28 sur 42) présentaient un greffon humain qui varie entre 5 et 60%. Cependant, même si la greffe fonctionne bien, peu de leucémies se développent. Trois leucémies ont pu être observées avec MLL-AF4, avec un pourcentage très faible de cellules CD45+/EGFP+ pour deux d'entre elles, ce qui rend difficile l'analyse de ces leucémies. Cependant, une des leucémies MLL-AF4 présentaient un phénotype LLA-B clairement marqué.

Pour les souris injectées avec MLL-ENL, la majorité des souris présentaient un greffon humain qui varie entre 20% et 100%. Comme pour MLL-AF9, ces souris ont tendance à développer des leucémies, c'est le cas pour 18 des 28 souris greffées. Les leucémies développées sont majoritairement des LLA-B (13 sur 18) avec également quelques leucémies mixtes. Aucune LMA ne s'est développée avec l'oncogène MLL-ENL.

Enfin, très peu de souris injectées avec MLL-ELL ont développé des leucémies. Pourtant, sur 38 souris injectées, 24 présentaient un pourcentage de greffon humain variant de 15% à 100%. Seulement 3 souris ont développés des leucémies, toutes des LLA-B.

**Tableau 3 : Synthèse des résultats obtenus**

Oncogène	# engrafté/ # injecté	% greffon humain (MO) des souris engraftées	# leucémique/ # engrafté	Phénotype
<b>Contrôle</b>	13/26	1% à 20%	7*/13	Normal
<b>MLL-AF9</b>	51/58	Généralement $\geq 50\%$	46/51	27 LLA-B 10 LMA 9 mixtes
<b>MLL-AF4</b>	28/42	5% à 60%	3/25	1 LMA 2 LLA
<b>MLL-ENL</b>	28/32	20% à 100%	18/28	13 LLA-B 5 mixte
<b>MLL-ELL</b>	24/38	15% à 100%	3/24	3 LLA-B

\*souris présentant un phénotype « normal » et non leucémique.

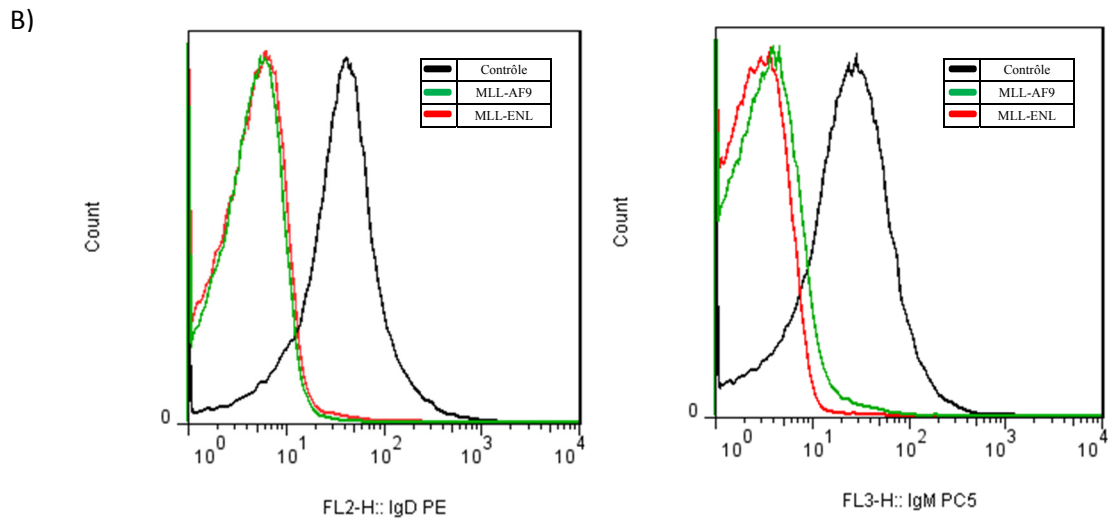
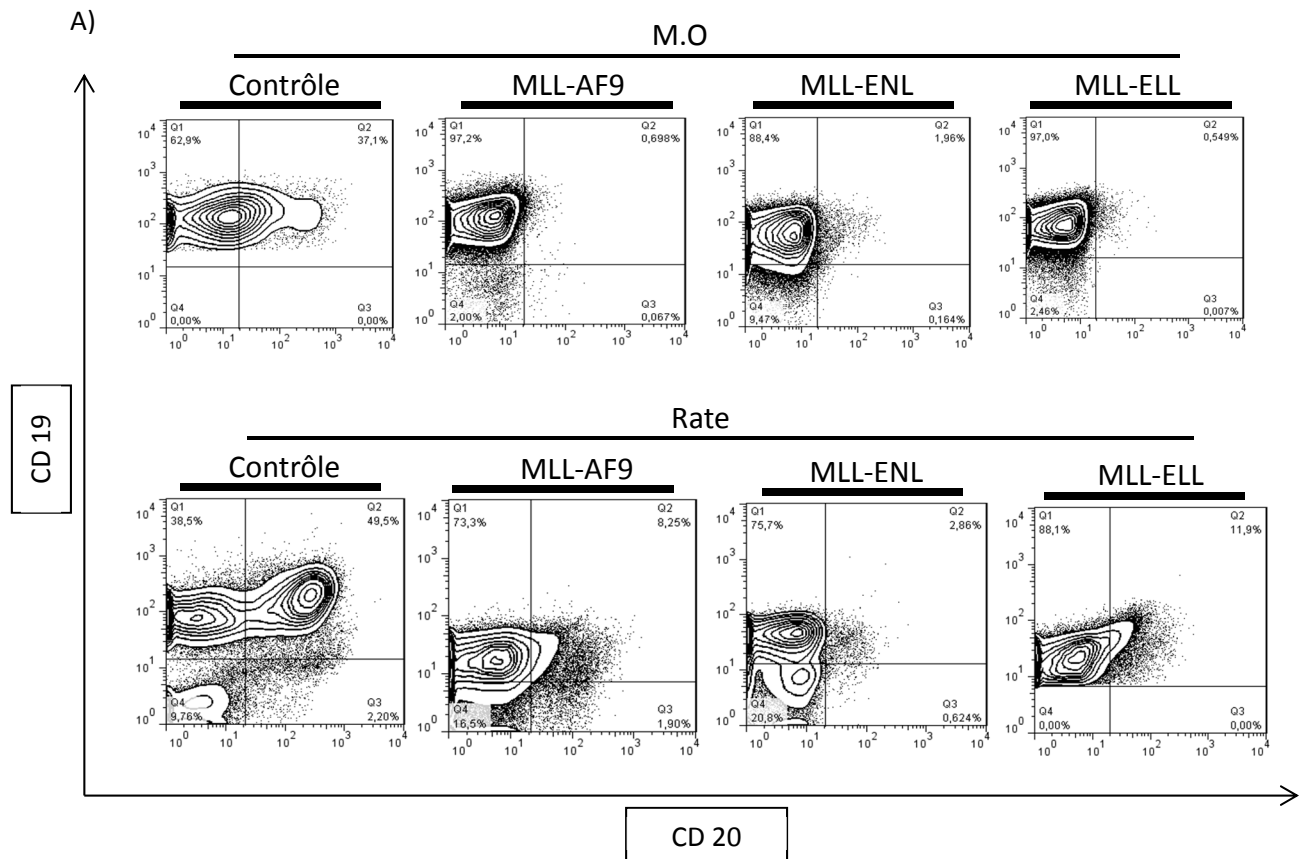
### *iii. Bloc de différenciation des cellules leucémiques*

Une fois que le phénotype leucémique a été caractérisé, d'autres analyses de cytométrie en flux vont permettre de définir l'état de différenciation dans lequel les populations de cellules leucémiques se trouvent. Pour cela, plusieurs marqueurs de surface vont être ciblés. En effet, au fur et à mesure de la différenciation d'une cellule hématopoïétique dans une lignée, des marqueurs de surfaces différents vont être exprimés par la cellule (cf. figure 3). Toutes ces analyses sont faites sur les populations de cellules CD45+/EGFP+.

- Les LLA-B

L'analyse des leucémies B développées, quel que soit l'oncogène, montre que les blastes leucémiques ont un profil cellulaire qui correspond à un arrêt de la différenciation à un stade de cellule pro-B, comparativement aux souris contrôles qui montrent une maturation normale des cellules B. En effet, aussi bien dans la moelle osseuse que dans la rate, les cellules expriment le marqueur de surface CD19 mais pas le CD20 (figure 18 - A). Au contraire, les cellules des souris contrôles expriment le CD20 à leur surface, en plus du CD19, ce qui correspond à un stade de maturation plus avancé. On remarque également que le marqueur CD20, pour les contrôles, est plus présent à la surface des cellules de la rate comparativement aux cellules de la moelle osseuse.

Lors des dernières étapes de différenciation des cellules B, celles-ci vont exprimer à leur surface les immunoglobulines IgD et IgM. Lorsqu'on regarde l'expression de ces 2 immunoglobulines dans les leucémies B développées, on ne les détecte pas. Au contraire, chez les souris contrôles, les cellules analysées expriment fortement ces 2 immunoglobulines à leur surface et sont donc doubles positives : IgD+/IgM+ (figure 18 - B).



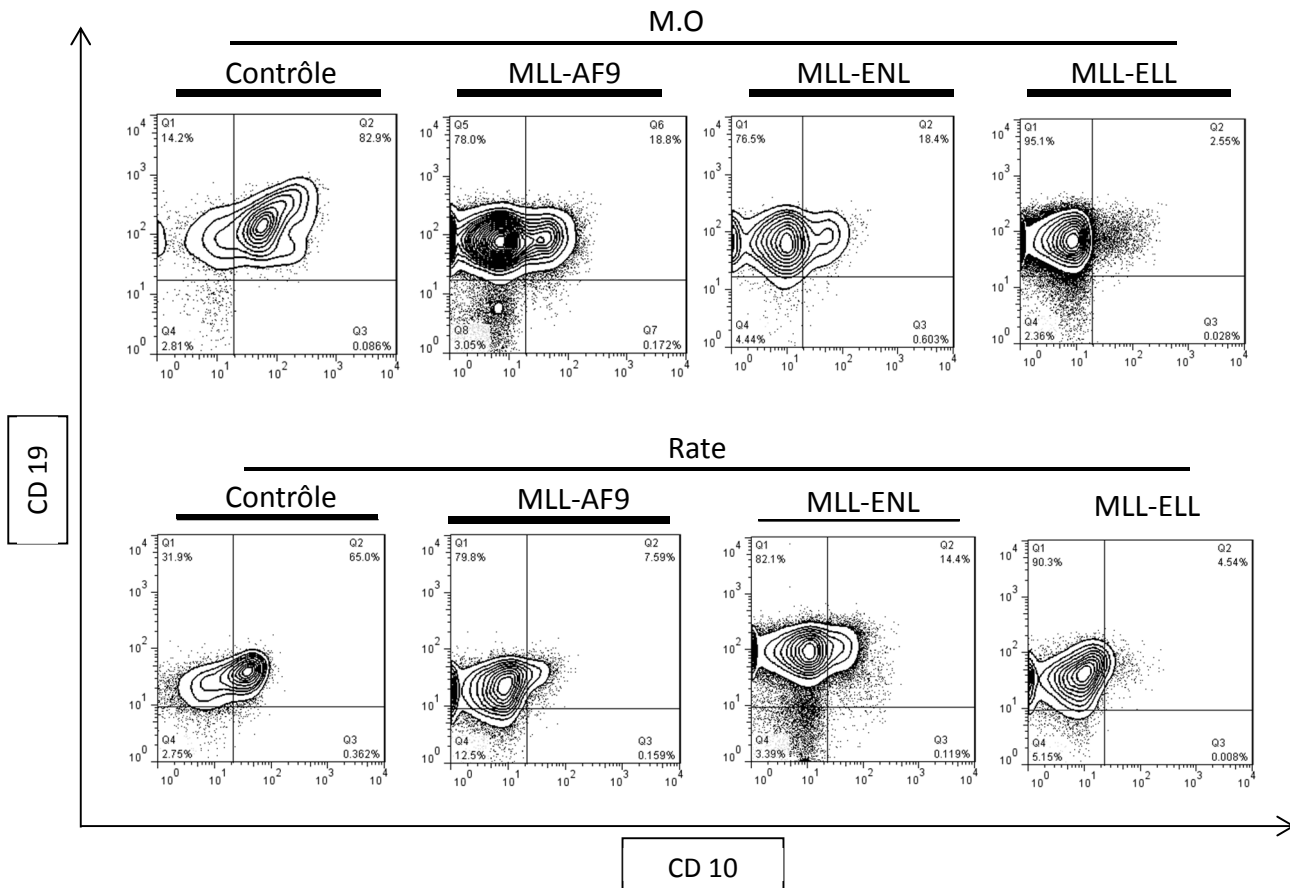
**Figure 19 : Bloc de différenciation terminale des cellules B issues de LLA-B**

A) Analyses des marqueurs CD19 et CD20 des cellules de la moelle osseuse et de la rate. B) Analyses des marqueurs IgD (graphique de gauche) et IgM (graphique de droite) des cellules du sang.

On voit également que les blastes leucémiques, que ce soit dans la moelle osseuse ou bien dans la rate, expriment très faiblement le CD10 à leur surface, et son expression, bien que variable, est toujours inférieur à celle des cellules issues des souris contrôle (figure 19). Cet antigène est présent sur les progéniteurs des lymphoïdes B et reflète un stade précoce de maturation des lymphoïdes B.

L'analyse des marqueurs lymphoïdes des cellules issues des LLA-B témoigne donc du blocage de différenciation de ces cellules. Les cellules leucémiques sont bloquées au stade de cellules pro-B dans la voie de différenciation des lymphoïdes B. Au contraire, les cellules issues des souris contrôles présentent une maturation normale des cellules B.



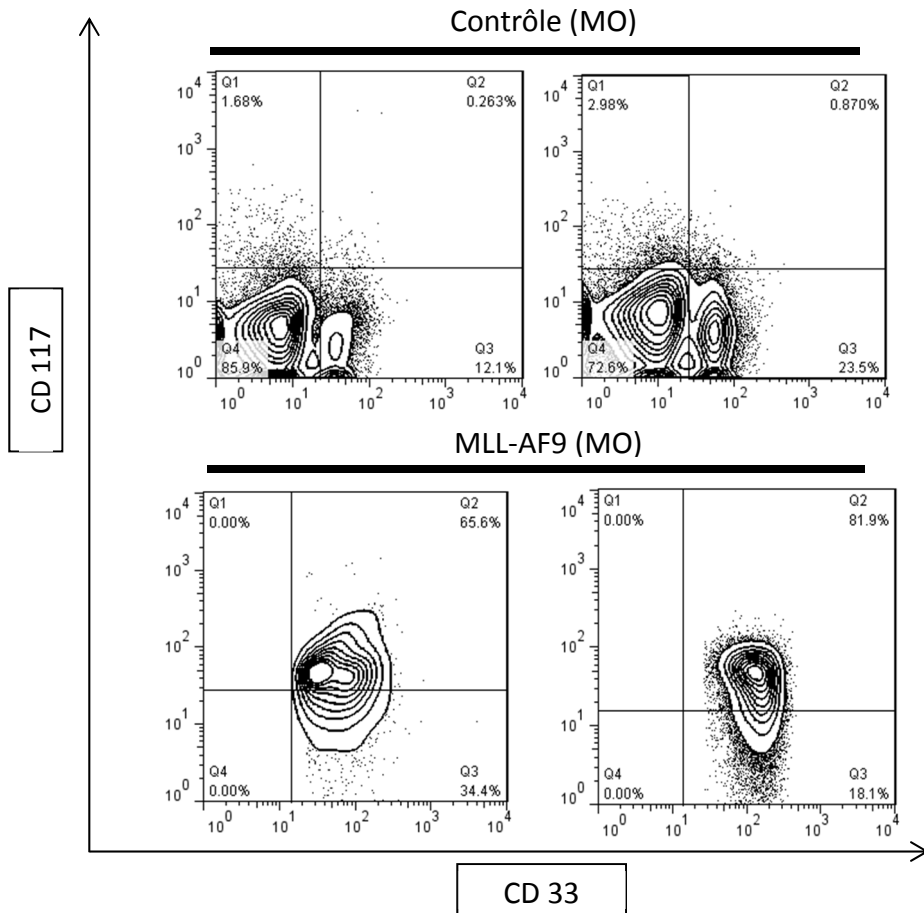


**Figure 20 : Stade de différenciation des cellules B issues de LLA-B**

Les marqueurs CD19 et CD10 sont analysés à la surface des cellules de la moelle osseuse (graphiques du haut) et de la rate (graphiques du bas)

- Les LMA

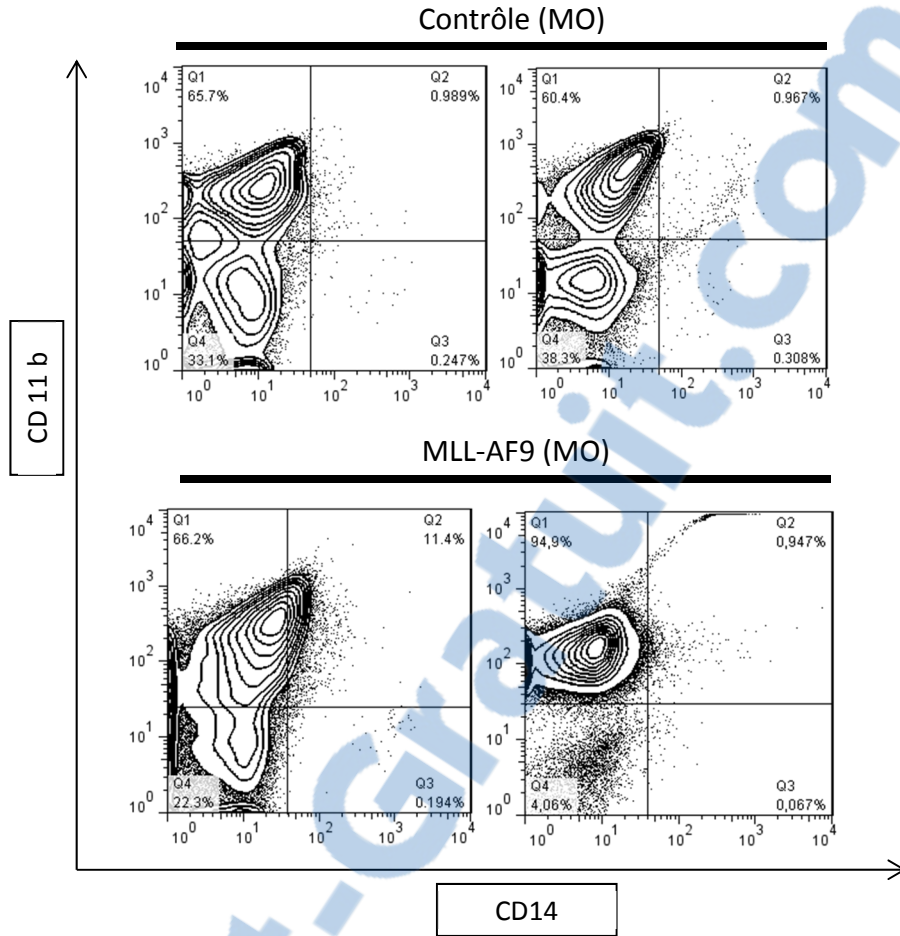
De la même façon qu'avec les LLA-B, l'analyse par cytométrie en flux de différents marqueurs de surface des blastes issus des LMA va nous permettre d'identifier le stade de maturation au niveau duquel le blocage s'est produit. Concernant la lignée myéloïde, les marqueurs de surface présents à chaque étape de différenciation sont moins bien définis. Lorsqu'on regarde l'expression du CD117 (ou c-kit), marqueur de surface caractéristique des LMA, on constate que les cellules leucémiques expriment ce marqueur (figure 20). Au contraire, chez les souris contrôles, les cellules analysées n'expriment pas le CD117 à leur surface.



**Figure 21 : Expression du CD117 à la surface des cellules myéloïdes de la moelle osseuse**

Le marqueur CD117 est analysé à la surface des cellules myéloïdes (CD33+) de 2 souris contrôles (graphiques du haut) et de 2 souris MLL-AF9 (graphiques du bas).

D'autres marqueurs de surfaces comme CD14 et CD11b sont également analysés (figure 21). Tous deux sont des marqueurs présents à la surface, entre autres, des macrophages, des monocytes et des granulocytes, ce qui correspond à des cellules myéloïdes matures. Ils peuvent également être retrouvés à un stade de différenciation moins avancé de ces cellules. Lorsqu'on regarde la présence de ces marqueurs à la surface des blastes leucémiques, on peut voir que les cellules expriment en grande partie le CD11b. Chez les souris contrôles, l'expression du CD11b va également être détecté mais en quantité moins importante. Le CD14 est quant à lui faiblement exprimé, voire pas du tout présent, à la surface des cellules (contrôle et MLL-AF9).



**Figure 22 : État de différenciation des cellules myéloïdes de moelle osseuse (MO) issues de LMA**

Le marqueur CD117 est analysé à la surface des cellules myéloïdes (CD33+) de 2 souris contrôle (graphiques du haut) et de 2 souris MLL-AF9 (graphiques du bas).

- Résultats obtenus

Les données présentées ci-dessus ont permis de caractériser les différentes leucémies obtenues en fonction des différents oncogènes étudiés. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 4.

En ce qui concerne les souris contrôles, 7 d'entre elles présentaient un greffon normal de cellules EGPF+. On parle de phénotype « normal ». Ces 7 souris présentaient toutes un pourcentage de greffon humain inférieur à 20% phénotypiquement normal, et une absence d'infiltration d'organes. Pour les autres souris contrôles, aucun greffon n'a pu être détecté.

Pour les souris injectées avec MLL-AF9, une grande partie des leucémies développées, soit 27 sur 46, étaient des LLA de type B. Toutes ces LLA-B obtenues avec MLL-AF9 présentaient un pourcentage de cellules leucémiques supérieur à 20% (20% étant la limite à partir de laquelle on définit une leucémie humaine en clinique). Huit de ces 27 souris ont dû être sacrifiées avant les 22 semaines post injection car elles présentaient des signes cliniques de la maladie. Toujours avec MLL-AF9, 10 souris ont développées des LMA, et 9 des leucémies mixtes. Parmi ces souris, une seule est tombée malade avant les 22 semaines post-injection (et a développé une leucémie mixte), et la majorité des souris présentaient un pourcentage de cellules leucémiques supérieur à 20% (8 pour chaque groupe). Toutes les leucémies obtenues avec MLL-AF9 présentaient une infiltration des organes tels que la rate et le thymus. Les leucémies obtenues avec MLL-AF9 sont donc majoritairement des LLA de type B bien que des leucémies myéloïdes ainsi que des leucémies mixtes ont été obtenus. Les LLA-B semblent se développer plus rapidement au vu du nombre de souris tombées malades avant 22 semaines, comparativement aux LMA et aux leucémies mixtes. Également, les cellules lymphoblastiques B infiltrent d'avantage les tissus que les LMA, ce qui peut expliquer que les souris avec des LLA-B développent des symptômes plus précocement.

Avec MLL-ENL, aucune LMA ne s'est développée chez les souris. La majorité d'entre elles (13 souris) ont développé des LLA de type B, alors que les autres présentaient des phénotypes leucémiques mixtes (5 souris). Une partie de ces souris est tombée malade avant les 22 semaines post-injection (3 LLA-B et 2 mixtes). La majorité des LLA-B obtenues avec MLL-AF9 présentaient un pourcentage de cellules leucémiques supérieur à 20% contre seulement 2 sur 5 pour les leucémies mixtes. Toutes les leucémies obtenues avec MLL-ENL présentaient une infiltration des organes.

Enfin, avec MLL-ELL, seulement 3 souris ont développé des leucémies, toutes étant des LLA de type B. Deux d'entre elles présentaient un pourcentage de cellules leucémiques supérieur à 20%. Toutes ces souris analysées présentaient, comme pour MLL-AF9 et MLL-ENL, une infiltration des organes.

Au vu de ces résultats, les LLA de type B sont représentées de façon majoritaire parmi les leucémies obtenues, et ce indépendamment des oncogènes. Ces leucémies semblent avoir un temps de latence plus court ainsi qu'une meilleure pénétrance. Les seules LMA obtenues ont été induites par la fusion MLL-AF9. Le temps de latence semble être plus long qu'avec les LLA-B car aucune souris diagnostiquée avec une LMA ne présentaient de signes cliniques au moment du sacrifice, c'est-à-dire à 22 semaines post-injection, ou même avant. Finalement, quelques leucémies mixtes ont également été générées avec MLL-AF9 et MLL-ENL.

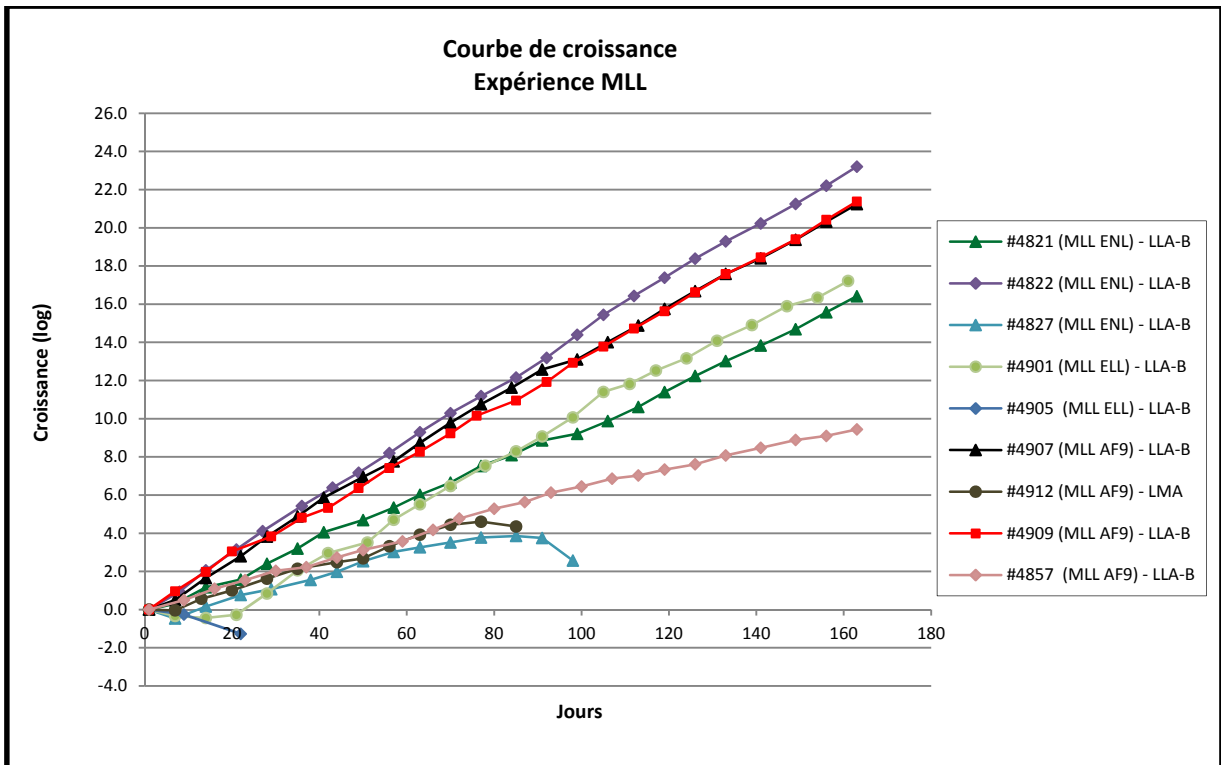
**Tableau 4 : Synthèse des leucémies obtenues *in vivo* en fonction des différents oncogènes**

Oncogène	Phénotype	Souris positives	Souris moribondes	Souris avec cellules leucémiques ≤20%	Souris avec cellules leucémiques >20%	Infiltration Organes
<b>Contrôle</b>	Normal	7	0	7*	0	Non
<b>MLL-AF9</b>	LLA-B	27	8	0	27	Oui
	LMA	10	0	2	8	Oui
	Mixte	9	1	1	8	Oui
<b>MLL-AF4</b>	LLA-B	2	1	1	1	Oui
	LMA	1	0	1	0	Oui
<b>MLL-ENL</b>	LLA-B	13	3	1	12	Oui
	Mixte	5	2	3	2	Oui
<b>MLL-ELL</b>	LLA-B	3	0	1	2	Oui

\*souris non leucémique mais présentant un pourcentage variable de cellules EGFP+/CD45+

#### *d) Culture ex-vivo*

Lorsqu'on remet en culture les différentes leucémies obtenues *in vivo*, on peut voir que les cellules vont être capables de proliférer abondamment pendant 150 jours. Généralement, les LLA-B vont proliférer de façon beaucoup plus importante que les LMA (environ 8 log pour les LLA-B versus 3 logs pour les LMA) et vont survivre plus longtemps (150 jours versus 70 jours). Dépendamment du pourcentage de cellules leucémiques présent au départ dans nos échantillons, ainsi que du phénotype leucémique, la croissance va être différentes (figure 22).



**Figure 23 Prolifération cellulaire des leucémies obtenues**

Les différentes leucémies développées *in vivo* sont mis en culture afin de suivre leur évolution. Chaque courbe représente alors la prolifération cellulaire d'une leucémie développée *in vivo*.

### e) Discussion et perspectives

Les leucémies MLL représentent aujourd'hui près de 10% des leucémies aiguës et sont bien souvent accompagnées d'un pronostic défavorable. C'est également la cause majeure des LLA pédiatriques. Des progrès significatifs sur la compréhension des leucémies MLL ont été faits au cours des 30 dernières années avec notamment le séquençage du gène MLL au début des années 1990 [101, 134]. A la fin des années 1990, le premier modèle animal de leucémie MLL utilisant la transformation des cellules par des vecteurs rétroviraux a été généré [118, 135]. Il s'en est suivi de nombreux modèles animaux utilisant des cellules murines ou humaines [119, 125, 136, 137].

Aujourd'hui plus de 70 gènes de fusion MLL ont été reportés [73]. Dans ce mémoire 4 gènes de fusion ont été étudiés, soit MLL-AF9, qui dans près de 90% des cas est responsable de LMA et qui est fréquemment retrouvé dans les leucémies secondaires; MLL-ENL, qui est retrouvé dans tous les types de leucémies et dans toutes les tranches

d'âge; MLL-ELL qui est majoritairement retrouvé dans les LMA; et enfin MLL-AF4 qui est la fusion la plus courante et qui est retrouvée presque uniquement dans des LLA. Certains gènes de fusion sont plus ou moins faciles à étudier. Par exemple, MLL-AF9 est une fusion très étudiée, non seulement du fait de la disponibilité d'échantillons cliniques, mais aussi de par la disponibilité de modèles efficaces. Au contraire, la fusion MLL-AF4, bien que très étudiée en clinique, est un modèle de leucémie difficile à élaborer, la taille de la fusion étant un inconvénient majeur.

Dans ce mémoire, il a été montré que les taux de transfert de gène dans des cellules hématopoïétiques souches et progénitrices variaient en fonction de l'oncogène. Généralement, la transduction avec MLL-AF9 et MLL-ENL fonctionne bien, avec des pourcentages de transfert de gène variant de 7% à 25% selon les expériences. Avec les oncogènes MLL-ELL et MLL-AF4, l'efficacité de la transduction est généralement faible. Avec MLL-AF4, le taux de transfert de gène dépasse rarement les 1%. La taille du gène pourrait venir perturber l'efficacité de la transduction. En effet, MLL-AF4 est un gène de 7kb, plutôt volumineux, contrairement à MLL-AF9 qui est de 4.9kb. L'intégration du génome viral dans le chromosome des cellules cibles est donc plus difficile étant donnée la grosseur du gène présent dans le vecteur. Ces résultats reflètent ceux que l'on observe avec les titres viraux bien que les différences soient moins importantes. En effet, les titres viraux obtenus avec MLL-AF4 en particulier sont plus faibles que ce que l'on observe avec MLL-AF9 ou MLL-ENL. De plus, bien que la transcription de l'ADN viral est assurée par un promoteur fort situé dans la région 5'LTR, la transcription de l'EGFP est quant à elle assurée par un promoteur interne hPGK. Le gène de fusion étant présent en amont du site de l'EGFP, et ce gène étant particulièrement volumineux, il se pourrait que la transcription de l'EGFP soit moins efficace, ce qui pourrait expliquer la faible intensité du signal EGFP que l'on observe. Il est aussi possible que selon l'oncogène, la population ciblée par la transformation ne soit pas la même. La question concernant la cellule ciblée par chaque translocation reste entière. Isoler différentes populations enfin de tester leur efficacité de transduction serait une approche possible afin de voir si on observe une différence significative du taux de transduction. Cependant, le défi reste difficile à relever principalement du fait de la rareté des CSH. Les CSH représentent moins de 0,05% des cellules de la moelle osseuse. Dans nos expériences, lorsqu'on isole ces cellules à partir des cellules de sang de cordon, c'est parfois à peine  $3 \times 10^5$  cellules hématopoïétiques souches et progénitrices qui sont récupérées après purification. La disponibilité de ces cellules est un frein important dans l'étude des CSH.

Trier les cellules qui ont été transduites et qui expriment donc l'EGFP serait aussi envisageable et permettrait d'injecter dans les souris uniquement les cellules transduites avec notre oncogène d'intérêt. Cela permettrait d'investiguer le potentiel des cellules transformées à induire la leucémie. En effet, dans certains cas 1% de cellules transformées (EGFP+) suffisent à elle seule à induire la maladie grâce à l'avantage de survie qu'elles

acquièrent. Dans certain cas, comme avec MLL-AF4 ou MLL-ELL, les 1% de cellules transformées ne sont pas capables d'induire la leucémie. Le trie permettrait d'enrichir notre population en cellules transformées uniquement et voir si cela a un impact sur l'induction de la maladie. Cependant, là encore le problème de quantité se pose. Il serait délicat de trier des échantillons de cellules, qui sont d'autant plus des cellules fragiles, où seulement 1% de la population est positive pour l'EGFP. En effet, bien que durant le cycle d'infection les cellules ont tendance à proliférer, le nombre de cellules atteint rarement les 1,5 millions.

L'expansion des CSH serait envisageable, cela permettrait d'augmenter le nombre de cellules disponibles. D'un point de vue clinique, cela permettrait d'optimiser les greffes de moelle osseuse et ainsi améliorer les thérapies dans le cas de traitement de cancers du sang. Ainsi l'expansion *ex vivo* des CSH d'un patient permettrait de repeupler la moelle de ses propres CSH, évitant tout rejet. La difficulté reste cependant liée au fait que les CSH se différencient rapidement en culture. De nombreuses stratégies se développent afin d'améliorer la production *in vitro* de CSH, comme l'identification de molécules permettant l'expansion des CSH issues de sang de cordon [126, 138] ou encore l'inhibition des voies de rétrocontrôles dues aux facteurs sécrétés par les CSH en voie de différenciation [139].

Tout au long de ce mémoire, l'objectif principal est de transformer des cellules hématopoïétiques souches et progénitrices en cellules leucémiques. Une fois transduites, une partie des cellules a été remise en culture *in vitro*. Ce que l'on voit fréquemment, c'est que la majorité des cellules finissent par mourir, à des temps différents selon l'oncogène et selon l'expérience. La caractéristique principale d'une CSL étant son fort potentiel d'auto-renouvellement [140, 141], on s'attend à ce que nos cellules transduites avec nos différents oncogènes survivent en culture. Cependant, lorsqu'on dépose nos cellules en culture directement après les infections, on n'observe pas cet effet d'auto-renouvellement à long terme. Généralement, les cellules vont proliférer de façon abondante les 30 premiers jours, y compris pour les cellules contrôles. Cet effet semble cohérent du fait que la majorité des cellules présentes initialement sont des cellules souches ou progénitrices et qu'une des caractéristiques principales de ces cellules est l'auto-renouvellement. C'est d'ailleurs une caractéristique commune aux CSH et aux CSL. Or ces cellules vont rapidement entrer en phase de différenciation et leur potentiel d'auto-renouvellement va s'affaiblir un peu plus à chaque étape de différenciation afin d'aboutir à une cellule mature. C'est d'ailleurs ce que l'on voit sur la courbe : dès 30 jours, la prolifération cellulaire ralentit, indépendamment des oncogènes. Après une courte phase de stabilisation, on observe une reprise de la prolifération dans certain cas. En effet, alors que les cellules contrôles commencent à mourir à 30 jours du fait qu'elles ne possèdent aucun avantage sélectif, les autres cellules continuent de proliférer. Cependant, la vitesse de prolifération va varier selon l'oncogène. Avec MLL-AF9 et MLL-ENL, on observe une reprise importante de la prolifération alors que pour MLL-ELL et MLL-AF4, il y a simplement un maintien constant du nombre de cellules. Dans tous les cas, les cellules finissent par mourir, généralement après un



maximum de 120 jours. Contrairement aux cellules contrôles, ces cellules possèdent un certain avantage de survie qui leur permet de proliférer pendant un certain temps, mais dans ces conditions, il semblerait que ce ne soit pas possible d'immortaliser ces cellules *in vitro* seulement après le transfert d'un gène de fusion MLL. Le microenvironnement pourrait jouer un rôle crucial pour le développement des cellules leucémiques. L'absence de cytokines adéquates influence le devenir des cellules ainsi que leur survie. Par exemple, la cytokine FLT3-L joue un rôle important dans la croissance à long terme des lignées cellulaires myéloïdes et lymphoïdes [142]. La difficulté de garder des cellules leucémiques myéloïdes de patients en culture semble également être dû à la modification de l'environnement. En effet, il a été démontré que la culture de cellules leucémiques primaires fonctionne bien mieux lorsque les cellules sont en présence d'un microenvironnement de support comme des cellules stromales [143, 144]. Il a également été démontré qu'environ 40% des leucémies induites de façon expérimentale et issues de moelle osseuse de souris n'étaient pas capables de pousser *in vitro*, ce qui supporte l'idée que le microenvironnement cellulaire joue un rôle important dans la croissance et le développement tumoral [142].

Dans nos expériences, on peut voir qu'une fois que les leucémies se développent chez la souris, les cellules leucémiques issues de la moelle sont capables de proliférer abondamment lorsqu'on les remet en culture. Dépendamment des leucémies, la durée ainsi que la vitesse de prolifération ne vont pas être les mêmes. Cependant, on observe généralement une prolifération rapide pour la majorité des LLA-B. Les cultures sont généralement arrêtées après 160 jours mais la vitesse de prolifération reste constante et élevée tout au long de la culture, ce qui laisse supposer que ces cellules ont été immortalisées et sont capables de proliférer indéfiniment. Contrairement aux cellules mises directement en culture après les infections, ces cellules qui se sont développées *in vivo* pendant près de 22 semaines ont acquis des modifications leur permettant un renouvellement illimité.

Parmi les leucémies générées dans cette étude, on constate que pour la totalité d'entre elles les cellules leucémiques analysées présentaient un blocage au niveau de la différenciation, que ce soit dans la lignée myéloïde ou bien dans la lignée lymphoïde. Parmi les LLA-B générées, les populations cellulaires CD19+ n'expriment pas le CD20 et pour la majorité d'entre elles, le niveau d'expression du CD10 est très bas voir absent. Au contraire, les cellules issues des souris contrôles expriment le CD20 à un niveau élevé. De plus, ces cellules ont un niveau d'expression élevé de l'IgD et l'IgM, contrairement aux populations de cellules B issues des leucémies générées qui présentent une absence totale d'expression de ces 2 marqueurs de lignée. Cela confirme bien le fait que ces cellules ont un défaut de maturation. Ces cellules sont donc bien arrêtées au stade pro-B de différenciation dans la lignée lymphoïde, ce qui résulte en une accumulation de blastes immatures exprimant les marqueurs de surfaces CD19+/CD20-/IgD-/IgM-. Ce phénotype observé dans les LLA-B

qui se sont développées dans les souris corrèle avec ce que l'on peut voir dans les LLA-B de patients. Cependant, quelques différences sont notables. En effet, dans la majorité des cas les leucémies MLL-AF9 sont associées à un phénotype myéloïde. Il en est de même pour les leucémies MLL-ELL. Or dans cette étude, seulement 22% des leucémies MLL-AF9 présentaient un phénotype myéloïde; de même qu'avec ML-ELL, la totalité des leucémies générées présentait un phénotype lymphoïde B (bien que seulement 3 leucémies ont été générées avec cette oncogène). Pour ce qui est de la translocation MLL-ENL, chez les patients elle est retrouvée aussi bien dans des LLA que des LMA. Dans notre étude, les leucémies générées avec MLL-ENL sont majoritairement des LLA (et quelques leucémies mixtes). Cette surreprésentation de LLA peut être due tout d'abord à l'environnement cellulaire des souris irradiées qui est plus propice à une reconstitution de lymphoïde B. Il se pourrait également que l'environnement joue un rôle important et conditionne les cellules pour un phénotype particulier. De plus, les cellules initialement transformées étant des cellules de sang de cordon, les propriétés intrinsèques de ces cellules pourraient aussi influencer le phénotype. En effet, chez les enfants, les LLA sont majoritairement présentes (plus de 80% des leucémies aiguës confondues).

Comme on a pu le voir dans nos expériences, certaines leucémies sont difficiles à générer. Il semblerait qu'avec MLL-AF4 et MLL-ELL, bien que quelques leucémies ont pu être observées, il est difficile d'obtenir un modèle approprié pour l'étude de ces leucémies. La présence d'un greffon humain nous indique que les greffes au niveau de la souris se font correctement. Cependant, l'absence de cellules EGFP+ ne nous permet pas d'en savoir plus. Bien que cela semble difficile à mettre en œuvre, les quelques leucémies obtenues nous amènent à dire qu'une fois les problèmes techniques résolus, il sera sans doute possible d'obtenir un modèle performant qui nous permettra, comme c'est le cas avec MLL-AF9 ou MLL-ENL, d'en savoir plus sur le processus leucémique induit par ces oncogènes. De nombreuses équipes ont tenté de développer des leucémies MLL-AF4 humaines mais à ce jour le processus leucémique induit par MLL-AF4 semble difficile à modéliser et les modèles animaux qui récapitulent de façon conforme le phénotype et le temps de latence de la maladie font encore défaut. Parmi de nombreuses études, une équipe a démontré que l'expression de MLL-AF4 dans des CSH issues de sang de cordon augmentait le potentiel clonogénique des progéniteurs CD34+ et favorisait la prolifération, mais cela semble insuffisant pour induire la leucémie [145]. La question qui se pose est donc de savoir si la protéine de fusion MLL-AF4 est capable d'initier le processus leucémique à elle seule ou bien si d'autres événements génétiques sont requis. Récemment, une équipe a démontré que l'introduction de la fusion réciproque AF4-MLL dans des cellules hématopoïétiques souches et progénitrices murines permet d'induire des LLA sans nécessiter la fusion MLL-AF4 [146]. Cependant, il semblerait que ces expériences soient plus difficiles à mettre en œuvre dans des CSH humaines. De plus, une équipe a testé l'effet de la diminution de l'expression des protéines de fusions MLL-AF4 ou AF4-MLL dans des lignées cellulaires leucémiques possédant la translocation t(4;11). Il semblerait que seule la

diminution d'expression de MLL-AF4 ait un impact sur la lignée cellulaire. En effet, une inhibition significative de la croissance serait observée, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose. Au contraire, la diminution d'expression de la protéine de fusion AF4-MLL n'entraîne aucun effet sur la croissance [147]. Ainsi, ces études tendent à démontrer l'importance de la protéine de fusion MLL-AF4 pour la prolifération cellulaire des cellules leucémiques et leur survie contrairement à AF4-MLL qui pourrait jouer un rôle important dans le processus initial de transformation.

Mais malgré ces nombreuses études, il semble difficile de tirer des conclusions solides sur le potentiel oncogénique de la protéine de fusion MLL-AF4.

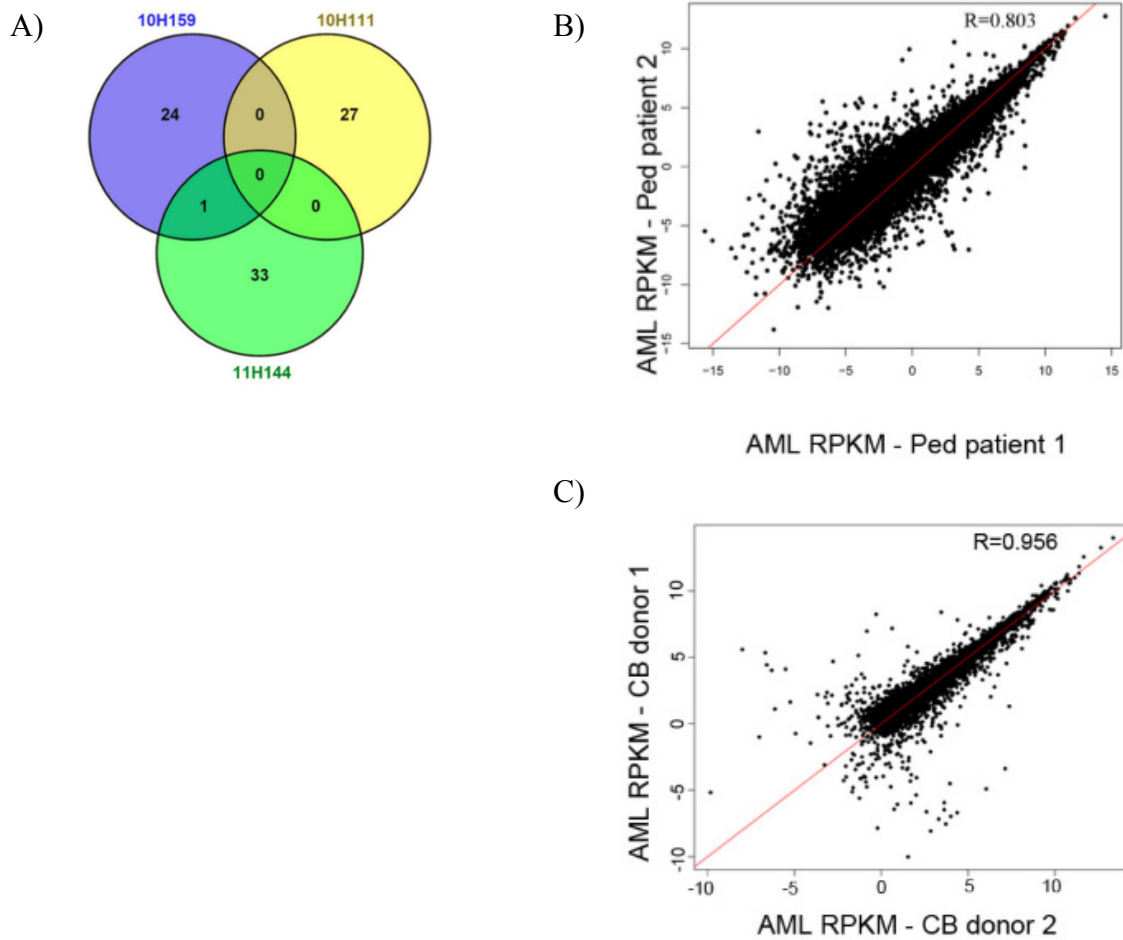
## 2. Leucémies myéloïdes MLL-AF9 : absence d'évènements secondaires et identification de biomarqueurs

### a) Modèle de leucémies aiguës MLL-AF9 générées à partir de sang de cordon unique : caractéristiques et avantages

Dans cette deuxième partie, les cellules CD34+, après transduction, sont maintenues 30 jours en culture dans un milieu favorisant l'engagement dans la lignée myéloïde. Après ces 30 jours de culture, les cellules sont injectées dans les souris, et parallèlement, une partie des cellules est remise en culture pendant 90 jours.

Les cellules CD34+ sont ici issues de sang de cordon unique. En effet, les leucémies générées proviennent d'un même donneur et ont donc le même *background* génétique. L'utilisation d'un système qui nous permet de générer plusieurs leucémies à partir d'un seul donneur va permettre de mieux comprendre et évaluer la contribution du *background* génétique d'un patient lors du développement de la maladie. En effet, les leucémies myéloïdes aiguës sont des maladies génétiquement très hétérogènes et c'est cette grande hétérogénéité génétique que l'on a observé lorsqu'on a séquencé l'ARN et l'exome de 3 LMA pédiatriques contenant la fusion MLL-AF9 (figure 23-A). Plusieurs mutations pertinentes ont été identifiées. Cependant, aucune de ces mutations n'est commune aux 3 patients. On peut voir en effet que pour chaque patient, 24 à 33 mutations ont pu être identifiées mais aucune de ces mutations n'est présente chez ces 3 patients.

Cette hétérogénéité génétique est également démontrée dans la figure 23-B. Ce graphique nous permet de comparer l'expression de différents gènes (valeurs en RPKM) de 2 leucémies pédiatriques MLL-AF9. Le nuage de point apparaît dispersé et avec un coefficient de corrélation (R) de 0.803, ce qui indique une grande variabilité entre ces patients concernant l'expression de ces gènes.



**Figure 24 : Caractéristiques du modèle de LMA générées à partir de donneur unique**

A) Le séquençage de l'exome de 3 LMA pédiatriques (AML : « Acute Myeloid Leukemia ») contenant la fusion MLL-AF9 n'a révélé aucune mutation commune aux 3 patients, ce qui illustre l'hétérogénéité génétique de la maladie (A). La comparaison de la valeur d'expression des gènes (en RPKM) de 2 LMA pédiatriques MLL-AF9 est caractérisée par la dispersion du nuage de point, ce qui indique une grande variabilité entre ces patients, avec  $R=0.804$  (B). Au contraire, lorsqu'on compare la valeur d'expression des gènes de 2 donneurs uniques différents (CB : « Cord Blood ») issus de notre modèle de leucémies, la dispersion est beaucoup moins importante, avec  $R=0.956$ , suggérant une très bonne corrélation entre les donneurs (C).

Dans notre modèle de leucémies issues de sang de cordon unique, lorsqu'on compare le profil d'expression des gènes de 2 donneurs uniques (issus de 2 sangs de cordon distincts ou d'un même donneur), on s'aperçoit que le nuage de point est beaucoup moins dispersé (figure 23-C). Le coefficient de corrélation est de 0.956 ce qui suggère une très bonne corrélation. Le profil d'expression des gènes est semblable entre les donneurs ce qui tend à

démontrer que le *background* génétique du donneur n'intervient pas dans ce modèle leucémique généré à partir de donneur unique.

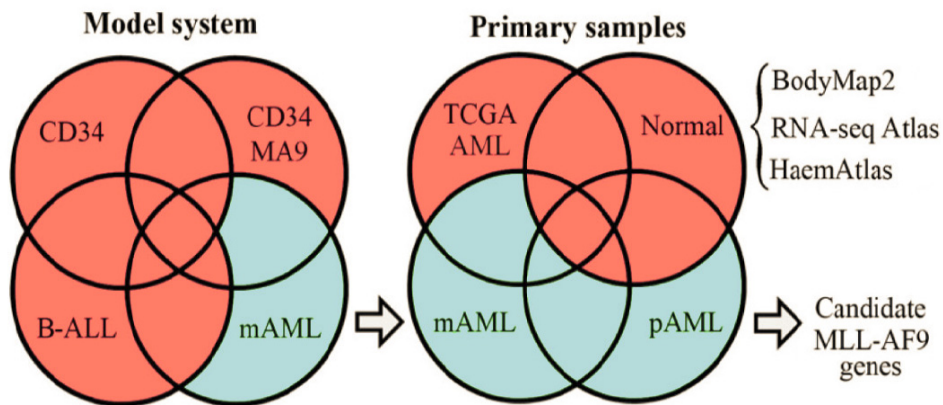
### b) Leucémies MLL-AF9 : oncogène suffisant au développement de la maladie

Dans ce modèle de leucémies MLL-AF9, le fait que le *background* génétique du donneur ne contribue pas au développement de la maladie va nous permettre de suivre ce qui se passe au cours de l'évolution de la maladie en comparant le génome du donneur sain avec le génome des leucémies résultantes. De façon intéressante, ce modèle va nous permettre de mettre en évidence d'éventuelles mutations qui surviennent lors du développement de la maladie, ou encore d'identifier des biomarqueurs qui pourront être utilisés pour le diagnostic ou bien comme cibles thérapeutiques.

Pour savoir si de nouvelles mutations apparaissent lors du développement de la leucémie, l'exome et l'ARN des cellules CD34+ initiales ainsi que ceux des LMA et LLA-B résultantes ont été séquencés à partir de 4 donneurs indépendants. Aucune nouvelle mutation présente dans les leucémies qui se sont développées et qui n'étaient pas déjà présentes dans les cellules CD34+ initiales n'a pu être identifiée. D'après ces résultats, aucune mutation secondaire n'a été acquise lors du développement de la maladie ce qui suggère que seul l'oncogène MLL-AF9 qui a été transduit dans les cellules initiales CD34+ est suffisant pour initier la leucémie.

### c) Comparaison des différents tissus et identification de biomarqueurs

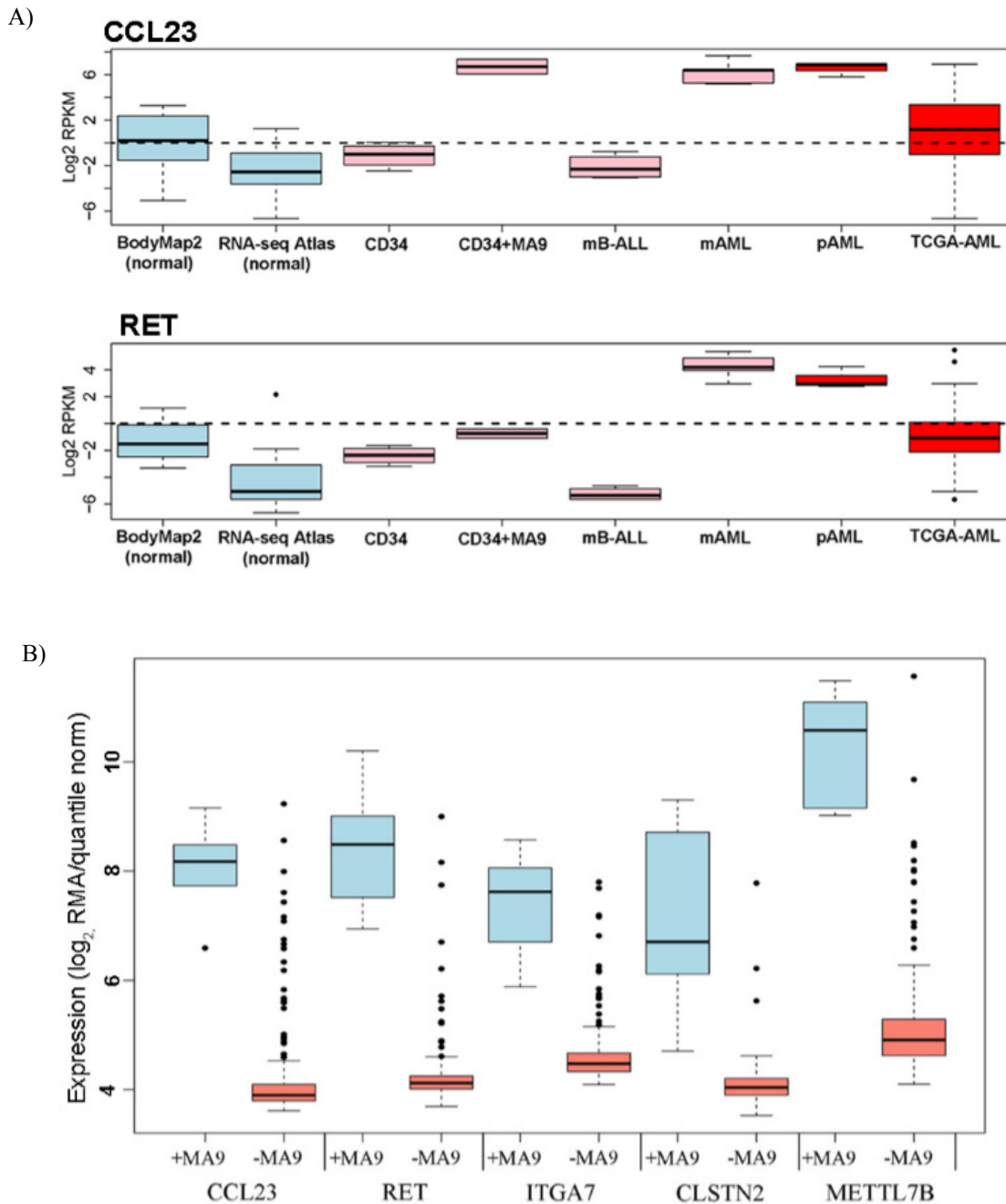
Afin d'identifier un patron d'expression de gènes exprimés de façon constitutive dans ce modèle de LMA contenant la translocation MLL-AF9 (mAML), une comparaison des données de séquençage d'ARN a été réalisée sur différents tissus (figure 24). Le but ici est d'identifier des gènes exprimés de façon constitutive dans le modèle de leucémies myéloïdes MLL-AF9 (RPKM > 3), mais non exprimés dans les cellules normales CD34+ initiales (RPKM < 1). Également, les gènes communs aux leucémies B générées avec MLL-AF9 (mB-ALL) seront exclus. Les gènes sélectionnés dans ce modèle seront aussi comparés à des échantillons issus de bases de données. Là encore, les gènes communs aux tissus sains seront exclus tandis que ceux qui sont communs aux LMA (base de données TCGA-AML : « The Cancer Genome Atlas for Acute Myeloid Leukemia») ainsi que ceux retrouvés dans les LMA pédiatriques (pAML) seront conservés.



**Figure 25 : Schéma illustrant la méthode utilisée pour l'identification de biomarqueurs intéressants des leucémies myéloïdes MLL-AF9**

Cette analyse a permis de révéler 39 gènes qui représentent de potentiels biomarqueurs non mutés et qui sont exprimés de façon spécifique dans les LMA contenant la translocation MLL-AF9. Deux exemples sont présentés dans la figure 25-A : le gène CCL23, qui code pour une cytokine chimiotactique, et le gène RET qui code pour un récepteur tyrosine kinase. Dans cette figure, le niveau d'expression des gènes (exprimé en  $\log_2$  RPKM) est représenté dans différents tissus avec pour considération que les gènes qui sont exprimés de façon constitutive ont un RPKM  $> 3$  et ceux non exprimés, un RPKM  $< 1$ . Les barres bleues représentent les tissus normaux (échantillons issus de 2 bases de données distinctes), les barres roses représentent les différentes populations issues de notre modèle de leucémie et les barres rouges représentent des échantillons de patients. Ces 2 gènes se retrouvent exprimés de façon constitutive dans notre modèle de LMA ainsi que dans les échantillons de LMA pédiatriques. Au contraire, ces gènes se retrouvent peu ou pas exprimés dans les leucémies B générées dans notre modèle ainsi que dans les cellules initiales CD34+, de même que dans les tissus sains.

L'expression de ces gènes candidats a également été observée dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines, en utilisant 180 échantillons de cellules hématopoïétiques issues de la base de données CCLE (« Cancer Cell Line Encyclopedia »). Cette analyse met en évidence une différence significative de l'expression d'un certain nombre de gènes lorsqu'on compare les lignées cellulaires de LMA contenant la translocation MLL-AF9 (n=6) et celles ne la contenant pas (n=174) (figure 25-B).



**Figure 26 : Identification de biomarqueurs spécifiques aux LMA contenant la translocation MLL-AF9**  
 A) Niveau d'expression ( $\log_2$  RPKM) de 2 gènes candidats dans une variété de tissus. Les barres bleues représentent le niveau d'expression des gènes dans les tissus normaux, les barres roses dans les différentes populations du modèle de leucémie et les barres rouges dans les échantillons de patients. La ligne horizontale discontinue représente le seuil en dessous duquel un gène est considéré comme non exprimé ( $\text{RPKM} < 1$ ). B) Niveau d'expression des gènes dans des lignées de cellules cancéreuses humaines ( $n=180$ ) issues de la base de données CCLE contenant la translocation MLL-AF9 ( $n=6$ ) ou ne la contenant pas ( $n=174$ ).



Il y a donc une évidence sur le fait que certains gènes semblent spécifiques d'une part aux LMA, mais plus particulièrement, pour certains d'entre eux, aux LMA contenant la translocation MLL-AF9.

#### d) RET : gène candidat potentiel comme biomarqueur des leucémies myéloïdes aigues MLL-AF9

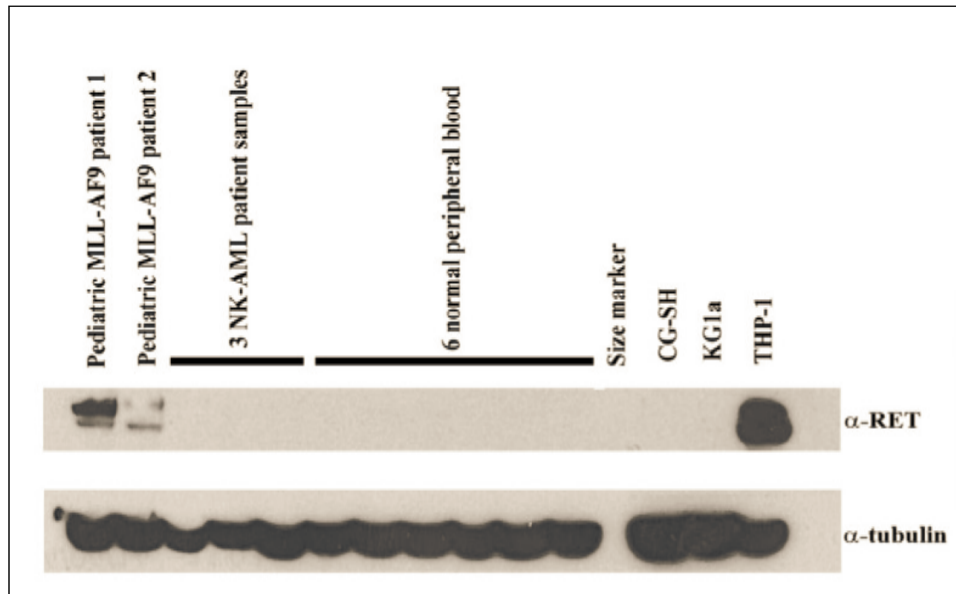
Parmi la liste de gènes candidats pouvant être utilisés comme biomarqueurs des LMA MLL-AF9, RET semblait d'un intérêt particulier du fait que ce soit un oncogène muté de façon récurrente dans des cancers tel que le cancer médullaire de la thyroïde alors que dans notre cas, RET est exprimé de façon constitutive mais n'est pas muté.

Afin de valider l'expression de RET dans les cellules MLL-AF9 de patients, la présence de la protéine a été observée dans différents échantillons par western blot (figure 26-A). Cette expérience montre que la protéine RET est uniquement détectée dans les échantillons de LMA pédiatriques MLL-AF9, ainsi que dans la lignée cellulaire THP-1 qui est une lignée de LMA contenant spécifiquement la translocation MLL-AF9. Au contraire, la protéine n'est pas détectée dans les échantillons de LMA avec un caryotype normal (NK-AML) ainsi que dans les échantillons de sang périphérique issus de donneurs sains.

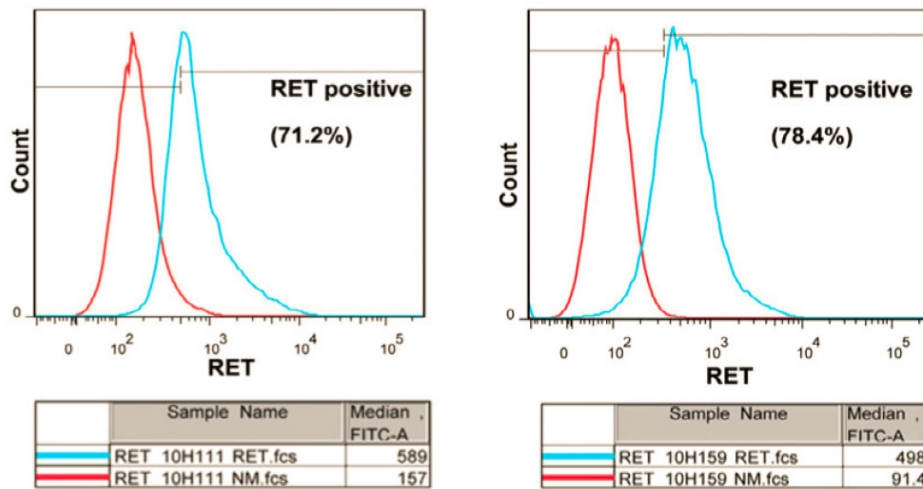
Ces données corrélerent avec les résultats présentés dans la figure 25-B. La présence de RET a été analysée par FACS dans 2 échantillons de LMA pédiatriques MLL-AF9. La protéine RET est détectée dans ces 2 échantillons (courbe bleue) ce qui renforce l'idée que RET pourrait être exprimé de façon spécifique dans les LMA contenant la translocation MLL-AF9.



A)



B)



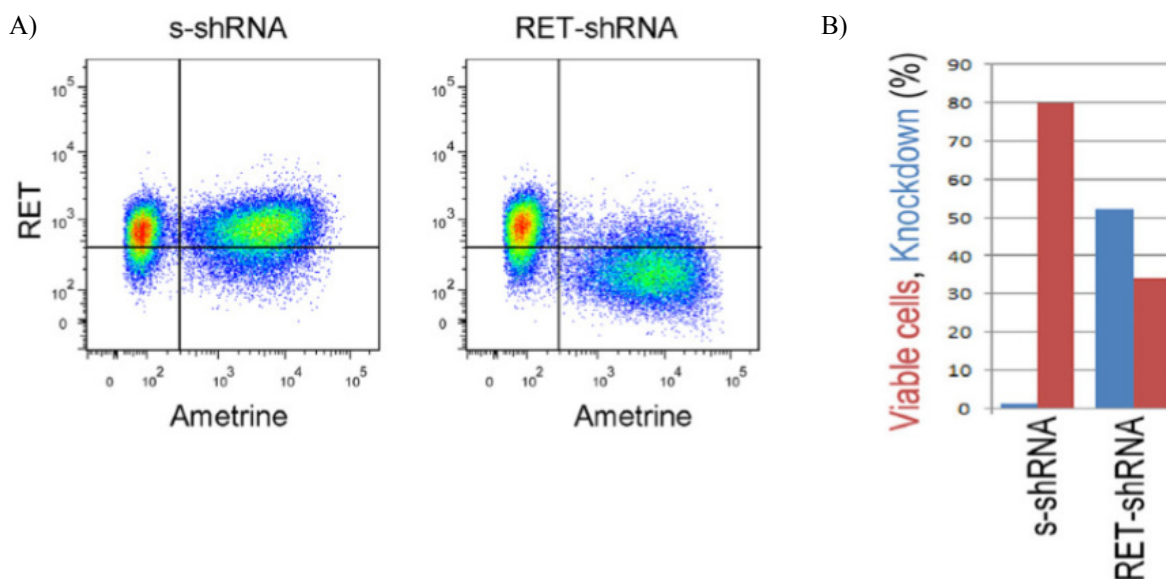
**Figure 27 Validation de RET dans des échantillons cliniques**

A) Détection de la protéine RET par Western Blot dans différents échantillons : 2 échantillons de LMA pédiatriques contenant la translocation MLL-AF9, 3 échantillons de patients avec une LMA à caryotype normal (NK-AML), 6 échantillons de sang périphérique issus de sujets sains et 3 lignées cellulaires de LMA (CG-SH et KG1a présentent un caryotype normal contrairement à la lignée THP-1 qui contient spécifiquement la translocation MLL-AF9). B) Détection de la protéine RET par cytométrie en flux dans 2 échantillons de LMA pédiatriques MLL-AF9.

Afin de tester l'importance de RET dans les LMA contenant la translocation MLL-AF9, la lignée cellulaire THP-1 a été transduite avec un shRNA (« short hairpin RNA ») dans le but de cibler la protéine RET et ainsi diminuer son expression. Pour cela, un vecteur capable d'exprimer simultanément 2 shRNA dirigés contre RET (RET-shRNA) a été utilisé, permettant ainsi d'augmenter l'efficacité de ce système. La diminution de l'expression de RET a été comparée à des cellules THP-1 contrôles exprimant un shRNA contrôle (s-shRNA). L'amétrine (protéine fluorescente) va nous permettre de suivre l'expression du shRNA dans les cellules (figure 27-A).

Lorsqu'on regarde l'expression de RET dans les cellules suite à la transduction par RET-shRNA, on constate que celle-ci est diminuée d'environ 50% comparée aux cellules contrôles (figure 27-B). De plus, on constate une diminution importante (près de 50%) de la viabilité cellulaire après 3 jours dans les cellules où l'expression de RET est diminuée (RET-shRNA).

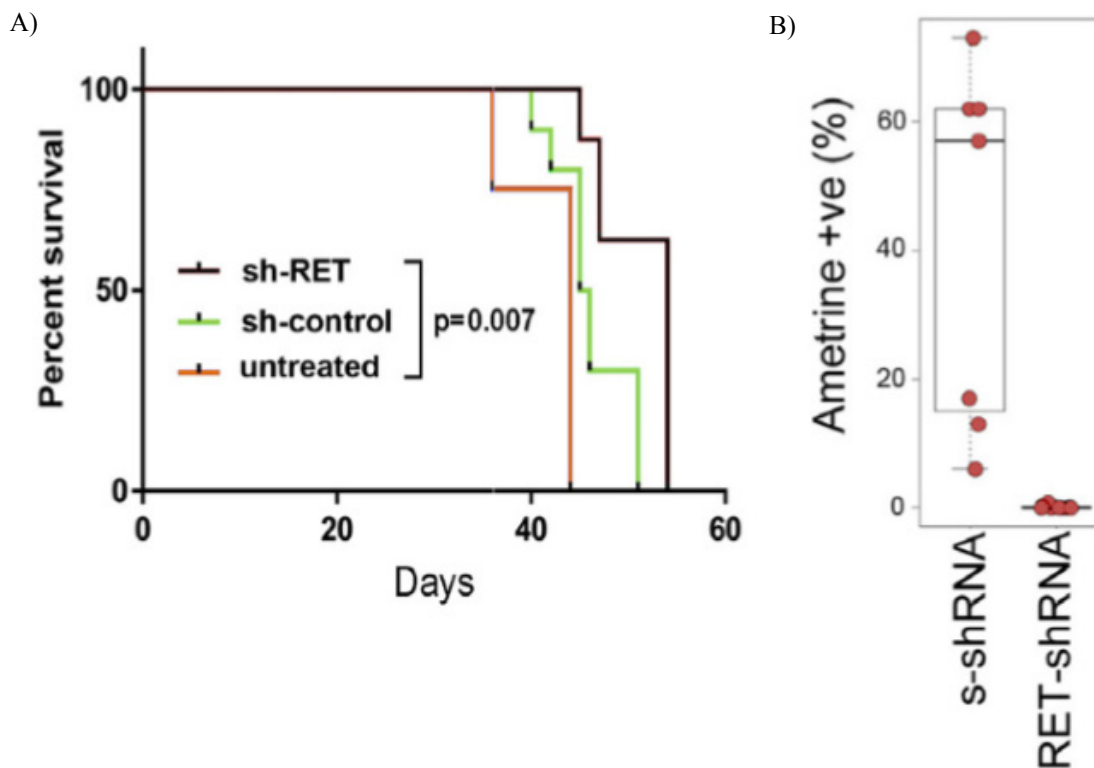
Ces résultats *in vitro* nous indiquent que l'expression de RET semble nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules leucémiques contenant la translocation MLL-AF9.



**Figure 28 : Efficacité du modèle de shRNA sur l'expression de RET dans la lignée THP-1**

A) Détection de la protéine RET par cytométrie en flux dans les cellules THP-1 transfectés avec un shRNA contrôle (s-shRNA) ou dirigé contre RET (RET-shRNA). B) Comparaison (en pourcentage) de la viabilité cellulaire (barres rouges) et de l'efficacité de la diminution d'expression de RET (barres bleues), entre les cellules s-shRNA et RET-shRNA.

Ces résultats ont par la suite été validés *in vivo*. Pour cela, les cellules THP-1 transduites avec un shRNA (contrôle ou RET) ont été injectées dans des souris.  $5 \times 10^5$  cellules transduites, exprimant l'amétrine à 50%, ont été injectées dans 10 souris (pour chaque shRNA). L'apparition de la maladie a été retardée de façon significative pour les souris injectées avec les cellules transduites avec le RET-shRNA comparativement aux souris dont les cellules THP-1 injectées n'ont pas été transduites (figure 28-A). La survie est également meilleure, même si la différence est moins importante, chez les souris RET-shRNA comparativement aux souris s-shRNA. De façon intéressante, alors que pour toutes les souris contrôles on détecte un certain pourcentage de cellules amétrine positive (de 3 à 70%), aucune des souris traitées avec RET-shRNA n'exprime l'amétrine (figure 28-B).



**Figure 29 : Effet de la modulation du niveau d'expression de RET *in vivo***

A) Courbe de survie des souris injectées avec des THP-1 non traités (courbe rouge), des THP-1 transfectés avec un shRNA contrôle (courbe verte) et des THP-1 transfectés avec un shRNA dirigé contre RET (courbe noire). B) Analyse des souris après 45-55 jours et détection de l'amétrine dans les cellules THP-1 (s-shRNA et RET-shRNA).

Ces résultats suggèrent que ces cellules THP-1 dont l'expression de RET a été diminuée ne sont pas capables de survivre *in vivo*. En effet, les cellules transduites avec RET-shRNA ont une expression de RET diminuée d'environ 50%. Or, lorsqu'on injecte ces cellules dans les souris, on n'est plus capable de les détecter. Toutes ces données nous amènent à dire que l'expression de la protéine RET est nécessaire à la survie des cellules leucémiques contenant la translocation MLL-AF9.

### e) Discussion et perspectives

Dans cette deuxième partie de ce mémoire, les analyses réalisées ont permis d'identifier des événements importants impliqués dans le développement et le maintien des LMA contenant la translocation MLL-AF9. Le séquençage « nouvelle génération » permet aujourd'hui d'accroître de façon importante le nombre d'analyse en génomique et permet de faire avancer plus rapidement la recherche, tous domaines confondus. Le séquençage d'ADN et ARN des tumeurs a permis l'identification d'un nombre considérable de mutations qui surviennent dans le développement de LMA [148]. Ces données reflètent la complexité et l'hétérogénéité de la maladie. Cependant, malgré l'identification de nombreuses mutations, le rôle de ces événements génétiques ainsi que leur importance dans le processus leucémique n'est toujours pas clairement défini. Dans ce mémoire, l'étude plus spécifique des LMA impliquant les gènes de fusions MLL a révélé également une grande hétérogénéité génétique. En effet, le séquençage de l'exome de 3 LMA pédiatriques contenant la translocation MLL-AF9 a permis l'identification de nombreuses mutations pertinentes chez chacun des 3 patients, cependant aucune de ces mutations n'était commune aux 3 échantillons analysés. De même, l'analyse du profil d'expression des gènes de 3 LMA pédiatriques MLL-AF9 a montré une grande variabilité génétique entre ces patients.

L'existence de cette grande hétérogénéité génétique rend difficile l'étude et la compréhension des mécanismes survenant au cours du processus leucémique. En effet, certaines mutations pourraient prédisposer au développement de la maladie, mais il est difficile de connaître de façon rétrospective l'impact de ces mutations. Afin de contourner ce problème qui rend difficile l'interprétation de certains résultats, un modèle de leucémies humaines dérivées de cellules de sang de cordon unique a été développé. Ce modèle permet d'isoler cette variable expérimentale et ainsi, l'analyse des cellules initiales sera non seulement possible mais surtout accessible, contrairement aux échantillons cliniques. Pour cela, des cellules CD34<sup>+</sup> ont été purifiées à partir d'un seul donneur pour ensuite être infectées par des rétrovirus contenant le gène de fusion MLL-AF9. Ainsi, on peut séquencer le transcriptome et l'exome des cellules initiales de sang de cordon avant même qu'elles subissent des modifications génétiques. Les différentes leucémies générées à partir

de ces cellules seront également séquencées. De cette façon, il est possible d'analyser la contribution potentielle du *background* génétique du donneur et identifier les mutations acquises au cours du processus leucémique.

Le profil d'expression des gènes de 4 donneurs uniques a été établi et a révélé une expression homogène entre les donneurs, contrairement aux profils observés entre les patients. Ces données nous permettent non seulement de dire que le *background* génétique des donneurs n'intervient pas dans le contexte de ce modèle de leucémies générées à partir de donneurs uniques, mais cela permet également de rendre compte des mutations qui peuvent survenir au cours du développement de la leucémie. De cette façon, il a été possible de séquencer le matériel génétique des cellules CD34+ initiales ainsi que les leucémies générées à partir de ces cellules. L'analyse des données de séquençage n'a révélé aucun nouveau variant. En effet, tous les variants présents dans les leucémies générées étaient déjà présents dans les cellules initiales. Ainsi, les données de séquençage n'ont pas permis d'identifier des mutations secondaires acquises durant le développement des leucémies, ce qui suggère que seul l'oncogène MLL-AF9 suffit pour induire ce processus leucémique.

Plusieurs données viennent appuyer ce résultat comme le fait que les leucémies pédiatriques MLL ont un temps de latence très court, ce qui laisse peu de temps pour la survenue d'évènements secondaires [149]. De plus, il a été démontré que bien souvent, le taux de leucémie MLL coïncide chez les jumeaux monozygotes [66] ce qui suggère qu'un évènement génétique comme la translocation *in utero* d'un gène de fusion MLL serait suffisant à lui seul pour initier le processus leucémique.

L'analyse et la comparaison de nombreuses leucémies MLL-AF9 de patients et celles issues de notre modèle a permis également d'identifier certains biomarqueurs spécifiques à ces leucémies. 39 gènes ont pu être identifiés comme étant exprimés de façon constitutive et non mutés dans les LMA MLL-AF9, ce qui en fait de potentiels biomarqueurs pour ce groupe de LMA. En effet, en plus d'être absent dans les cellules CD34+ initiales, ces gènes sont également absents dans les LLA-B générées dans notre modèle et dans des échantillons de tissus sains, ce qui en fait d'autant plus de bons candidats. Cette analyse prend non seulement en compte les résultats obtenus *in vivo* (CD34+, LMA, LLA-B), mais elle permet également de comparer ces données à des échantillons cliniques (échantillons cliniques de patients leucémiques et tissus sains). Cela permet d'avoir une vision globale tout en renforçant la cohérence de ces résultats.

La sélection de ces gènes candidats n'est cependant pas restreinte aux LMA MLL-AF9. En effet, la base de données TCGA AML a également été incluse dans ces critères d'analyse ce qui laisse supposer que certains de ces gènes candidats ne sont pas spécifiques aux LMA MLL-AF9 mais peuvent être exprimés dans d'autres sous-groupes de LMA [150].

Afin de cibler les gènes candidats exprimés de façon spécifique dans les LMA contenant la translocation MLL-AF9, l'expression de ces gènes a été analysée dans de nombreux échantillons de cellules cancéreuses hématopoïétiques issus de la base de données CCLE. L'expression a été comparé entre des lignées contenant la translocation MLL-AF9 et d'autres ne la contenant pas. Ces résultats ont permis de caractériser un certain nombre de gènes candidats comme étant spécifique aux LMA MLL-AF9.

Parmi ces gènes candidats, RET a été étudié plus spécifiquement. Ce récepteur tyrosine kinase a déjà été rapporté comme étant un proto-oncogène fréquemment muté dans les carcinomes médullaires de la thyroïde et les néoplasies endocriniennes multiples (NEM) de type 2A et 2B [151]. Cependant, dans notre cas RET ne présente aucune mutation, ce qui en fait d'autant plus un candidat idéal comme biomarqueur. En effet, dans notre modèle de leucémie, RET est ressorti comme étant exprimé de façon constitutive dans les LMA MLL-AF9. De plus, la présence de la protéine a été validée dans des échantillons de patients. Il semblerait donc que RET ait un rôle à jouer dans le développement de ces leucémies. Pour vérifier cela, un modèle où l'expression de RET est diminuée (via des shRNA) a été élaboré. Les données *in vitro* ont permis de mettre en avant l'effet positif de RET dans le maintien et dans la croissance des cellules leucémiques (lignée leucémique THP-1 contenant la translocation MLL-AF9). En effet, la diminution de l'expression de RET diminue de façon drastique la viabilité cellulaire. Cet effet a également été testé *in vivo* et les résultats ont confirmés l'effet positif de RET sur le maintien des cellules leucémiques. L'analyse spécifique de RET a donc permis de mettre en évidence son rôle essentiel dans la croissance et le maintien *in vivo* ainsi qu'*in vitro* des LMA MLL-AF9.

Afin de tester l'effet de RET *in vivo*, ces mêmes cellules THP-1 transfectées avec des shRNA contrôles ou dirigés contre RET ont été injectées dans des souris immunodéficientes. Les souris ayant reçu les THP-1 où l'expression de RET avait été diminuée présentaient une survie prolongée. De façon intéressante, l'analyse de l'ensemble de ces cellules THP-1 (issues de la moelle osseuse) n'a pas permis de détecter la présence de cellules amétrine positives (marqueur fluorescent des shRNA). Ces résultats indiquent donc que les cellules leucémiques contenant la translocation MLL-AF9 requièrent l'expression de RET pour leur survie.

RET semble être essentiel au maintien de ces cellules leucémiques *in vivo*. Également, son expression n'a pas été détectée dans les cellules CD34+ humaines initiales. Une étude récente a cependant mis en évidence la nécessité de l'expression de RET pour la survie et le maintien des CSH murines [152]. Dans cette étude, les auteurs ont montrés que la suppression de RET chez des souris entraînait une réduction du nombre de CSH. De plus, les signaux de survie Bcl2 et Bcl2l1 ont pu être identifié comme étant situé en amont de la signalisation de RET. Ainsi, cette étude montre que l'apport de RET sauvage chez des

souris déficientes pour RET permet de restaurer rapidement le niveau d'expression de ces deux gènes anti-apoptotiques. Dans notre modèle de LMA MLL-AF9, aucune expression spécifique de Bcl2 n'a pu être observée. Cependant Bcl10, un gène de la même famille, semble être régulé de façon positive dans ces leucémies, ce qui suggère qu'il y a sans doute un mécanisme de survie commun aux CSH normales et aux cellules leucémiques.

L'identification de ces gènes comme potentiels biomarqueurs de ce groupe de LMA permet d'envisager une thérapie ciblée. En effet, une partie de ces gènes identifiés sont exprimés à la surface cellulaire, ce qui en fait une cible facile d'accès. On peut donc envisager une thérapie utilisant un anticorps spécifique capable de cibler ces protéines et ainsi moduler leur expression. Outre l'aspect thérapeutique, ces gènes peuvent être utilisés comme marqueurs dans le diagnostic de ces LMA.

Ce modèle de leucémie nous a donc permis de comparer le profil d'expression génique des différentes leucémies MLL-AF9 issues d'un même donneur. Idéalement, l'analyse des profils pourra se faire avec les leucémies générées avec les quatre fusions MLL étudiées dans la première partie, et ce à partir d'un donneur unique. La comparaison des profils génétique permettrait d'identifier éventuellement des motifs spécifiques à chaque différent sous-groupe de leucémies et le besoin d'évènements secondaires serait également évalué avec les autres fusions MLL. Un modèle de délétion du gène de fusion MLL est également testé au sein du laboratoire afin d'évaluer la dépendance de la leucémie à l'oncogène MLL. Pour cela, un système LoxP/Cre recombinaise est utilisé.

Ensemble, ces données nous permettent de mieux comprendre le processus leucémique et ainsi caractériser les évènements importants qui interviennent dans le développement des leucémies MLL.

## V. Conclusion

Les modèles *in vivo* de leucémies humaines permettent aujourd'hui de mieux comprendre le processus leucémogénique. Dans ce mémoire, le modèle de souris immunodéficientes utilisé permet d'étudier la transformation de cellules hématopoïétiques souches et progénitrices humaines en cellules leucémiques capables d'induire des leucémies humaines *in vivo*. Ainsi, nous avons pu étudier plus particulièrement les leucémies MLL. Pour cela, quatre gènes de fusion MLL (MLL-AF9, MLL-ENL, MLL-ELL et MLL-AF4) ont été testés afin d'évaluer leur potentiel leucémique et ainsi comparer ces fusions dans un même contexte.

Les données obtenues dans ce mémoire nous ont permis de mettre en évidence le potentiel leucémique des fusions MLL-ENL ainsi que MLL-AF9. Lorsque les cellules sont transformées avec ces oncogènes, dans la majorité des cas le processus leucémique va être initié et la leucémie va se développer. De façon générale, ces deux fusions ne semblent pas être spécifiques d'un phénotype leucémique, bien qu'avec MLL-ENL une majorité de LLA-B a été observée. Concernant les fusions MLL-ELL et MLL-AF4, il semblerait que le potentiel leucémique de ces oncogènes soit plus difficile à démontrer. En effet, bien que quelques leucémies aient pu être obtenues, plusieurs problèmes techniques ne nous permettent pas aujourd'hui de posséder un modèle efficace pour l'étude de ces leucémies. Plusieurs questions se posent comme l'exactitude de la cellule ciblée par la transformation. En effet, la translocation pourrait cibler une cellule à un stade de maturation différent que nos cellules CD34+. Avec la fusion MLL-AF4, la taille de la fusion est aussi un inconvénient. Cela pourrait venir perturber l'efficacité de la transduction rétrovirale dans les cellules cibles. Il y a également de nombreuses études qui laissent supposer la nécessité d'évènements secondaires nécessaires pour initier la transformation leucémique.

A ce jour, nos expériences ne nous ont pas permis d'obtenir un modèle parfait nous permettant de comparer les différentes leucémies MLL dans un même contexte. Bien que pour certaines fusions, des caractéristiques ont pu être mises en évidence, certaines données sont aujourd'hui encore manquantes afin de pouvoir évaluer et comparer le profil d'expression génique de ces fusions MLL.

Parallèlement à cette étude, l'étude plus spécifique des leucémies MLL-AF9 a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques de ce sous-groupe de leucémie. Dans un premier temps il a été démontré que seule la translocation MLL-AF9 est nécessaire pour initier le processus leucémique. De plus, l'analyse des cellules souches à l'origine de la transformation leucémique a révélé l'existence d'un certain nombre de biomarqueurs intéressants de ce sous-groupe de leucémie. En effet, ce modèle d'étude unique permet d'analyser et de suivre les cellules à l'origine de la transformation afin de mieux comprendre les processus qui sont à l'origine des leucémies et de leur progression. Parmi



ces gènes identifiés, RET a été analysé plus spécifiquement et a révélé une importance particulière pour la survie *in vivo* des leucémies myéloïdes MLL-AF9. En effet, la présence de la protéine RET semble indispensable au maintien *in vivo* des cellules transformées avec MLL-AF9 alors que la diminution de son expression semble quant à elle retarder le développement de la maladie clinique et ainsi prolonger la durée de vie des souris. Les études *in vitro* de RET viennent appuyer ces résultats. En effet, lorsque l'expression de RET est diminuée dans des lignées de cellules leucémiques contenant la translocation MLL-AF9, la viabilité cellulaire semble altérée.

En conclusion, la meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et l'élucidation des événements génétiques impliqués dans la genèse des leucémies MLL permettent de mieux comprendre le processus leucémique et permettent d'envisager une amélioration du diagnostic ainsi que de nouveaux traitements, notamment pour les leucémies à pronostics défavorables.

## Références

1. Doulatov, S., et al., *Hematopoiesis: a human perspective*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(2): p. 120-36.
2. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
3. Orkin, S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 57-64.
4. Cumano, A. and I. Godin, *Ontogeny of the hematopoietic system*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 745-85.
5. Bhandoola, A., et al., *Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 678-89.
6. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *B cell development pathways*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 595-621.
7. Godin, I. and A. Cumano, *The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 593-604.
8. McCulloch, E.A. and J.E. Till, *The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice*. Radiation research, 1960. **13**(1): p. 115-125.
9. Till, J.E. and E.A. McCulloch, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961*. Radiat Res, 2012. **178**(2): p. AV3-7.
10. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. **197**: p. 452-4.
11. Thomas, E.D., *Frontiers in bone marrow transplantation*. Blood cells, 1991. **17**(2): p. 259-67.
12. Storb, R.F., et al., *Hematopoietic cell transplantation for benign hematological disorders and solid tumors*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 372-97.
13. Daley, G.Q., *Stem cells: roadmap to the clinic*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 8-10.
14. Scadden, D.T., *The stem-cell niche as an entity of action*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1075-1079.
15. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-673.
16. Morrison, S.J., D.E. Wright, and I.L. Weissman, *Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1908-13.
17. Civin, C.I., et al., *Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells*. The Journal of Immunology, 1984. **133**(1): p. 157-165.
18. Murray, L., et al., *Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood*. Blood, 1995. **85**(2): p. 368-78.

19. Bhatia, M., et al., *Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(10): p. 5320-5325.
20. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood cells, 1977. **4**(1-2): p. 7-25.
21. Moore, K.A., *Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(2): p. 107-11.
22. Broudy, V.C., *Stem cell factor and hematopoiesis*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1345-64.
23. Chabot, B., et al., *The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus*. Nature, 1988. **335**(6185): p. 88-9.
24. Akdis, M., et al., *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 701-21 e1-70.
25. Gurney, A.L. and F.J. de Sauvage, *Dissection of c-Mpl and thrombopoietin function: studies of knockout mice and receptor signal transduction*. Stem Cells, 1996. **14 Suppl 1**: p. 116-23.
26. Lyman, S.D. and S.E. Jacobsen, *c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities*. Blood, 1998. **91**(4): p. 1101-34.
27. Mackarechtschian, K., et al., *Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors*. Immunity, 1995. **3**(1): p. 147-61.
28. Maeurer, M.J. and M.T. Lotze, *Tumor recognition by the cellular immune system: new aspects of tumor immunology*. Int Rev Immunol, 1997. **14**(2-3): p. 97-132.
29. Matsunaga, T., et al., *Negative regulation by interleukin-3 (IL-3) of mouse early B-cell progenitors and stem cells in culture: transduction of the negative signals by betac and betaIL-3 proteins of IL-3 receptor and absence of negative regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1998. **92**(3): p. 901-7.
30. McKenna, H.J., et al., *Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3489-3497.
31. Nandurkar, H.H., et al., *Adult mice with targeted mutation of the interleukin-11 receptor (IL11Ra) display normal hematopoiesis*. Blood, 1997. **90**(6): p. 2148-2159.
32. Lim, M., et al., *Intelligent bioprocessing for haemotopoietic cell cultures using monitoring and design of experiments*. Biotechnology advances, 2007. **25**(4): p. 353-368.
33. Blank, U., G. Karlsson, and S. Karlsson, *Signaling pathways governing stem-cell fate*. Blood, 2008. **111**(2): p. 492-503.
34. Borge, O.J., et al., *Thrombopoietin, but not erythropoietin promotes viability and inhibits apoptosis of multipotent murine hematopoietic progenitor cells in vitro*. Blood, 1996. **88**(8): p. 2859-2870.
35. Sauvageau, G., N.N. Iscove, and R.K. Humphries, *In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells*. Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7223-32.
36. Shivdasani, R.A., E.L. Mayer, and S.H. Orkin, *Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL*. Nature, 1995. **373**(6513): p. 432-4.
37. Putz, G., et al., *AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas*. Oncogene, 2006. **25**(6): p. 929-39.

38. Mikkola, H.K., et al., *Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene*. Nature, 2003. **421**(6922): p. 547-51.
39. Ichikawa, M., et al., *AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4402-8.
40. Ichikawa, M., et al., *AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis*. Nature medicine, 2004. **10**(3): p. 299-304.
41. Varnum-Finney, B., et al., *Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling*. Nat Med, 2000. **6**(11): p. 1278-81.
42. Stier, S., et al., *Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2369-78.
43. Mancini, S.J., et al., *Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2340-2342.
44. Austin, T.W., et al., *A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3624-35.
45. Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 409-14.
46. Duncan, A.W., et al., *Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance*. Nat Immunol, 2005. **6**(3): p. 314-22.
47. Tan, J.C., et al., *The dominant W42 spotting phenotype results from a missense mutation in the c-kit receptor kinase*. Science, 1990. **247**(4939): p. 209-12.
48. Ashman, L.K., *The biology of stem cell factor and its receptor C-kit*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(10): p. 1037-51.
49. Herbst, R., et al., *Differential effects of W mutations on p145c-kit tyrosine kinase activity and substrate interaction*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13210-6.
50. Blank, U. and S. Karlsson, *The role of Smad signaling in hematopoiesis and translational hematology*. Leukemia, 2011. **25**(9): p. 1379-88.
51. Karlsson, G., et al., *Smad4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells*. The Journal of experimental medicine, 2007. **204**(3): p. 467-474.
52. Caceres-Cortes, J., et al., *Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 12084-91.
53. Rajotte, D., et al., *Contribution of both STAT and SRF/TCF to c-fos promoter activation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1996. **88**(8): p. 2906-2916.
54. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.
55. Reik, W., W. Dean, and J. Walter, *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1089-93.
56. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33**: p. 245-254.

57. Eberharter, A. and P.B. Becker, *Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin*. EMBO reports, 2002. **3**(3): p. 224-229.
58. Azuara, V., et al., *Chromatin signatures of pluripotent cell lines*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(5): p. 532-8.
59. Spivakov, M. and A.G. Fisher, *Epigenetic signatures of stem-cell identity*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 263-71.
60. Rice, K.L., I. Hormaeche, and J.D. Licht, *Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6697-714.
61. Tagoh, H., et al., *Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells*. Genes Dev, 2002. **16**(13): p. 1721-1737.
62. Bruno, L., et al., *Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(2): p. 741-756.
63. Ono, R., T. Nosaka, and Y. Hayashi, *Roles of a trithorax group gene, MLL, in hematopoiesis*. Int J Hematol, 2005. **81**(4): p. 288-93.
64. Attema, J.L., et al., *Epigenetic characterization of hematopoietic stem cell differentiation using miniChIP and bisulfite sequencing analysis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(30): p. 12371-12376.
65. Ford, A.M., et al., *In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias*. Nature, 1993. **363**(6427): p. 358-60.
66. Greaves, M.F., et al., *Leukemia in twins: lessons in natural history*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2321-33.
67. Bueno, C., et al., *Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement*. Leukemia, 2011. **25**(3): p. 400-410.
68. Dick, J.E. and T. Lapidot, *Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells*. Int J Hematol, 2005. **82**(5): p. 389-96.
69. Wang, J.C. and J.E. Dick, *Cancer stem cells: lessons from leukemia*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(9): p. 494-501.
70. Vardiman, J.W., *The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms*. Chem Biol Interact, 2010. **184**(1-2): p. 16-20.
71. Heim, S. and F. Mitelman, *Cancer cytogenetics: chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells* 2011: John Wiley & Sons.
72. Rubnitz, J.E. and W.M. Crist, *Molecular genetics of childhood cancer: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment*. Pediatrics, 1997. **100**(1): p. 101-108.
73. Meyer, C., et al., *The MLL recombinome of acute leukemias in 2013*. Leukemia, 2013. **27**(11): p. 2165-76.
74. Forman, S.J. and J.M. Rowe, *The myth of the second remission of acute leukemia in the adult*. Blood, 2013. **121**(7): p. 1077-82.
75. Fielding, A.K., et al., *Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study*. Blood, 2007. **109**(3): p. 944-50.
76. Moorman, A.V., et al., *Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on*

- the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. Blood, 2007. 109(8): p. 3189-3197.*
77. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.*
  78. Tallen, G., et al., *Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. Journal of Clinical Oncology, 2010. 28(14): p. 2339-2347.*
  79. Chessells, J.M., et al., *The impact of age on outcome in lymphoblastic leukaemia; MRC UKALL X and XA compared: a report from the MRC Paediatric and Adult Working Parties. Leukemia, 1998. 12(4): p. 463-73.*
  80. Nachman, J., *Treatment of Adolescents and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia*, in *Treatment of Acute Leukemias 2003*, Springer. p. 121-128.
  81. Döhner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood, 2010. 115(3): p. 453-474.*
  82. Bradley, C.J., et al., *Acute myeloid leukemia. Cancer, 2011. 117(20): p. 4772-4778.*
  83. Ansari, K.I. and S.S. Mandal, *Mixed lineage leukemia: roles in gene expression, hormone signaling and mRNA processing. FEBS J, 2010. 277(8): p. 1790-804.*
  84. Hess, J.L., et al., *Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. Blood, 1997. 90(5): p. 1799-1806.*
  85. Marschalek, R., *Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. FEBS journal, 2010. 277(8): p. 1822-1831.*
  86. Krivtsov, A.V. and S.A. Armstrong, *MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. Nat Rev Cancer, 2007. 7(11): p. 823-33.*
  87. Liu, H., E.H. Cheng, and J.J. Hsieh, *MLL fusions: pathways to leukemia. Cancer Biol Ther, 2009. 8(13): p. 1204-11.*
  88. Rabbitts, T.H., *Chromosomal translocations in human cancer. Nature, 1994. 372(6502): p. 143-9.*
  89. Luo, Z., C. Lin, and A. Shilatifard, *The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. 13(9): p. 543-7.*
  90. Yokoyama, A. and M.L. Cleary, *Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. Cancer Cell, 2008. 14(1): p. 36-46.*
  91. Armstrong, S.A., T.R. Golub, and S.J. Korsmeyer, *MLL-rearranged leukemias: insights from gene expression profiling. Semin Hematol, 2003. 40(4): p. 268-73.*
  92. Yu, B.D., et al., *Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. Nature, 1995. 378(6556): p. 505-8.*
  93. Ayton, P., et al., *Truncation of the Mll gene in exon 5 by gene targeting leads to early preimplantation lethality of homozygous embryos. Genesis, 2001. 30(4): p. 201-12.*
  94. Yagi, H., et al., *Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. Blood, 1998. 92(1): p. 108-17.*
  95. Hess, J.L., et al., *Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. Blood, 1997. 90(5): p. 1799-806.*
  96. Ernst, P., et al., *Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. Dev Cell, 2004. 6(3): p. 437-43.*

97. Benjamin, D.Y., et al., *MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(18): p. 10632-10636.
98. Fidanza, V., et al., *Double knockout of the ALL-1 gene blocks hematopoietic differentiation in vitro*. Cancer research, 1996. **56**(6): p. 1179-1183.
99. Li, Z., D. Liu, and C. Liang, *New insight into the molecular mechanisms of MLL-associated leukemia*. Leukemia, 2005. **19**(2): p. 183-190.
100. Zeleznik-Le, N.J., A.M. Harden, and J.D. Rowley, *11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(22): p. 10610-10614.
101. Tkachuk, D.C., S. Kohler, and M.L. Cleary, *Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias*. Cell, 1992. **71**(4): p. 691-700.
102. Cross, S.H., et al., *A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins*. Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 256-9.
103. Hendrich, B. and A. Bird, *Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6538-47.
104. Birke, M., et al., *The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(4): p. 958-65.
105. Xia, Z.B., et al., *MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8342-7.
106. Ayton, P.M. and M.L. Cleary, *Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins*. Oncogene, 2001. **20**(40).
107. Hsieh, J.J., E.H. Cheng, and S.J. Korsmeyer, *Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression*. Cell, 2003. **115**(3): p. 293-303.
108. De Braekeleer, M., et al., *The MLL gene and translocations involving chromosomal band 11q23 in acute leukemia*. Anticancer Res, 2005. **25**(3B): p. 1931-44.
109. Schichman, S.A., et al., *ALL-1 partial duplication in acute leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 6236-9.
110. Marschalek, R., *Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins*. Br J Haematol, 2011. **152**(2): p. 141-54.
111. Rowley, J.D. and H.J. Olney, *International workshop on the relationship of prior therapy to balanced chromosome aberrations in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: overview report*. Genes Chromosomes Cancer, 2002. **33**(4): p. 331-45.
112. Wolman, I.J., *Parallel responses to chemotherapy in identical twin infants with concordant leukemia*. J Pediatr, 1962. **60**: p. 91-5.
113. Strong, S.J., G. Corney, and J.C. Moir, *The placenta in twin pregnancy* 1967: Pergamon Press Oxford.
114. Wiemels, J.L., et al., *Microclustering of TEL-AML1 translocation breakpoints in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2000. **29**(3): p. 219-228.

115. Ford, A.M., et al., *Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(8): p. 4584-4588.
116. Wiemels, J.L., et al., *Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children*. Lancet, 1999. **354**(9189): p. 1499-503.
117. Kempfski, H., et al., *Prenatal chromosomal diversification of leukemia in monozygotic twins*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2003. **37**(4): p. 406-411.
118. Corral, J., et al., *An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes*. Cell, 1996. **85**(6): p. 853-861.
119. Chen, W., et al., *A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy*. Blood, 2006. **108**(2): p. 669-77.
120. Dorrance, A.M., et al., *Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2707-16.
121. Wang, J., et al., *Conditional MLL-CBP targets GMP and models therapy-related myeloproliferative disease*. EMBO J, 2005. **24**(2): p. 368-81.
122. Forster, A., et al., *Engineering de novo reciprocal chromosomal translocations associated with Mll to replicate primary events of human cancer*. Cancer Cell, 2003. **3**(5): p. 449-58.
123. Lavau, C., et al., *Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL*. EMBO J, 1997. **16**(14): p. 4226-37.
124. Somervaille, T.C. and M.L. Cleary, *Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2006. **10**(4): p. 257-68.
124. Bernd B. Zeisig, et al., *Reconstructing the Disease Model and Epigenetic Networks for MLL-AF4 Leukemia*. Cancer cell, **14**(5), 345-347.
125. Barabe, F., et al., *Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice*. Science, 2007. **316**(5824): p. 600-4.
126. Fares, I., et al., *Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal*. Science, 2014. **345**(6203): p. 1509-12.
127. Check, E., *Draft mouse genome makes public debut*. Nature, 2002. **417**(6885): p. 106.
128. Leiter, E.H., *The NOD mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease*. ILAR Journal, 1993. **35**(1): p. 4-14.
129. Serreze, D.V. and E.H. Leiter, *Defective activation of T suppressor cell function in nonobese diabetic mice. Potential relation to cytokine deficiencies*. The Journal of Immunology, 1988. **140**(11): p. 3801-3807.
130. Shultz, L.D., et al., *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 180-91.
131. Shultz, L.D., et al., *Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6477-89.
132. Ito, M., et al., *NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3175-82.



133. Greiner, D.L., R.A. Hesselton, and L.D. Shultz, *SCID mouse models of human stem cell engraftment*. Stem Cells, 1998. **16**(3): p. 166-77.
134. Gu, Y., et al., *The t (4; 11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene*. Cell, 1992. **71**(4): p. 701-708.
135. Lavau, C., et al., *Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL*. The EMBO journal, 1997. **16**(14): p. 4226-4237.
136. Dobson, C.L., et al., *The mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis*. EMBO J, 1999. **18**(13): p. 3564-74.
137. Wei, J., et al., *Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia*. Cancer Cell, 2008. **13**(6): p. 483-95.
138. Deneault, E., et al., *Identification of non-cell-autonomous networks from engineered feeder cells that enhance murine hematopoietic stem cell activity*. Experimental hematology, 2013. **41**(5): p. 470-478. e4.
139. Csaszar, E., et al., *Rapid expansion of human hematopoietic stem cells by automated control of inhibitory feedback signaling*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(2): p. 218-29.
140. Huntly, B.J. and D.G. Gilliland, *Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(4): p. 311-321.
141. Warner, J.K., et al., *Concepts of human leukemic development*. Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7164-77.
142. Mulloy, J.C., et al., *Transforming human blood stem and progenitor cells: a new way forward in leukemia modeling*. Cell Cycle, 2008. **7**(21): p. 3314-9.
143. Rozenveld-Geugien, M., et al., *Expansion of normal and leukemic human hematopoietic stem/progenitor cells requires rac-mediated interaction with stromal cells*. Exp Hematol, 2007. **35**(5): p. 782-92.
144. van Gosliga, D., et al., *Establishing long-term cultures with self-renewing acute myeloid leukemia stem/progenitor cells*. Exp Hematol, 2007. **35**(10): p. 1538-49.
145. Montes, R., et al., *Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia*. Blood, 2011. **117**(18): p. 4746-4758.
146. Bursen, A., et al., *The AF4-MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL-AF4*. Blood, 2010. **115**(17): p. 3570-3579.
147. Kumar, A.R., et al., *t (4; 11) leukemias display addiction to MLL-AF4 but not to AF4-MLL*. Leukemia research, 2011. **35**(3): p. 305-309.
148. Network, C.G.A.R., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(22): p. 2059.
149. Dimartino, J.F. and M.L. Cleary, *Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies*. Br J Haematol, 1999. **106**(3): p. 614-26.
150. Lavallée, V.-P., et al., *The transcriptomic landscape and directed chemical interrogation of MLL-rearranged acute myeloid leukemias*. Nat Genet, 2015.
151. Atanackovic, D., et al., *Expression of cancer-testis antigens as possible targets for antigen-specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer biology & therapy, 2006. **5**(9): p. 1218-1225.

152. Fonseca-Pereira, D., et al., *The neurotrophic factor receptor RET drives haematopoietic stem cell survival and function*. Nature, 2014. **514**(7520): p. 98-101.