

UNIVERSITE DE LILLE – NORD DE FRANCE

Ecole doctorale « Biologie-Santé »

Thèse de doctorat

Spécialité Cancérologie

Présentée par **Alexia MOPIN**

Développement d'un modèle murin syngénique et immun de leucémie aiguë myéloïde et de maladie résiduelle mesurable surexprimant ou non le gène Wilms Tumor 1

Thèse dirigée par le Dr Carine BRINSTER

Soutenue le 07 décembre 2018

Membres du jury :

Dr Virginie Penard-Lacronique

Pr Olivier Hérault

Dr Michael Perrais

Pr Bruno Quesnel

Unité de Recherche : INSERM UMRS-1172, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert (JPArC), Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL)

Equipe « Facteurs de persistance des cellules tumorales »

Résumé

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes hétérogènes déclenchées, dans la plupart des cas, par des anomalies génétiques (mutations, translocations ou inversions). Elles se caractérisent par un blocage de la différenciation de certains progéniteurs ou précurseurs hématopoïétiques (blastés) et leur prolifération clonale incontrôlée provoquant leur accumulation dans la moelle osseuse. Le traitement actuel de ces patients repose essentiellement sur l'utilisation d'agents de chimiothérapie (cytarabine associée à une anthracycline) permettant d'éliminer les cellules leucémiques et d'obtenir une rémission complète (RC) (définie morphologiquement comme une moelle osseuse normale avec moins de 5% de blastés). Cette RC est obtenue chez une majorité des patients mais plus d'un patient sur deux va rechuter quelques mois après l'arrêt du traitement. Ces rechutes attestent de la persistance de cellules leucémiques résiduelles après le traitement, que l'on appelle maladie résiduelle mesurable (MRD). Celle-ci a été mise en évidence grâce au développement de technologies performantes et sensibles tels que la cytométrie en flux multi-paramétrique et la PCR en temps réel (qPCR) permettant ainsi la détection de profils d'expression ou d'anomalies génétiques associés aux LAM. A ce jour, plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer la présence de cette MRD. Celle-ci peut être causée par une résistance au traitement de certains sous-clones leucémiques (anomalies génétiques intrinsèques leur conférant une résistance ou un phénotype quiescent) ou par la présence de cellules souches leucémiques (naturellement quiescentes). Le système immunitaire pourrait également jouer un rôle en induisant la quiescence de certaines cellules les rendant résistantes aux chimiothérapies conventionnelles, ou en contrôlant leur croissance tumorale par l'établissement d'un état d'équilibre entre leur prolifération et leur lyse. Les modèles murins de LAM actuellement utilisés permettent d'étudier la leucémogénèse et l'efficacité thérapeutique de certains composés mais font abstraction du rôle de la réponse immunitaire dans ces processus du fait de leur immunodéficiences. De plus, aucun modèle murin de MRD leucémique n'existe pour étudier les causes de la persistance cancéreuse après traitement par chimiothérapie.

Ainsi, le but de cette thèse a été de développer un modèle murin syngénique et immunocompétent de MRD leucémique sur-exprimant ou non le gène Wilms' Tumor 1 (WT1). WT1 est un des rares antigènes décrits dans les LAM et une réponse lymphocytaire cellulaire et humorale dirigée contre cette protéine a été décrite chez ces patients. La création de ce

modèle sur-exprimant ou non WT1 permettra ainsi d'étudier le rôle de la réponse immunitaire spécifique de celui-ci dans la persistance leucémique.

Pour développer ce modèle nous avons, dans un premier temps, caractérisé phénotypiquement et génotypiquement des sous-clones isolés de la lignée leucémique C1498 capable d'induire une LAM de type myélo-monocytaire chez des souris immunocompétentes C57BL/6J. Dans un deuxième temps, certains sous-clones ont été sélectionnés pour leur sensibilité à la cytarabine et transfectés de manière à exprimer stablement une protéine fluorescente (ZsGreen) en association ou non avec la protéine WT1. Enfin, ce modèle de MRD leucémique a été obtenu en modulant la quantité de cellules leucémiques injectée ainsi que la cinétique et la dose d'injection de la cytarabine. La MRD a été suivie par cytométrie en flux (expression ZsGreen) et par qPCR (expression ZsGreen et/ou de Wt1) dans le sang et la moelle osseuse des souris survivantes grâce au traitement.

Nous avons ainsi générer un modèle murin syngénique et immunocompétent de MRD leucémique qui pourra permettre d'étudier les mécanismes immunologiques impliqués dans la persistance leucémique après traitement et d'envisager de nouvelles stratégies (immuno)-thérapeutiques capables d'éliminer ces cellules résiduelles.

Mots clés :

Leucémie aiguë myéloïde, Maladie résiduelle mesurable, Modèle murin, Wilms' tumor 1

Abstract

Development of a syngeneic and immune mouse model of acute myeloid leukemia and measurable residual disease expressing or not Wilms' Tumor 1 gene

Acute myeloid leukemia (AML) is a genetic disorder leading to a blockade of differentiation and a clonal expansion of hematopoietic progenitors or precursors (called blasts) which accumulate in the bone marrow and then invade the blood stream. Conventional treatment relies on the use of chemotherapy agents (cytarabine in combination with an anthracycline) to eliminate leukemia cells and achieve complete remission (defined as normal bone marrow morphology with less than 5% blasts). This complete remission is achieved in a majority of patients but more than 50% of them will relapse several months after the treatment. These relapses indicate the presence of residual leukemic cells after treatment, known as measurable residual disease (MRD). It has been highlighted by the development of efficient and sensitive molecular biology technologies such as multi-parameter flow cytometry and real-time PCR allowing the detection of AML-associated expression patterns and genetic abnormalities. Several mechanisms have been described that can explain the presence of this MRD. It may be caused by the resistance to treatment of certain leukemic sub-clones (resistance-conferring mutations or quiescent phenotype) or the presence of leukemic stem cells. Finally, the immune system could also induce the quiescence of certain leukemic cells rendering them resistant to conventional chemotherapies, or control their growth leading to a state of equilibrium between their proliferation and lysis. Several AML mouse models allow the study of leukemogenesis and the testing of new therapeutic agents for leukemic cells eradication. However, they are mostly based on the transfer of human leukemic cells in immune-deficient mice and do not provide information about the role of the immune system in the leukemic cell survival, sub-clonal expansion or persistence. Moreover, there is still no available leukemia MRD mouse model allowing the study of leukemic cell persistence after chemotherapy treatment.

According to these findings, the aim of this thesis was to develop a syngeneic and immune-competent mouse model of leukemia MRD overexpressing or not the Wilms' Tumor 1 (WT1) gene. The WT1 protein is described as an antigen associated with AML and is targeted by specific lymphocyte cellular and humoral responses in AML-affected patients. Creating a syngeneic and immune-competent leukemia MRD mouse model overexpressing or not this

antigen will allow determining the role of this specific immune response in the cancer cell persistence.

To set up this model, we first phenotyped and genotyped sub-clones isolated from the murine C1498 leukemic cell line able to induce a myelo-monocytic AML in immune-competent C57BL/6J mice. In a second step, certain sub-clones were selected for their sensitivity to cytarabine treatment and transfected to stably express the fluorescent ZsGreen protein with or without the WT1 antigen. Lastly, the MRD mouse model was obtained after modulation of various parameters such as the amount of leukemic cells administered, the kinetics and injection doses of chemotherapy. The leukemia MRD was monitored by flow cytometry (expression of the ZsGreen protein) and by real-time PCR (expression of the *ZsGreen* and/or *Wt1* genes) in the peripheral blood and the bone marrow of treated and surviving mice.

Thus, we generated a syngeneic and immune-competent leukemia MRD mouse model useful to study the immune mechanisms involved in the persistence of leukemic cell after treatment and to test new (immune)-therapeutic strategies targeting these residual cells.

Keywords :

Acute myéloid leukemia, Mesurable residual disease, Mouse model, Wilms' tumor 1

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le professeur Bruno Quesnel de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche travaillant sur les « Facteurs de persistance des cellules tumorales ».

Je tiens à exprimer mes remerciements au docteur Carine Brinster qui fut dans un premier temps ma directrice de master 2 et par la suite ma directrice de thèse. Je tiens à la remercier pour m'avoir fait confiance lors de la réalisation de ce projet scientifique. Merci, également, pour son encadrement, ses nombreux conseils durant ces quatre années et lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse, le professeur Olivier Hérault, le docteur Virginie Pénard-Lacronique et le docteur Michael Perrais d'avoir accepté de lire ce manuscrit et de participer à la présentation de ces travaux de thèse.

Cette thèse n'aurait pu se faire sans le financement de ma bourse doctorale par le CHRU de Lille et la région des Hauts de France.

De plus, ce travail n'aurait pu être possible sans le soutien et l'aide de nombreuses personnes de cette équipe, du bâtiment IRCL et du centre de recherche Jean Pierre Aubert.

Merci à Ossama pour l'aide qu'il m'a apporté durant cette dernière année, les longues journées « souris, CTL, cytométrie... » ont paru plus courtes à deux ! La thèse, c'est maintenant ton tour !

En parlant de cytométrie, je tiens à remercier Emilie et Nathalie pour l'aide qu'elles m'ont apportée durant ces nombreuses heures passées devant « bébé Cyan ». Nathalie, merci également pour les remarques utiles lors de la relecture du manuscrit.

Je souhaite également remercier l'ensemble du personnel de l'animalerie EOPS qui, indirectement, a participé au bon déroulement de cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Marie-Claire, qui, en plus d'être une personne formidable, m'a donné le goût de l'enseignement et sans qui je n'aurais certainement pas trouvé ma voie. Ainsi qu'un grand merci à l'ensemble de mes collègues d'Histologie que je n'oublierais pas, Ariane, Coline, Marion et Mégane.

Mélanie, je ne pouvais écrire ces remerciements sans t'y accorder une place. Tu as été là durant toute cette thèse, même encore maintenant que tu vis au pays « du meuble en kit ». Tu m'as notamment appris certaines techniques et tu as participé à la relecture de ce manuscrit de thèse. Tu as été plus qu'une collègue, tu es devenue une amie.

Yasmine, merci pour tes nombreux conseils tant sur le plan professionnel que personnel. Tu resteras une des plus belles rencontres de ces années et tu auras su embellir chaque journée.

Merci à Thierry pour les discussions matinales ou lors des pauses déjeuners, qu'elles aient été scientifiques ou non. Et surtout pour votre dévouement s'agissant de présenter non pas un mais deux posters à Montréal !

Merci à Elisabeth, pour la gestion exemplaire de la pièce de culture mais surtout pour les pauses littéraires, les conseils « voyage », ou encore les cours de mastication et de grimaces en tout genre !

Merci à Adeline, Mélanie, Quentin, Samy, Hassiba, pour votre bonne humeur, vos conseils divers et variés et également pour nos moments de rigolade au laboratoire ou en dehors.

Je tiens à remercier également, Isabelle, Pascaline, Micheline, Matthias, Corinne, Murielle, Michel, Céline, Michèle, et Nathalie pour leurs compétences diverses et leur sympathie.

Je souhaite remercier plus personnellement ma famille et mes amis que j'ai quelque peu oublié ces derniers temps pour finaliser mon projet de thèse. Merci donc à mes parents et l'ensemble de ma famille qui ont su me soutenir et m'encourager durant ces années.

A mes amis qui vont, eux aussi, soutenir prochainement leurs thèses et qui se reconnaîtront, ainsi qu'à la première d'entre-nous qui est devenue docteur récemment. Et merci à tous les autres, Flore, Quentin, Leslie, Jérôme, Betty, Léa, Sophie, Pierre, Kevin, Stuart et Bob qui ont su me donner le sourire.

Enfin, je tiens à remercier la personne qui partage ma vie et qui a supporté de nombreuses choses durant ces derniers mois dont une table à manger n'accueillant plus que des articles scientifiques et une humeur faisant des yo-yo entre rires et larmes. Un grand merci pour ton soutien, ton amour, tes délicieux repas chaque jour et pour m'avoir « obligée » à m'aérer le corps et l'esprit lors de ces sorties à vélo, ces courses d'orientation,... « *Mens sana in corpore sano* », Satires de Juvénal.

Table des matières

Table des matières.....	- 9 -
Tables des abréviations	- 14 -
Table des figures.....	- 16 -
Table des tableaux.....	- 18 -
INTRODUCTION	- 19 -
Chapitre 1 : Les leucémies aiguës myéloïdes et la maladie résiduelle mesurable.....	- 20 -
I. Les leucémies aiguës myéloïdes, une hématopoïèse bouleversée.....	- 21 -
I. A. Hématopoïèse, la production physiologique des cellules sanguines.....	- 21 -
I. B. les leucémies aiguës myéloïdes, un dérèglement de l'hématopoïèse.....	- 24 -
I. B. 1. les premières descriptions de leucémies	- 24 -
I. B. 2. Généralités	- 24 -
a. Epidémiologie	- 25 -
b. Les facteurs de risque.....	- 27 -
(1) Les facteurs génétiques.....	- 27 -
(2) Les facteurs environnementaux.....	- 28 -
I. B. 3. La leucémogénèse.....	- 29 -
a. Les anomalies et aberrations impliquées dans la leucémie.....	- 29 -
(1) Anomalies activatrices de la prolifération	- 30 -
(a) Mutations du gène FLT3.....	- 30 -
(b) Mutations du gène KIT.....	- 31 -
(c) Mutation des gènes RAS	- 32 -
(2) Anomalies entraînant un blocage de la différenciation.....	- 32 -
(a) Altérations du gène CEBPA.....	- 32 -
(b) Anomalies du gène AML1 (RUNX1)	- 33 -
(c) Altérations du gène PU.1.....	- 33 -
(3) Anomalies de gènes participant au cycle cellulaire et à l'apoptose.....	- 34 -
(a) Altérations du gène p53	- 34 -
(b) Mutations du gène NPM1	- 34 -
(4) Anomalies touchant la régulation épigénétique.....	- 35 -
(a) Mutations régulant la méthylation de l'ADN	- 35 -
(b) Mutations de gènes régulant la structure de la chromatine et des histones.....	- 37 -
b. La cellule initiatrice de la leucémie	- 38 -
c. Stade pré-leucémique, hétérogénéité et évolution clonale.....	- 39 -
I. B. 4. diagnostic	- 41 -

a. Caractérisation morphologique	- 41 -
b. Caractérisation phénotypique par cytométrie en flux.....	- 41 -
c. Caryotype et cytogénétique moléculaire	- 42 -
d. Génétiques moléculaires pour la recherche de mutations	- 43 -
I. B. 5. Classification des Leucémies aiguës myéloïdes.....	- 43 -
a. Classification Franco-Américano-Britannique (FAB)	- 43 -
b. Classification OMS.....	- 44 -
I. B. 6. facteurs pronostic	- 45 -
a. Les facteurs liés au patient.....	- 46 -
(1) L'âge	- 46 -
(2) L'état global de santé du patient et les facteurs de comorbidités	- 46 -
b. Les facteurs liés à la leucémie.....	- 46 -
I. B. 7. Les traitements	- 48 -
a. La phase d'induction intensive	- 49 -
b. La phase de consolidation	- 50 -
(1) Traitement de consolidation.....	- 50 -
(2) La greffe de cellules souches hématopoïétiques	- 50 -
c. Adaptation du traitement selon le patient	- 51 -
(1) Traitement de l'adulte jeune (moins de 60 ans).....	- 51 -
(2) Traitement du sujet âgé.....	- 52 -
d. Les thérapies ciblées.....	- 52 -
(1) Inhibiteurs de protéines kinases.....	- 52 -
(2) Ciblage de modulateurs épigénétiques	- 53 -
(3) L'immunothérapie cellulaire et humorale	- 53 -
(4) Thérapies ciblant le microenvironnement leucémique.....	- 55 -
II. La maladie résiduelle mesurable/minimale.....	- 56 -
II. A. Généralités.....	- 56 -
II. B. Détection de la maladie résiduelle mesurable par cytométrie en flux	- 59 -
II. B. 1. Les deux approches de détection des LAIP.....	- 59 -
II. B. 2. Valeur pronostique et prédictive des rechutes de cette méthode de détection des LAIP	- 60 -
II. C. Détection de la maladie résiduelle mesurable par des marqueurs moléculaires (qPCR)	- 61 -
II. C. 1. Détection des gènes de fusion pour le suivi de la MRD.....	- 62 -
II. C. 2. Les mutations de gènes comme marqueur de la MRD	- 62 -
Chapitre 2 : Le gène et la protéine Wilms' Tumor 1	- 64 -
I. Généralités – Structure du gène et de la protéine	- 66 -
I. A. Plusieurs sites d'initiation de la traduction.....	- 66 -
I. B. Différents épissages alternatifs décrits.....	- 66 -

I. C. Phénomènes d'édition et de modifications post-transcriptionnelles.....	- 67 -
I. D. Localisation nucléaire de la protéine WT1.....	- 69 -
II. Régulateur transcriptionnel et post-transcriptionnel.....	- 70 -
II. A. WT1 et ses gènes cibles.....	- 70 -
II. B. WT1, son rôle de régulateur post-transcriptionnel.....	- 71 -
II. B. 1. WT1 et sa liaison aux ARN messagers	- 71 -
II. B. 2. WT1 et les facteurs d'épissage	- 71 -
II. B. 3. WT1, un éventuel rôle dans la traduction	- 72 -
II. B. 4. WT1 et ses partenaires.....	- 72 -
III. Expressions et Fonctions physiologiques de WT1.....	- 73 -
III. A. Rôles dans le développement	- 73 -
III. A. 1. Développement des reins et des gonades.....	- 73 -
III. A. 2. Développement d'autres types de tissus.....	- 74 -
III. B. Rôle dans l'hématopoïèse	- 74 -
IV. WT1 et les leucémies.....	- 77 -
IV. A. <i>WT1</i> , un gène suppresseur de tumeur.....	- 77 -
IV. A. 1. Mutations du gène <i>WT1</i> dans les leucémies	- 77 -
IV. A. 2. Autres propriétés de suppresseur de tumeurs.....	- 78 -
IV. B. WT1, son rôle d'oncogène.....	- 79 -
IV. B. 1. Surexpression du gène dans les hémopathies.....	- 79 -
IV. B. 2. Acteur à fonctions oncogéniques.....	- 80 -
V. Marqueur de la maladie résiduelle mesurable leucémique	- 80 -
V. A. Une méthode standardisée européenne de détection de <i>WT1</i>	- 82 -
V. B. <i>WT1</i> , une valeur pronostique et prédictive des rechutes	- 83 -
V. C. Détection de <i>WT1</i> post-allogreffe de CSH.....	- 84 -
VI. <i>WT1</i> , un antigène leucémique et cible de l'immunothérapie.....	- 84 -
VI. A. <i>WT1</i> , un antigène immunogène dans les LAM	- 84 -
VI. B. Vaccination anti- <i>WT1</i>	- 85 -
Chapitre 3 : Objectifs du projet de recherche.....	- 87 -
MATERIELS ET METHODES	- 1 -
I. Lignée cellulaire et sous-clones	- 92 -
II. Injection des souris et suivi de la maladie.....	- 92 -
II. A. Injection des cellules leucémiques	- 93 -
II. B. Traitement par chimiothérapie	- 93 -
III. Prélèvements du sang et des organes murins	- 93 -
III. A. Prélèvement sanguin et isolement des cellules.....	- 93 -
III. A. 1. Prélèvements sanguins.....	- 93 -

III. A. 2. Isolement des cellules leucémiques	- 94 -
III. A. 3. Isolement des cellules mononucléées du sang (PBMC)	- 94 -
III. B. Prélèvement des organes.....	- 94 -
IV. Marquage morphologique et protéique sur lame.....	- 95 -
IV. A. Préparation cellulaire sur lame	- 95 -
IV. B. Marquage May-Grünwald Giemsa	- 95 -
IV. C. Marquage des estérases, de la myéloperoxydase et de WT1	- 96 -
IV. C. 1. Marquage de la myéloperoxydase (MPO)	- 96 -
IV. C. 2. Marquage de la protéine WT1.....	- 96 -
IV. C. 3. Marquage cytochimique des estérases.....	- 97 -
V. Marquage immunophénotypique	- 97 -
VI. Evaluation de la sensibilité cellulaire à un traitement.....	- 99 -
VII. Evaluation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T.....	- 100 -
VIII. Surexpression d'un gène par transfection stable	- 100 -
VIII. A. Production d'un vecteur plasmidique exprimant le gène <i>Wt1</i>	- 100 -
VIII. B. Amplification et validation du plasmide produit.....	- 102 -
VIII. C. Transfection stable par électroporation et sélection des sous-clones	- 102 -
IX. Analyse d'expression protéique	- 103 -
IX. A. Extraction et dosage des protéines	- 103 -
IX. B. Migration des protéines par western-blot.....	- 103 -
X. Hybridation génomique comparative (CGH).....	- 104 -
XI. Analyse d'expression d'acides nucléiques.....	- 105 -
XI. A. extraction des acides nucléiques et transcription inverse	- 105 -
XI. A. 1. Extraction des ADN.....	- 105 -
XI. A. 2. Extraction des ARN et transcription inverse	- 105 -
XI. B. Normalisation de l'expression avec une gamme plasmidique.....	- 106 -
XI. C. Réaction de PCR quantitative	- 107 -
XII. Gamme étalon déterminant le seuil de détection du gène <i>Wt1</i> et <i>ZsGreen</i>	- 108 -
RESULTATS.....	- 109 -
I. Caractérisation de la lignée murine leucémique C1498 et de la leucémie induite suite à son injection.....	- 110 -
I. A. La lignée leucémique C1498.....	- 110 -
I. A. 1. Immunophénotypage de la lignée	- 110 -
I. A. 2. Expression de la myéloperoxydase par la lignée	- 111 -
I. A. 3. Cytomorphologie et activité enzymatique de la lignée	- 112 -
I. B. L'injection des cellules C1498 induit le développement d'une LAM	- 114 -
I. B. 1. Infiltration des organes des souris injectées avec la lignée.....	- 114 -

I. B. 2. Etude phénotypique des organes hématopoïétiques et du sang.....	- 115 -
a. Analyse des populations cellulaires de la moelle osseuse.....	- 115 -
b. Effets de la leucémie sur les population spléniques des souris	- 117 -
c. Impact de la leucémie sur la composition cellulaire sanguine	- 117 -
I. B. 3. Morphologie et cytochimie de la moelle osseuse des souris leucémiques et contrôles ..	- 119 -
II. Isolement de sous-clones leucémiques hétérogènes à partir de la lignée C1498.....	- 122 -
II. A. Caractérisation génomique de la lignée et des sous-clones C1498	- 122 -
II. B. Cytomorphologie et cytochimie des sous-clones leucémiques	- 123 -
II. C. Leucémogénicité variable selon les sous-clones.....	- 124 -
II. C. 1. Développement leucémique dans des souris immunocompétentes	- 124 -
II. C. 2. Développement leucémique dans des souris immuno- déficientes.....	- 126 -
II. C. 3. Réponse cytotoxique spécifique de la leucémie et immunisation des souris C57BL/6J	- 127 -
III. Optimisation d'un modèle de MRD leucémique après injection intraveineuse des cellules leucémiques et suivi par cytométrie en flux et RT-qPCR des cellules résiduelles	- 130 -
III. A. Sensibilité de la lignée C1498 et des différents sous-clones à la cytarabine.....	- 130 -
III. B. Expression stable de la <i>ZsGreen</i> par les différents sous-clones C1498 sensibles à la cytarabine..	- 131 -
III. C. Expression stable de <i>Wt1</i> par les différents sous-clones C1498 sensibles à la cytarabine..	- 132 -
III. D. Optimisation de l'induction et du suivi de la leucémie suite à l'injection d'un sous-clone leucémique	- 135 -
III. E. Test de différents cinétiques et doses d'injection de chimiothérapie après l'injection d'un clone unique (E2/WT1)	- 139 -
IV. Développement du modèle de maladie résiduelle mesurable après l'injection d'un mélange de plusieurs sous-clones leucémiques	- 142 -
IV. A. Mélange de 2 ou 5 sous-clones leucémiques exprimant ou non <i>Wt1</i>	- 142 -
IV. B. Mélange de 3 sous-clones leucémiques	- 143 -
V. Mise au point du modèle de maladie résiduelle mesurable après l'injection d'un mélange de 3 clones surexprimant le gène <i>WT1</i>	- 148 -
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	- 152 -
Bibliographie.....	- 164 -

Tables des abréviations

ABL1 : Abelson 1	EOPS : Exempt d'organisme pathogène spécifique
ADN : Acide Désoxyribonucléique	EPO : Erythropoïétine
AGM : Aorte Gonades Mésonéphros	EpoR: Récepteur à l'érythropoïétine
AML1 : Acute myeloid leukemia 1	ETO : Eight Twenty one gene
ANBE : Alpha-Naphthyl Butyrate Esterase	EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3
ASXL1 : Additional sex combs-like 1	G-CSF: Granulocyte- colony stimulating factor
BCL-2 : B cell lymphoma 2	GM-CSF: Granulocyte macrophage – colony stimulating factor
BSA : Bovine serum albumine	GTP: Guanosine triphosphate
CAE : Naphtol AS-D Chloroacétate	HLA: Human leucocyte antigen
CAR : Chimeric antigen receptor	HOX: Homeobox gene
CEBPA : CCAAT enhancer binding protein alpha	IDH: Isocitrate Déshydrogénase (gène 1 : IDH1 et gène 2 : IDH2)
CBF : Core binding factor	IGF II : Insulin-like growth factor 2
CD : Cluster de différenciation	IgG : Immunoglobuline G
CFSE : Carboxyfluorescein succinimidyl ester	IL-2 : Interleukine-2
CSH : Cellule souche hématopoïétique	INF- γ : Interféron γ
CSL : Cellule souche leucémique	Inv: Inversion
CTE : Constitutive transport element	IRF8: Interferon regulatory factor 8
CTL : Cytotoxic T lymphocyte	ITD: Internal tandem duplication
CTLA4 : CTL associated antigen 4	kDa: Kilodalton
Del : Délétion	Kb: Kilobase
DfN : Different from normal	LA : Leucémie aiguë
DNMT3A : DNA méthyltransférase 3 alpha	LAIP : Immunophénotypes associés aux leucémies
EGR : Early growth response	
ELN : European Leukemia Net	

LAM : Leucémie aigüe myéloïde
LAP : Leucémie aigüe promyélocytaire
LIC : Cellule initiatrice de la leucémie
M-CSF : Macrophage – colony stimulating factor
MDR1 : Multidrug resistance 1
MEG-3 : Maternally expressed gene 3
MEIS1 : Meis homeobox 1
MGG : May grünwald giemsa
MLL : Mixed lineage leukemia
MO : Moelle osseuse
MPO : Myélopéroxydase
MRD : Mesurable residual disease
MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NPM1 : Nucleophosmin 1
NSE : Estérases non spécifiques
PBS : Phosphate buffer saline 1X
PCR : Polymerase chain reaction
PML : Promyelocytic leukemia
PR-3 : Protéinase 3
PRAME : Preferentially expressed antigen of melanoma
qPCR : PCR quantitative
RAR : Retinoic acid receptor
RBM4 : RNA binding protein 4

RNP : Ribonucléoprotéines
Rpm : Rotation par minute
RRM : RNA recognition motif
SCF : Stem cell factor
SEM : Standard error of the mean
SMD : Syndrome myélodysplasique
SMP: Syndrome myéloprolifératif
Sox 9 : Sry box-9
Sry: Sex determining Region of Y chromosome
T: Translocation
TA: Température ambiante
TCR: T cell receptor
TET2: Ten-eleven translocation gene 2
TGF- β : Transforming growth factor β
TKD: Tyrosine kinase domain
TNF- α : Tumor necrosis factor α
U2AF65: U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2 (U2AF2)
WAGR: Wilms' tumor predisposition, Aniridia, Genitourinary abnormalities, and Mental retardation
WT1: Wilm's Tumor 1
WTAP: WT1 associating protein
ZF: Zinc finger
ZsGreen : Zoanthus green fluorescent protein

Table des figures

Figure 1 - L'hématopoïèse.	- 23 -
Figure 2 - Incidence des LAM dans la population française en fonction de l'âge et du sexe.....	- 26 -
Figure 3 - Survie nette à 5 ans selon l'âge du patient.....	- 27 -
Figure 4 - Anomalies génétiques et coopérations fréquemment retrouvées induisant le développement leucémique.....	- 30 -
Figure 5 - Mécanisme physiologique ou leucémique de la méthylation de l'ADN.	- 37 -
Figure 6 - Les cellules initiatrices de la leucémie: des CSL ou des progéniteurs/précurseurs présentant des propriétés de CSH.	- 39 -
Figure 7 - Evolution d'un clone pré-leucémique en LAM.	- 40 -
Figure 8 - Risque pronostic en fonction de l'âge du patient.	- 46 -
Figure 9 - Schéma thérapeutique des LAM.	- 49 -
Figure 10 - Méthodes et limites de détection de la maladie résiduelle leucémique.....	- 58 -
Figure 11 - Marqueurs de la maladie résiduelle et proportion de détection selon l'âge du patient par les techniques de qPCR.....	- 61 -
Figure 12 - Schéma de la structure du gène et de la protéine WT1.	- 68 -
Figure 13 - Expression de <i>WT1</i> au cours de l'hématopoïèse.	- 75 -
Figure 14 - Principaux sites de mutation de <i>WT1</i> retrouvées dans les LAM.....	- 77 -
Figure 15 - Mutations exclusives des gènes <i>WT1</i> , <i>TET2</i> , <i>IDH1</i> et <i>IDH2</i> ainsi que la signalisation mise en jeu.	- 79 -
Figure 16 - Expression de <i>WT1</i> au diagnostic chez les patients atteints de LAM.....	- 81 -
Figure 17 - Le risque de rechute semble dépendant du taux de diminution de l'expression du gène <i>WT1</i> après traitement d'induction.....	- 83 -
Figure 18 - Réponse cytotoxique vis à vis de quatre epitopes de WT1 chez des patients atteints d'hémopathies malignes dont les LAM.....	- 85 -
Figure 19 - Etapes clés dans le développement de ce modèle de LAM et de MRD.....	- 90 -
Figure 20 - Structure du plasmide pVito1.1.WT1 synthétisé par la technique de fusion..	- 101 -
Figure 21 - Exemple d'une gamme plasmidique Abl1 réalisée lors de cette étude.	- 107 -
Figure 22 - Résultats représentatifs des marqueurs de cellules souches et progéniteurs testés sur la lignée leucémique C1498.....	- 110 -
Figure 23 - Marqueurs de différenciation exprimés par la lignée C1498 <i>in vitro</i>	- 111 -
Figure 24 - Evaluation de l'expression de la myéloperoxydase par la lignée leucémique C1498.....	- 112 -
Figure 25 - La lignée C1498 exprime les deux types d'estérases.....	- 113 -
Figure 26 - Coloration de la lignée C1498 au May-Grünwald Giemsa.....	- 113 -
Figure 27 - L'injection intraveineuse de la lignée C1498 entraîne le décès de la totalité des souris- 114 -	- 114 -
Figure 28 - Infiltration par les cellules C1498 des organes des souris C57BL/6J.....	- 115 -
Figure 29 - Populations de la moelle osseuse des souris contrôles et leucémiques.	- 116 -
Figure 30 - La leucémie entraîne une splénomégalie et une augmentation du nombre de plusieurs populations spléniques.....	- 117 -
Figure 31 - Populations cellulaires circulantes chez les souris contrôles et leucémiques..	- 118 -
Figure 32 - Cytomorphologie de la moelle osseuse des souris injectées avec du PBS ou avec la lignée C1498.	- 119 -
Figure 33 - Profil d'expression des estérases dans la moelle osseuse des souris saines et infiltrées par les cellules C1498.....	- 120 -
Figure 34 - Profil génomique de la lignée C1498 et des 6 sous-clones dérivés de celle-ci.....	- 122 -
Figure 35 - Profil détaillé de la région qC3 du chromosome 12 de la lignée C1498 et des sous-clones dérivés de celle-ci.....	- 123 -

Figure 36 - Cytomorphologie et cytochimie de 2 sous-clones isolés à partir de la lignée C1498.....	- 124 -
Figure 37 - Injection intrapéritonéale des différents sous-clones n'induit pas le même taux de mortalité chez les souris C57BL/6J.....	- 125 -
Figure 38 - Variation de la survie des souris immunodéficientes NOD-SCID selon le sous-clone injecté.....	- 127 -
Figure 39 - Induction d'une réponse lymphocytaire T dans les souris leucémiques injectées avec le sous-clone C5 capable d'inhiber la leucémie.....	- 128 -
Figure 40 - Analyse de la sensibilité de la lignée C1498 et des sous-clones à la cytarabine montrant une résistance plus importante du sous-clone G10.....	- 130 -
Figure 41 - Expression du gène <i>ZsGreen</i> par les différents sous-clones leucémiques.....	- 131 -
Figure 42 - Expression du gène <i>Wt1</i> par les sous-clones leucémiques transfectés ou non avec le plasmide pViro1.1.WT1.....	- 132 -
Figure 43 - Expression de la protéine WT1 dans les différents sous-clones transfectés ou non avec le plasmide pViro1.1.WT1.....	- 133 -
Figure 44- Localisation nucléaire et cytoplasmique de la protéine WT1 dans les sous-clones leucémiques : exemple du sous-clone E2 et E2/WT1.....	- 134 -
Figure 45- Comparaison de la sensibilité des sous-clones surexprimant ou non le gène <i>WT1</i>	- 135 -
Figure 46 - Cinétique de développement leucémique variant en fonction de la quantité de cellules leucémiques injectées.....	- 136 -
Figure 47 - Infiltration des organes et du sang des souris par le sous-clone leucémique E2/WT1.....	- 137 -
Figure 48 - Cinétique d'infiltration leucémique dans la circulation sanguine des souris C57BL/6J.....	- 138 -
Figure 49 - Prolongation de la survie de certaines souris leucémiques traitées par chimiothérapie et détection par cytométrie en flux de cellules résiduelles dans le sang de ces souris.....	- 140 -
Figure 50 - Induction et détection de la MRD induite par l'injection d'un mélange de 3 sous-clones leucémiques.....	- 145 -
Figure 51 - Détection de l'expression du gène <i>ZsGreen</i> dans la moelle osseuse des souris leucémiques et ayant survécu à la maladie après traitement.....	- 146 -
Figure 52 - Survie prolongée des souris injectées avec le mélange des 3 sous-clones surexprimant <i>WT1</i> avec ou sans traitement par chimiothérapie.....	- 149 -
Figure 53 - Limite de détection des cellules persistantes par RT-qPCR et expression de <i>Wt1</i> dans la moelle osseuse et le sang des souris injectées avec le mélange des 3 sous-clones exprimant <i>Wt1</i>	- 150 -

Table des tableaux

Tableau 1 – Marqueurs membranaires et cytoplasmiques recommandés par ELN pour le diagnostic des LAM et des leucémies aiguës de phénotype mixte.....	- 42 -
Tableau 2 - Classification FAB des leucémies aiguës myéloïdes.....	- 44 -
Tableau 3 - Classification OMS 2018 des LAM.....	- 45 -
Tableau 4 - Facteurs de risque liés à la leucémie aiguë myéloïde.....	- 47 -
Tableau 5 - Les trois classes pronostics et les anomalies associées.....	- 48 -
Tableau 6 - Listes non exhaustives de certaines cibles transcriptionnelles de WT1.	- 70 -
Tableau 7 - Partenaires de WT1 (Liste non exhaustive).	- 73 -
Tableau 8 - Anticorps et isotypes contrôles utilisés pour ce projet.	- 99 -
Tableau 9 - Tableau présentant les amorces utilisées pour ce projet.	- 108 -
Tableau 10 - Doses, cinétique et nombre d'injection de chimiothérapie évaluées pour induire la MRD leucémique.....	- 139 -
Tableau 11 - Evaluation de la survie des souris recevant un mélange de 2 ou 5 sous-clones leucémiques et traitées ou non par chimiothérapie.....	- 143 -
Tableau 12 - Evaluation de la survie des souris recevant un mélange de 3 sous-clones leucémiques exprimant <i>WT1</i> et traitées ou non par chimiothérapie.....	- 148 -

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les leucémies aiguës myéloïdes et la maladie résiduelle mesurable

I. LES LEUCEMIES AIGUES MYELOÏDES, UNE HEMATOPOÏÈSE BOULEVERSEE

I. A. HEMATOPOÏÈSE, LA PRODUCTION PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES SANGUINES

L'hématopoïèse est le terme regroupant les différentes étapes permettant le maintien de l'homéostasie sanguine en assurant en continu la production et le renouvellement contrôlés de toutes les cellules sanguines (érythrocytes, leucocytes et thrombocytes). En effet, ces éléments figurés du sang sont éphémères, avec une durée de vie plus ou moins longue allant de quelques heures pour les leucocytes à environ 120 jours pour les hématies, c'est pourquoi il est nécessaire de renouveler en permanence les différentes lignées sanguines.¹

Chez l'Homme, ce processus débute dès les premiers mois de la gestation, où la production des cellules hématopoïétiques se fait au sein de structures particulières du sac vitellin appelées « îlots sanguins ». A ce stade du développement sont uniquement produits des érythrocytes nucléés produisant de l'hémoglobine extra-embryonnaire, on parle d'hématopoïèse primitive. Afin de remplacer cette hématopoïèse primitive, les premières cellules avec des propriétés souches vont se développer au sein d'une région intra-embryonnaire appelée AGM pour Aorte-Gonades et Mésonéphros. A partir du troisième mois de grossesse, le site de l'hématopoïèse va à nouveau changer. En effet, les cellules à caractère souche vont migrer vers le foie foetal et la rate en empruntant les voies sanguines, et ces organes vont assurer le relais jusqu'à ce que la moelle osseuse (MO) soit apte à produire les différentes lignées cellulaires hématopoïétiques.²

Après la naissance, l'hématopoïèse se déroule au sein des organes hématopoïétiques dits primaires que sont la moelle osseuse et le thymus. En effet, la production et la maturation de la plupart des cellules sanguines vont être assurées par la moelle osseuse des os du fémur, du sternum, des côtes, des vertèbres ou encore du bassin. Le thymus va assurer spécifiquement la différenciation et la prolifération des lymphocytes T. Les lymphocytes B naifs vont, quant à eux, migrer de la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes secondaires tel que la rate, sites permettant leur activation en cas de reconnaissance de l'antigène mais aussi leur différenciation en plasmocytes ou lymphocytes B mémoires. De plus, la rate et le foie peuvent être des sites assurant l'hématopoïèse extramédullaire en condition de stress, lors d'une infection ou d'un cancer.³

Il existe une hiérarchie cellulaire précise au sein de la moelle osseuse puisqu'un seul type cellulaire est à l'origine de toutes les autres cellules, la cellule souche hématopoïétique (CSH). Cette CSH possède comme l'ensemble des cellules souches des capacités d'auto-renouvellement

et de différenciation permettant ainsi la production de l'ensemble des lignées sanguines et le maintien d'une réserve de CSH. La différenciation va se faire en plusieurs étapes puisque les CSH vont donner naissance aux progéniteurs multipotents ayant des capacités d'auto-renouvellement restreintes qui vont se différencier en cellules progénitrices engagées dans une lignée sanguine. On retrouve ainsi les progéniteurs communs lymphoïdes, les progéniteurs communs myéloïdes et les progéniteurs de la lignée érythroïde et mégacaryoblastique. Ces différents progéniteurs vont continuer à se différencier pour donner les précurseurs qui eux-mêmes vont terminer cette différenciation afin de constituer toutes les lignées sanguines matures (Figure 1). Ces cellules hématopoïétiques matures vont, une fois produites, passer dans la circulation sanguine pour assurer leur fonction. Cette hiérarchie de l'hématopoïèse est en constante évolution, surtout concernant les étapes de différenciation et de maturation des progéniteurs communs.^{1,4}

L'homéostasie hématopoïétique repose sur le maintien constant des différents types cellulaires. Pour cela, il existe une régulation importante du devenir des cellules hématopoïétiques. Doivent-elles entrer en quiescence ou proliférer ? Faut-il privilégier l'auto-renouvellement des CSH et des progéniteurs ou la différenciation en cellules matures ? La réponse à ces questions est rendue possible grâce au microenvironnement de la niche hématopoïétique composée d'une matrice extracellulaire et de divers types cellulaires (cellules sanguines, ostéocytes, mésenchymateuses, endothéliales, ...) qui vont induire de nombreux mécanismes de contrôle. Cela va de l'interaction directe entre cellules, à des signaux solubles (cytokines) en passant par l'intervention de facteurs de transcription activant ou réprimant de manière spécifique des gènes cibles. Cela permet ainsi de déclencher la réponse cellulaire adéquate. Il faut retenir que le microenvironnement de la niche est un système complexe qui n'est pas figé, il permet la maintenance et la régulation de l'hématopoïèse mais la communication se fait également dans l'autre sens puisque les cellules hématopoïétiques vont influencer la niche. Un défaut dans ces mécanismes extrinsèque ou intrinsèque à la cellule va impacter l'homéostasie et peut mener à des désordres de l'hématopoïèse, c'est le cas des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Il est aujourd'hui admis que les cellules leucémiques peuvent comme les cellules saines moduler la niche hématopoïétique à leur avantage afin que celle-ci devienne favorable au développement de l'hémopathie maligne.^{5,6}

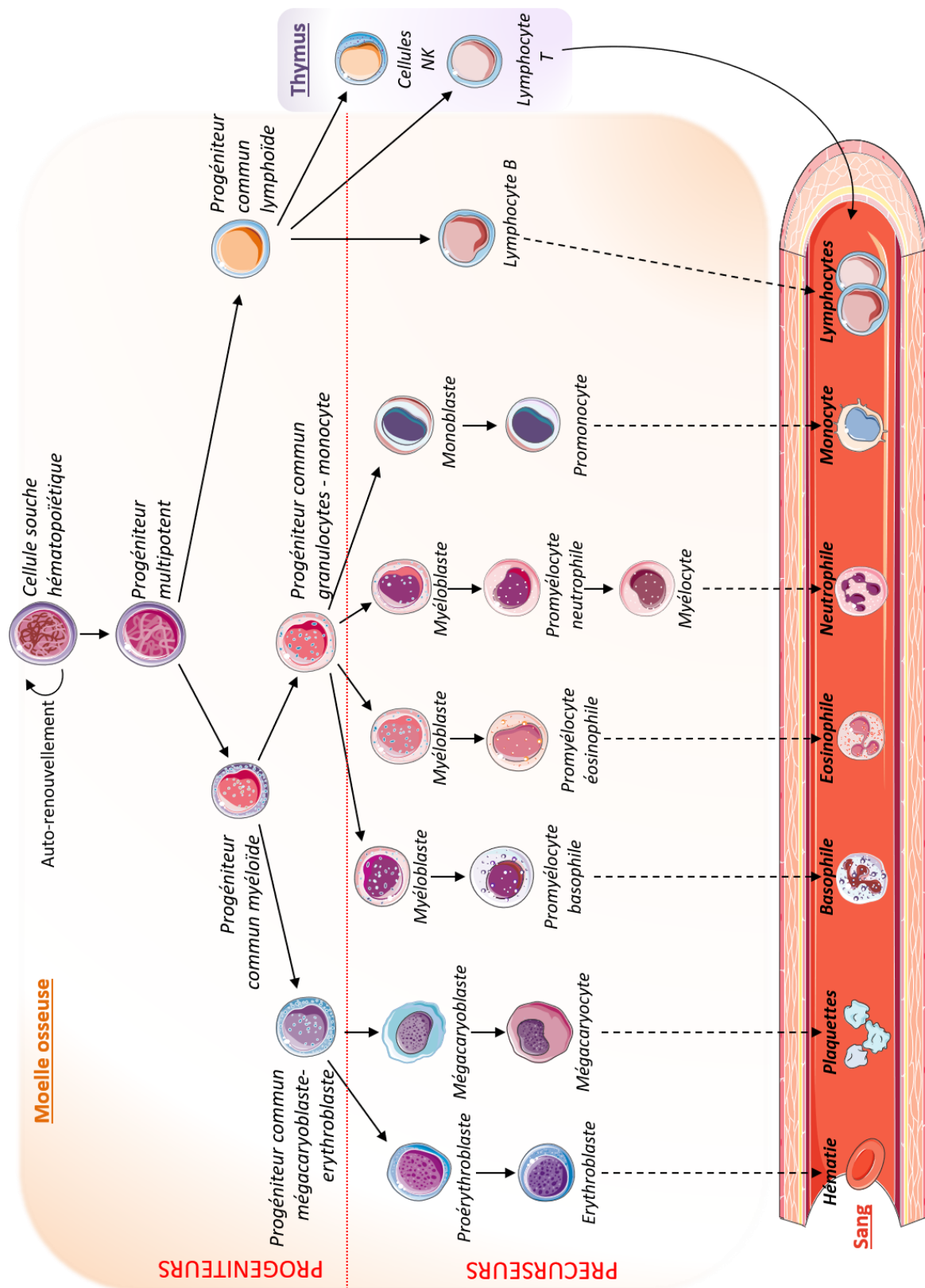


FIGURE 1 - L'HEMATOPOÏÈSE. Ce schéma présente les principales étapes de l'hématopoïèse des différentes lignées hématopoïétiques se déroulant au sein de la moelle osseuse puis le passage des cellules matures dans la circulation sanguine. (Les flèches en pointillées indiquent que plusieurs stades de maturation existent entre les deux niveaux de différenciation mais ne sont pas tous présentés sur ce schéma contrairement à la flèche pleine). Inspiré de Rieger et Schroeder, 2012.¹

I. B. LES LEUCEMIES AIGUES MYELOÏDES, UN DEREGLEMENT DE L'HEMATOPOÏESE

I. B. 1. LES PREMIERES DESCRIPTIONS DE LEUCEMIES

Dès le début du 19^e siècle, plusieurs écrits relatent de cas pouvant correspondre à des patients atteints de leucémie. A cette époque, les médecins font essentiellement des descriptions cliniques et la présence d'une leucocytose sanguine était toujours diagnostiquée comme étant la cause d'une infection. En 1811, le chirurgien Cullen décrit le cas d'un patient dont le « sérum du sang était blanc, exactement la couleur et la consistance du lait » et le sang présentait un dépôt blanc « formant comme un nuage à la surface ». ⁷ Quelques années plus tard, en 1825, le français Alfred Velpeau décrit chez son patient des fièvres, une asthénie et un sang épais se demandant « s'il ne s'agissait pas plus de pus que de sang » (traité d'anatomie chirurgicale). Plus tardivement, en 1845, John Bennett décrit de manière plus précise un cas de leucémie à Edimbourg caractérisé par un sang anormal comme précédemment décrit, associé à « un élargissement massif du foie, de la rate et des ganglions lymphatiques » constaté lors de l'autopsie. ⁸ Avec le développement du microscope, les scientifiques ont pu constater le déséquilibre entre leucocytes et hématies. C'est d'ailleurs à cette période que le scientifique Allemand, Virchow, emploiera pour la première fois le terme de « *weisses blut* » pour sang blanc et en 1847, il proposa le mot « *leukämie* » pour nommer cette maladie sanguine. Le professeur Neumann fit le lien entre les changements de la moelle osseuse leucémique et l'infiltration sanguine dans les années 1870. En 1878, il ajoutera d'ailleurs à la classification des maladies de types lymphatiques et spléniques, les leucémies myéloïdes. ⁹

I. B. 2. GENERALITES

Le terme « leucémie » signifie donc le « sang blanc », cela étant due à une infiltration massive du sang par des cellules hématopoïétiques immatures, qu'on appelle blastes. Tous les types de lignées sanguines peuvent être touchés, ainsi, on retrouve des leucémies lymphoïde ou myéloïde selon le progéniteur ou précurseur atteint. De plus, selon la rapidité d'évolution de la maladie, on va utiliser les qualificatifs d'aiguë ou de chronique. La leucémie aiguë va se développer rapidement et le fort pourcentage de cellules immatures envahissant la moelle osseuse et le sang va très vite empêcher la moelle osseuse d'accomplir sa fonction hématopoïétique tandis que lors du développement d'une leucémie chronique, un pourcentage de cellules matures peut subsister et assurer un certain nombre des fonctions physiologiques. ⁸

Cet encombrement et ce dysfonctionnement de la moelle osseuse vont être révélés par différents signes et symptômes chez les patients. Les principaux signes observés sont une fatigue durable et une diminution de l'état général de santé. La fatigue, les faiblesses

musculaires sont le reflet de l'anémie dû au défaut de l'érythropoïèse. L'altération de la myélopoïèse quant à elle, entraîne une leucopénie qui est source de fragilités face aux infections.¹⁰ La thrombopénie peut entraîner des saignements excessifs pouvant aller jusqu'aux hémorragies notamment au niveau nasal et gingival. L'infiltration de différents organes par les cellules leucémiques est un phénomène pouvant être observé et est appelé leucostase. Ces blastes peuvent envahir l'ensemble des organes, cependant dans certains cas le système nerveux central et les poumons peuvent être touchés. Ce sont des cas d'urgence vitale à traiter en priorité car les symptômes sont des hémorragies cérébrales ou encore des détresses respiratoires.¹¹

Les LAM sont des hémopathies malignes hétérogènes caractérisées par une prolifération incontrôlée de progéniteurs ou précurseurs myéloïdes (blastes) associée à un blocage de la différenciation de ces blastes. Le développement des LAM est un processus complexe et multi-étapes au cours duquel des anomalies génétiques successives vont conférer des avantages compétitifs vis-à-vis des autres cellules hématopoïétiques. Les nouvelles techniques de séquençage ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité de ces LAM avec la présence de différents sous-clones leucémiques chez un même patient.¹² De plus, des analyses de phylogénie des leucémies ont permis de montrer une évolution de ces clones durant la maladie et au cours du traitement.¹³ Cette hétérogénéité cellulaire et cette évolution clonale rendent le traitement de ces patients complexes et participent à la persistance de certains sous-clones responsables des rechutes.

a. Epidémiologie

L'incidence des LAM, c'est-à-dire le nombre de nouveaux cas par an pour 100 000 habitants est de 2,6 pour les hommes et de 2,3 pour les femmes en France, avec un total de 2791 cas en 2012 d'après les données du réseau FRANCIM.¹⁴ Cette incidence est similaire aux données européennes. Cette hémopathie est considérée comme un cancer plutôt rare d'après le projet RARECARE mettant le seuil à 6 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants.¹⁵ L'âge médian de survenue de la maladie est de 71 ans, ceci indépendamment du sexe.

En effet, le risque de développer une LAM augmente excessivement avec l'âge. Une étude rétrospective entre 1980 et 2012 a montré un taux d'incidence grimpant jusqu'à 19 et 30 cas/100 000 habitants/an pour les femmes et les hommes de plus de 85 ans, respectivement (Figure 2). Il s'agit d'une hémopathie de la personne âgée dans la plupart des cas.

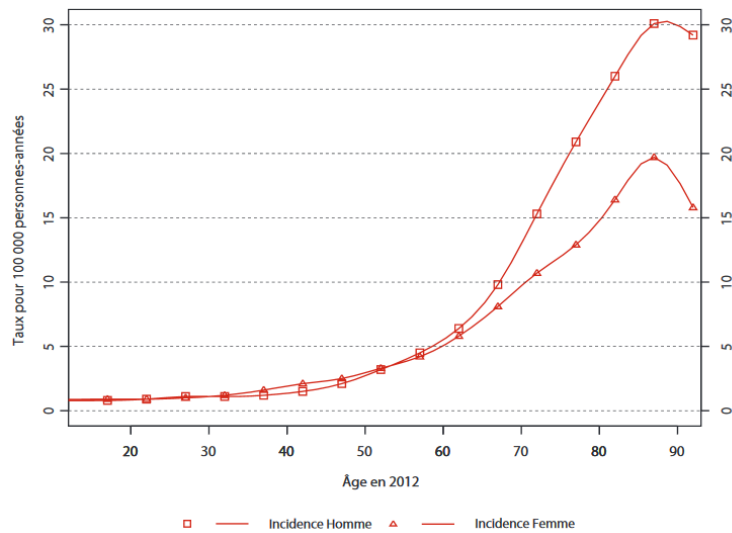


FIGURE 2 - INCIDENCE DES LAM DANS LA POPULATION FRANÇAISE EN FONCTION DE L'ÂGE ET DU SEXE. Tiré de l' « Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012 ».14

Récemment, des études ont décrit la présence d'une hématoïèse clonale liée à l'âge chez des individus sans désordres hématoïétiques. Celle-ci est caractérisée par l'expansion d'un clone hématoïétique possédant des anomalies génétiques particulières et pouvant prédisposer au développement de maladies cardiovasculaires mais aussi d'hémopathies malignes, ce qui est en corrélation avec l'âge médian de développement des LAM.¹⁶

Le nombre de cas par an à quasiment triplé en 30 ans, il est passé de 531 cas en 1980 à 1381 en 2012. Ceci s'explique en partie par le vieillissement de la population française. Il est évident également que la survie nette à 5 ans décroît en fonction de l'âge des patients au diagnostic puisque pour les personnes de moins de 45 ans, la survie à 5 ans est de 60% tandis que pour les personnes de plus de 65 ans, la survie est de moins de 20% (Figure 3).

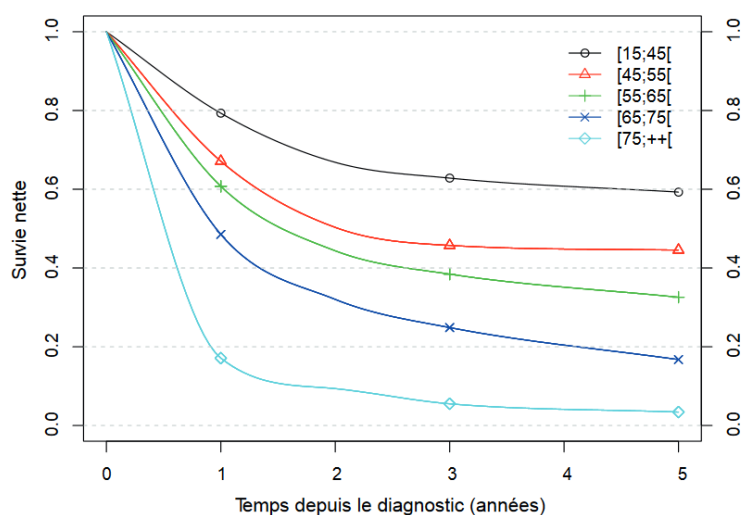


FIGURE 3 - SURVIE NETTE A 5 ANS SELON L'AGE DU PATIENT. Tiré du rapport sur la « Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine, 1989-2013. Partie 2 – Hémopathies malignes ». 17

b. Les facteurs de risque

Il existe des facteurs de risque pouvant être associés à la maladie. Il s'agit de facteurs génétiques, de facteurs environnementaux capables d'induire des modifications génétiques pouvant augmenter le risque de développer une leucémie, ou encore l'évolution d'une autre hémopathie en leucémie aiguë.

(1) Les facteurs génétiques

Les maladies génétiques constitutionnelles sont des facteurs de risque pouvant être associés au développement de LAM et concernent surtout celles de l'enfant.¹⁸ Parmi ces défauts génétiques, on retrouve :

- Des syndromes associés à une anomalie impactant les mécanismes de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) telle que l'anémie de Fanconi;
- Des anomalies touchant des gènes suppresseurs de tumeur comme le syndrome de Li-Fraumeni ou la neurofibromatose;
- Des syndromes caractérisés par une destruction de la moelle osseuse dont la neutropénie sévère congénitale ou encore la thrombopénie congénitale amégacaryocytaire font parties.

(2) Les facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux sont régulièrement associés à des risques accrus de développer une LAM mais peu d'études montrent le lien entre l'exposition et le développement de l'hémopathie maligne. Cependant, des études ont validé certains facteurs de risque, c'est le cas de :

- L'exposition aux rayons ionisants, dont la première relation cause à effet a été posée après les bombes nucléaires de Nagasaki et Hiroshima en 1945 où l'incidence des hémopathies malignes a nettement augmentée. Ceci a été corroboré par différentes études qui s'intéressaient notamment à des employés travaillant dans le domaine nucléaire et montraient un risque accru de développer une LAM.¹⁹ L'augmentation du risque est proportionnelle à la dose de radiation reçue par l'individu.
- L'exposition aux benzènes est également mise en cause dans le développement des LAM. Plusieurs études se sont intéressées aux travailleurs exposés à différentes doses de benzène et il en est ressorti un risque augmenté de développer une LAM influencé par la dose d'exposition.²⁰
- L'utilisation d'un traitement cytotoxique pour un premier cancer, souvent une tumeur solide, peut induire le développement de LAM. Ce type de LAM induites concerne jusqu'à 10 à 15% des cas.¹⁰ La plupart du temps, ces patients ont reçu un agent alkylant et la leucémie se développe dans les 5 à 10 ans qui suivent le traitement du premier cancer. Pour une plus faible proportion de patients, ils ont reçu un agent ciblant la topoisomérase II comme notamment la doxorubicine qui entraîne des réarrangements de l'ADN pouvant rapidement déclencher le développement d'une LAM (dans les 1 à 5 ans post-traitement).
- Il existe aussi des LAM dites secondaires, ce sont des patients qui vont développer une LAM à la suite du traitement d'une première hémopathie telle qu'une anémie aplasique, ou une neutropénie congénitale sévère. Les patients ayant développés un syndrome myéloprolifératif ou myélodysplasique peuvent également voir leur maladie progresser et se transformer en LAM.²¹
- Enfin, l'un des risques de développer ce type de leucémie est une augmentation de l'âge. En effet, on observe une hausse de la fréquence d'anomalies chromosomiques avec l'âge, qui vont participer au développement de cette hémopathie maligne.^{16,22}

I. B. 3. LA LEUCEMOGENESE

A l'image de l'hématopoïèse physiologique, processus hautement organisé aboutissant à la production des cellules hématopoïétiques matures, on retrouve une hiérarchie au sein des cellules leucémiques. En effet, différentes études ont montré l'existence d'une cellule initiatrice de la leucémie (LIC). Celle-ci peut être une CSH ayant subi des modifications génétiques induisant sa transformation en cellule souche leucémique (CSL) ou un progéniteur/précurseur modifié ayant récupéré des propriétés souches.^{23,24}

Le développement leucémique est un processus complexe et multi-étapes au cours duquel une cellule hématopoïétique (CSH, progéniteurs ou précurseurs) va acquérir une anomalie génétique lui conférant un avantage compétitif. Certains chercheurs parlent d'une hématopoïèse clonale pré-leucémique prédisposant à développer une hémopathie maligne. L'accumulation de nouvelles anomalies génétiques vont, ensuite, déclencher le développement de la maladie. Ces altérations génétiques modifient des gènes impliqués dans de nombreuses fonctions telles que la régulation épigénétique, la différenciation et la prolifération cellulaire.

a. Les anomalies et aberrations impliquées dans la leucémie

Depuis quelques années, les techniques de séquençage se sont fortement développées et ont permis d'améliorer nos connaissances sur les anomalies moléculaires des LAM. Les réarrangements chromosomiques et les anomalies moléculaires identifiées dans les différents sous-clones de ces patients sont des facteurs pronostics importants et font partie des analyses réalisées au diagnostic.

Une ancienne classification de ces modifications génétiques selon le modèle « two-hits », considérait que le développement de la maladie reposait sur la collaboration de deux groupes d'anomalies. Les anomalies de classe I accordant un avantage prolifératif et de survie aux cellules hématopoïétiques par la mutation de gènes impliqués dans des voies de signalisation cellulaire déclenchant la prolifération des cellules et une résistance à l'apoptose. Les anomalies de classe II, quant à elles, impactant des gènes impliqués dans la différenciation et l'auto-renouvellement des cellules, tels que des facteurs de transcription ou des co-facteurs.²⁵ Cependant, les récentes études de séquençage du génome et de l'exome des LAM ont montré d'autres mutations récurrentes touchant notamment des régulateurs épigénétiques rendant les LAM plus complexes que le modèle « two-hits » proposé précédemment.²⁶

A l'heure actuelle, plus de 2000 mutations différentes ont été détectées dans une cohorte de 200 patients atteints de LAM avec une récurrence importante de la mutation de 23 gènes dont

DNMT3A, *FLT3*, *NPM1*, *IDH1* et *IDH2* ou encore *WT1*. Les anomalies génétiques sont regroupées en 9 catégories qui sont les facteurs de transcription fusionnés, les gènes suppresseurs de tumeurs, les gènes participant à la méthylation de l'ADN, le gène *NPM1*, les activateurs de voie de signalisation, les agents épigénétiques modifiant la chromatine, les facteurs de transcription, les gènes du complexe de la cohésine et de l'épissage.²⁷

En règle générale, les associations de mutations sont variables mais certaines d'entre-elles sont spécifiques et suggèrent une collaboration fonctionnelle, notamment la mutation *GATA2* est toujours retrouvée associée à une mutation du gène *CEBPA*. A l'inverse, les mutations des gènes *TET2*, *IDH1* ou *IDH2* sont mutuellement exclusives, sans doute entraînent-elles des conséquences fonctionnelles convergentes (Figure 4).

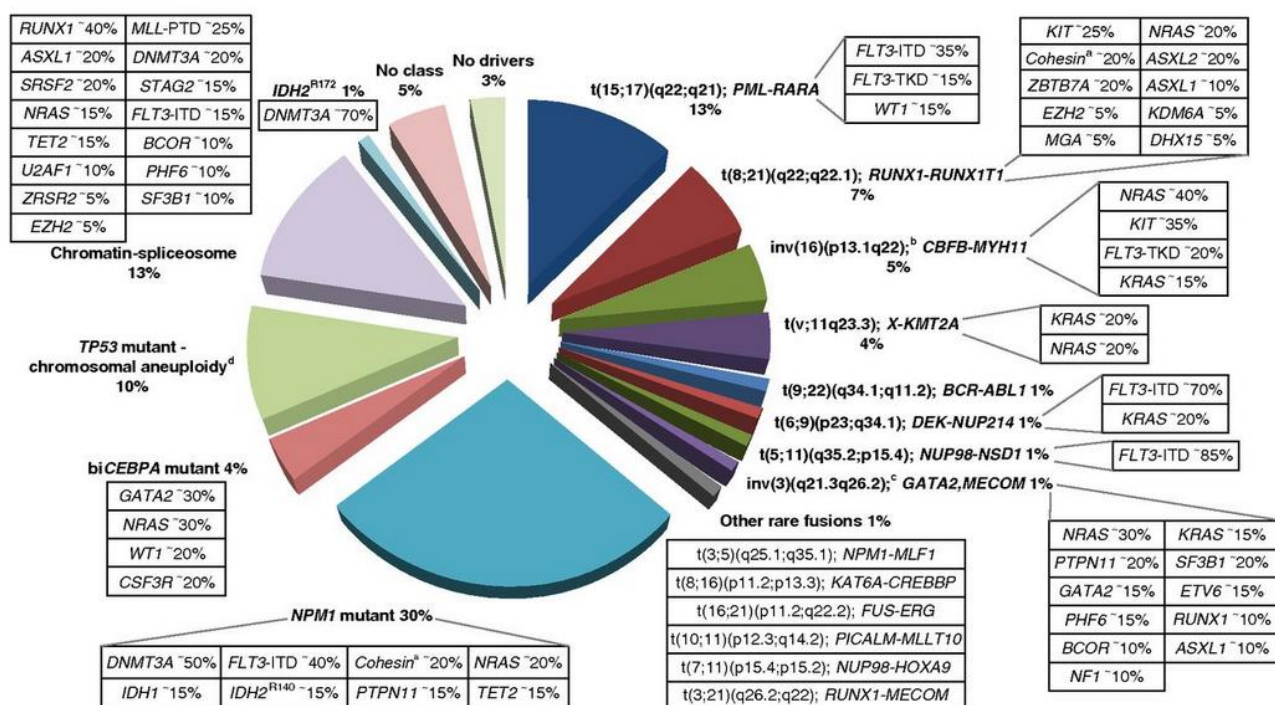


FIGURE 4 - ANOMALIES GENETIQUES ET COOPERATIONS FREQUEMMENT RETROUVEES INDUISANT LE DEVELOPPEMENT LEUCEMIQUE. Les grandes classes d'anomalies sont couramment associées à des mutations de gènes indiquées dans les tableaux associés, ainsi que la fréquence de ces anomalies. Tiré de Döhner *et al.*, 2017.²⁷

(1) Anomalies activatrices de la prolifération

De nombreuses voies de signalisation contrôlant la prolifération et la survie des cellules hématopoïétiques sont dérégulées dans les LAM. On retrouve notamment des récepteurs à domaine tyrosine kinase, et des membres de la famille RAS. L'altération de ces voies passe par des mutations, des surexpressions de gènes tels que les récepteurs *FLT3* ou *KIT*.

(a) Mutations du gène *FLT3*

FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3) est un récepteur à tyrosine kinase exprimé de manière physiologique par les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques et son expression diminue au cours de la différenciation. La liaison de son ligand déclenche des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire. La surexpression dans les échantillons de LAM de FLT3 a été confirmé au niveau ARN et protéines.²⁸ De plus, il s'agit d'un des gènes les plus fréquemment muté dans les LAM avec environ 1/3 des patients touchés par deux types de mutations. On retrouve des mutations faux-sens au niveau du domaine d'activation (TKD) et des duplications internes en tandem (ITD) touchant la région juxta-membranaire mais conservant le cadre de lecture normal. Le premier type de mutation est retrouvé chez 5 à 10% des patients et le second concerne 25 à 35% des LAM de l'adulte.^{29,30} Il est rare qu'un patient présente la double mutation FLT3-ITD et FLT3-TKD. Ces mutations induisent une phosphorylation constitutive de ce récepteur et par conséquent une activation des voies de signalisation en aval (PI3K/AKT, RAS/MAPK et JAK2/STAT5). La mutation touchant le domaine juxta-membranaire entraîne un défaut dans l'autorégulation de l'activation de ce récepteur à tyrosine kinase.^{31,32} Ces mutations sont plus couramment associées aux LAM *de novo* et sont très instables au cours de l'évolution de la maladie puisqu'une étude a montré que les patients perdaient la mutation *FLT3-ITD* entre le diagnostic et la rechute.³³ Ces constatations laissent supposer que ces mutations sont des événements secondaires de la leucémogénèse sachant qu'elles ne peuvent à elles seules induire une leucémie. La présence de la mutation *FLT3-ITD* est de très mauvais pronostic pour ces patients.³⁴

(b) Mutations du gène KIT

Le gène *KIT* code pour un récepteur transmembranaire dont la fixation de son ligand, le SCF (Stem Cell Factor) entraîne une dimérisation, une phosphorylation de celui-ci et l'activation des voies de signalisation induisant la prolifération, la survie, la migration et la différenciation cellulaire. Son expression physiologique décroît au cours de la différenciation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques.³⁵ A l'identique des mutations de *FLT3*, celles-ci vont entraîner une activation constitutive du récepteur c-KIT. On retrouve des mutations touchant la partie extracellulaire, juxta-membranaire et également le domaine tyrosine kinase cytosolique du récepteur. Les mutations du gène *KIT* sont peu fréquentes dans les LAM et concernent majoritairement les patients donc les gènes du facteur de transcription CBF (Core Binding Factor) sont altérés (inv16 ou t(16;16)(p13q22)) ou les LAM présentant une trisomie du chromosome 4.³⁶

(c) Mutation des gènes RAS

La famille des oncogènes RAS peuvent se lier aux guanines et également à de nombreux récepteurs membranaires tels que c-KIT et FLT3 et participent ainsi aux différents processus mis en jeu par ces récepteurs tels que la prolifération ou la survie. Il existe trois gènes *RAS* dont deux d'entre-eux sont retrouvés mutés dans environ 10% des LAM de l'adulte pour *N-RAS* et 5% pour le gène *K-RAS*.³⁷ Ces mutations faux-sens entraînent une inactivation de l'activité enzymatique des GTPases (hydrolyse des guanosines triphosphates) de ces oncogènes et par conséquent induisent une activation constitutive de RAS et des signalisations en aval entraînant une prolifération accrue et une apoptose diminuée. L'activité aberrante de RAS est aussi induite par les mutations des récepteurs FLT3 et c-KIT en amont.³⁸

(2) Anomalies entraînant un blocage de la différenciation

En plus d'altérations de la prolifération, les LAM sont caractérisées par une accumulation de cellules immatures attestant d'un blocage de la différenciation. Celle-ci est impactée soit par la présence de mutations de gènes ou de protéines de fusion interférant dans l'activité de ces gènes. Les acteurs de la différenciation hématopoïétique couramment touchés sont CEBPA (CCAAT enhancer binding protein alpha), PU-1 et RUNX1.

(a) Altérations du gène CEBPA

CEBPA est un facteur de transcription ayant un rôle essentiel à jouer dans la différenciation puisqu'il est retrouvé faiblement exprimé dans les CSH mais dont l'expression augmente au cours de la différenciation myéloïde. La présence de deux sites d'initiation de la traduction donne lieu à la formation de deux isoformes protéiques, l'une de 42 kDa (kilodaltons) (isoforme p42) et une seconde tronquée en partie N-terminale au niveau du domaine de transactivation de 30 kDa (p30) ayant un effet dominant négatif. Ce gène est muté chez environ 5 à 10% des patients leucémiques dont la plupart présentent une LAM à cytogénétique normale.³⁹ Deux types de mutations existent, la première touche la partie N-terminale entraînant l'arrêt prématuré de la traduction protéique et n'affectant pas la forme p30, celle-ci est associée à une prolifération augmentée et une altération de la différenciation. La seconde mutation altère les capacités de liaison à l'ADN et la dimérisation puisqu'elle a lieu en partie C-terminale. Dans la majorité des cas, les patients présentent les deux types de mutations, chacune sur un allèle du gène suggérant un rôle coopératif de ces mutations au cours de la LAM.⁴⁰

D'autres mécanismes amènent à l'inactivation ou l'inhibition de l'expression du gène *CEBPA*, notamment une hyperméthylation de son promoteur qui est principalement retrouvé dans les

LAM à inversion 16 et à translocation t(15;17) ou encore la répression de la protéine CEBPA par la protéine de fusion AML1-ETO.^{41,42}

(b) Anomalies du gène AML1 (RUNX1)

Le gène *AML1* (également connu comme *RUNX1*, *CBFA2*) code pour une des sous-unités du complexe CBF qui intervient dans l'hématopoïèse. Des phénomènes d'épissage alternatif mènent à la formation de 3 isoformes *RUNX1a* à *RUNX1c* possédant tous le domaine d'hétérodimérisation avec *CBFβ* mais des régions C-terminales différentes impliquant des fonctions cellulaires variées. Des expériences sur des souris *AML1*^{-/-} ont montré son rôle indispensable puisque ces souris ne développent pas de système hématopoïétique et meurent rapidement *in utero*.⁴³ Quant aux souris *AML1*^{+/-}, elles montrent une prolifération clonale des CSH et une diminution de la différenciation de l'ensemble des lignées hématopoïétiques. En effet, le facteur de transcription *AML1* régule l'expression d'une grande palette de gènes tels que la myéloperoxydase, le *GM-CSF* (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) ou encore les chaînes du *TCR* (T Cell Receptor, chaînes α , β , γ et δ) via la coopération de facteurs de transcription (*CEBPA*, *PU.1*, *c-MYB*).⁴⁴

Les anomalies de ce gène le plus fréquemment retrouvées sont des translocations chez les patients atteints de LAM *de novo* ou développées après traitement, mais il existe également des mutations ou des amplifications de *AML1*. La translocation la plus courante est la t(8;21)(q22;q22) retrouvée dans 5 à 10% des LAM amenant à la synthèse d'une protéine de fusion composée en N-terminale d'une partie du gène *ETO* et en C-terminale de *AML1*.²⁷ Cette protéine de fusion interfère avec la protéine *AML1* et inhibe son activité. De plus, elle est capable d'inhiber l'expression de gènes normalement activés par le facteur de transcription *AML1* et peut également réguler l'expression d'autres gènes tels que *BCL-2* qui est surexprimé inhibant ainsi l'apoptose.^{44,45}

(c) Altérations du gène PU.1

PU.1 est un facteur de transcription important dans le développement des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Notamment, il régule l'expression de nombreux gènes tels que le *CD11b* et le récepteur au *M-CSF* (Macrophage-Colony Stimulating Factor). Les souris *PU.1*^{-/-} ont un défaut de l'hématopoïèse avec une absence totale de macrophages et de lymphocytes B et la différenciation des cellules myéloïdes est bloquée précocement.⁴⁶ Des mutations du gène *PU.1* sont retrouvées dans 7% des cas de LAM et cela induit une inhibition des interactions protéiques avec *AML1* ou *JUN* et par conséquent diminue l'activation de gènes cibles. De plus, son activité est inactivée par la présence de protéines de fusion que sont *AML1-ETO* et *PML-*

RAR α juxtaposant le gène PML (promyelocytic leukemia) et le gène RAR α (récepteur à l'acide rétinoïque).⁴⁷⁻⁴⁹

(3) Anomalies de gènes participant au cycle cellulaire et à l'apoptose

Comme nous l'avons vu précédemment, certains gènes régulant la prolifération ou la différenciation peuvent avoir des partenaires impliqués dans l'apoptose. C'est notamment le cas de la protéine de fusion AML1-ETO qui peut inhiber l'apoptose en régulant l'expression de *BCL-2* (B Cell Lymphoma 2). Nous avons également vu les protéines RAS pouvant être mutées et donc constitutivement actives, ceci entraînant une prolifération accrue et une apoptose diminuée. D'autres gènes peuvent présenter des anomalies et entraîner des modifications du cycle cellulaire ou altérer les mécanismes apoptotiques, tels que le gène suppresseur de tumeur *p53* et le gène *NPM1*.

(a) Altérations du gène p53

p53 est un facteur de transcription qui intervient dans la réponse au stress cellulaire en inhibant ou activant des gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, les mécanismes de réparation de l'ADN et/ou de l'apoptose.⁵⁰ Comme de nombreux autres cancers, des délétions et des mutations sont retrouvées dans environ 10% des LAM secondaires ou induites après un traitement.⁵¹ Elles sont souvent associées à des caryotypes complexes, ou des monosomies et sont de très mauvais pronostics. Ces altérations entraînent une perte de fonctions de ce gène et notamment son rôle d'inducteur de l'apoptose en cas de dommages à l'ADN.⁵²

(b) Mutations du gène NPM1

Le gène *NPM1* (Nucleophosmin 1) code pour une protéine chaperonne exprimée de manière ubiquitaire et qui navigue entre le noyau et le cytoplasme. Celle-ci intervient dans la formation et l'assemblage des ribosomes, dans le transport protéique principalement du cytoplasme vers le nucléole en condition physiologique. De plus, *NPM1* est également impliqué dans la régulation de l'apoptose dépendant de *p53*. En effet, en condition basale, *NPM1* est lié à ARF dans le nucléole permettant à MDM2 de cibler *p53* et ainsi permettre sa dégradation par le protéasome. En revanche, en cas de stress cellulaire tel qu'un dommage à l'ADN, il y a une dissociation du dimère *NPM1*-ARF et une relocalisation vers le noyau où ils vont séquestrer MDM2 laissant ainsi *p53* libre d'induire les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et/ou l'apoptose.⁵³

Des mutations du gène *NPM1* sont retrouvées chez environ 30% des patients atteints de LAM au diagnostic.²⁷ Celles-ci entraînent un changement dans le motif du signal d'export nucléaire, qui mène à une délocalisation de la protéine vers le cytoplasme, lui empêchant ainsi d'exercer son rôle nucléaire.⁵⁴ De plus, sa présence cytoplasmique lui permet notamment d'inhiber l'apoptose en liant spécifiquement les caspases 6 et 8.⁵⁵

(4) Anomalies touchant la régulation épigénétique

En plus des différentes voies de signalisation accordant un avantage prolifératif, une résistance à l'apoptose ou encore bloquant la maturation, on retrouve des aberrations épigénétiques chez les patients atteints de LAM. Celles-ci peuvent être des mutations de gènes régulant la méthylation de l'ADN (*TET2*, *IDH1*, *IDH2* ou *DNMT3A*) ou d'autres processus gérant la structure de la chromatine ou des histones (mutations des gènes *ASXL1*, *EZH2* ou des gènes de fusion impliquant *MLL*).

(a) Mutations régulant la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est réalisée et maintenue par des ADN méthyltransférases, que sont *DNMT3A* et *DNMT3B*. Ces dernières participent ainsi au contrôle de l'expression des gènes. En effet, une délétion de *DNMT3A* favorise l'auto-renouvellement des CSH au détriment de leur différenciation.⁵⁶ Un autre acteur régulant la méthylation de l'ADN est l'enzyme *TET2* qui participe à la première étape du processus de déméthylation actif.⁵⁷

(i) Mutation du gène *DNMT3A*

Le gène *DNMT3A* (DNA méthyltransférase 3A) code pour une enzyme qui participe au maintien du statut de méthylation de l'ADN en catalysant la conversion d'une cytosine en 5'-méthylcytosine en formant un homo- ou hétéro-tétramère avec la protéine *DNMT3L* (Figure 5). Des mutations hétérozygotes récurrentes de *DNMT3A* sont retrouvées chez environ 20% des patients atteints de LAM et touchent principalement le domaine d'interaction avec l'ADN et le domaine catalytique, ceci entraînant une diminution de l'activité de l'enzyme.⁵⁸ Le pourcentage de patients mutés pour ce gène augmente en fonction de l'âge du patient puisqu'elle est rarement retrouvée dans les LAM de l'enfant mais est plus élevée chez les personnes âgées. Des études récentes montrent une corrélation entre les cellules leucémiques mutées *DNMT3A* et une hypométhylation des régions des gènes *HOX* (Homeobox), gènes essentiels à la régulation de l'hématopoïèse dont l'expression diminue au cours de la différenciation cellulaire.⁵⁹ Une étude a notamment montré une réactivation du gène *MEIS1* (Myeloid ecotropic virus insertion site 1) via l'hypométhylation induite par les mutations de *DNMT3A* en faveur de la leucémogénèse. En effet, *MEIS1* est un facteur de transcription impliqué dans l'hématopoïèse

et un co-facteur de gènes *HOX*.⁶⁰ Les études de l'apparition des mutations par séquençage ont montré que les mutations de ce gène sont des évènements précoces de la leucémogénèse puisqu'elles sont retrouvées dès le stade pré-leucémique.

(ii) Mutation de *TET2*

TET2 (Ten eleven translocation 2) est une enzyme ajoutant un groupement hydroxyle au carbone 5 d'une 5-méthylcytosine (5-mc), ceci est également réalisé par les enzymes *TET1* et *TET3*. Cette première étape du processus de déméthylation aboutira après plusieurs étapes intermédiaires au remplacement de 5-hmc en une cytosine non-méthylée. Des mutations de ce gène sont détectées dans 7 à 23% des cas de LAM selon les études conduisant à une inhibition de son activité catalytique. Ces patients présente une diminution du taux de 5-hmc (Figure 5) et plusieurs études *in vivo* ont montré qu'une altération du gène (délétion ou ARN interférence) était inductrice de la leucémogénèse via l'augmentation de la prolifération et la maintenance de l'auto-renouvellement des cellules hématopoïétiques.⁶¹⁻⁶³ Ces mutations sont considérées comme des évènements précoces dans le processus leucémique, notamment parce qu'elles sont retrouvées chez 10 à 20% des cas de MDS/MPN et qu'il a été montré l'apparition de celles-ci au cours de la transformation en LAM.⁶⁴ De plus, ces mutations sont également retrouvées chez des patients présentant une hématopoïèse clonale pré-leucémique.⁶⁵ Le rôle pronostic de ces mutations n'est pas prouvé et les études s'étant penché sur cette question ont obtenu des résultats très hétérogènes.^{66,67}

(iii) Mutation des gènes *IDH1/2*

Les enzymes isocitrates déshydrogénases 1 et 2 sont des acteurs du métabolisme permettant la conversion oxydative de l'isocitrate en α -cétoglutarate (α -KG) nécessaire à la production de NADPH pour la synthèse des lipides et des nucléotides. Ces gènes sont fréquemment mutés dans les LAM atteignant les 20-30% et surviennent spécifiquement au niveau des arginines R132 pour *IDH1*, et R140, R172 pour *IDH2*. Ces mutations entraînent une diminution de la formation de α -KG et un gain de fonction permettant la conversion de l' α -cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate (2-HG) (Figure 5). L'accumulation de cet oncométabolite est détectable dans le sérum des patients mutés pour l'un de ces deux gènes faisant de lui un biomarqueur des LAM.⁶⁸ Ces mutations inhibent l'activité enzymatique de *TET2* et également les histones déméthylases entraînant une hyperméthylation de l'ADN et des histones.⁶⁹ Ces mutations ont pour conséquence un défaut de différenciation des cellules hématopoïétiques et une augmentation des cellules souches et/ou progéniteurs hématopoïétiques signent d'un effet pro-leucémique.⁶² Le rôle pronostic de ces mutations reste controversé puisqu'il semble exister une

variabilité dépendant de la présence concomitante d'autres mutations telles que celles touchant les gènes *FLT3* ou *NPM1*, de l'âge ou encore du site mutationnel.^{70,71}

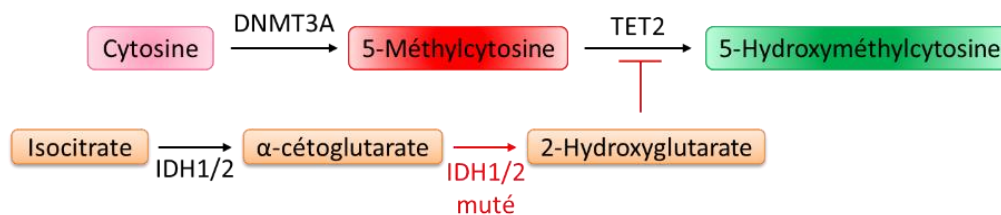


FIGURE 5 - MECANISME PHYSIOLOGIQUE OU LEUCEMIQUE DE LA METHYLATION DE L'ADN. Les enzymes DNMT3A et TET2 participent à la conversion de la cytosine en 5-méthylcytosine (5-mc) puis en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmc). La mutation d'un de ces deux gènes comme dans les LAM entraîne une altération du statut de méthylation de l'ADN. De plus, les enzymes IDH1/2 catalysent la conversion de l'isocitrate en α-cétoglutarate (α-KG). Cependant, une mutation de l'une de ces enzymes entraîne l'acquisition d'une nouvelle fonction permettant la transformation de α-KG en 2-hydroxyglutarate, composé pouvant inhiber l'activité de TET2 et par conséquent la déméthylation. Inspiré de Eriksson *et al.*, 2015.⁷²

(b) Mutations de gènes régulant la structure de la chromatine et des histones

(i) Anomalies du gène MLL

MLL (Mixed lineage leukemia) est une histone méthyltransférase agissant sur la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4) et ceci lors de l'embryogenèse et de l'hématopoïèse. En effet, l'un des rôles majeurs du gène *MLL* est le maintien de l'expression des gènes *HOX* essentiels à la différenciation des cellules hématopoïétiques.⁷³ Deux types d'anomalies de ce gène sont retrouvés chez les patients atteints de LAM. Tout d'abord, des translocations qui concernent environ 10% des patients, dont les partenaires de la fusion les plus fréquents sont les gènes *AF4*, *AF9*, *ENL*, *AF10* et *AF6* (rôles activateurs de la transcription).⁷⁴ Le second type d'anomalies correspond à des duplications en tandem partielles (MLL-PTD) qui conservent les domaines fonctionnels de la protéine contrairement aux translocations et ne touchent qu'environ 5% des patients. Ces duplications entraîneraient une hyperméthylation des histones et une répression transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeur participant ainsi à la leucémogénèse.

(ii) Mutations du gène ASXL1

ASXL1 pour Additional sex combs-like est un gène qui agit comme répresseur des gènes *HOX*. Son rôle a été mis en évidence dans des souris knock-out pour ce gène puisqu'elles présentaient des altérations modérées de l'hématopoïèse, touchant principalement la différenciation des progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes.⁷⁵ Le rôle de ce gène chez l'Homme reste encore inconnu mais il est retrouvé muté dans 10% des LAM avec une fréquence qui augmente avec

l'âge. Ces mutations peuvent être des mutations non-sens, faux-sens ou entraînant un décalage du cadre de lecture et la formation d'une protéine tronquée en C-terminale.⁷⁶

b. La cellule initiatrice de la leucémie

L'existence d'une cellule qui serait à l'origine du développement leucémique a émergé au début des années 1990 grâce aux études des équipes de Bonnet et Dick, et de Blair et ses collaborateurs. Celles-ci ont montré que seule une faible fraction de cellules leucémiques issues de patients prolifère et est capable de s'implanter durablement dans la moelle osseuse des souris immunodéficientes (NOD/SCID). Ces cellules leucémiques CD34⁺CD38⁻ issues de patients sont capables de maintenir la leucémie *in vivo* après des greffes sériées grâce à leur aptitude à proliférer et à s'auto-renouveler.^{77,78} Etant donné que ces cellules initiatrices de la leucémie partagent de nombreuses caractéristiques des CSH, il a été proposé que ces cellules aient été modifiées suite à des altérations génétiques amenant à la transformation en CSL. Cette étude montre également que ces cellules peuvent se différencier *in vivo* en progéniteurs incapables de maintenir la leucémie chez les souris greffées mais conservant un phénotype aberrant identique aux CSL.⁷⁹ Ceci remettant en question le blocage total de la différenciation des blastes leucémiques de patients, et amenant l'idée d'une hiérarchie au sein de ces cellules avec des CSL et des blastes leucémiques plus différenciés (Figure 6).

Cependant, il est également possible que l'origine de la leucémie soit une cellule plus différenciée (progéniteur ou précurseur) qui serait de nouveau parvenue à s'auto-renouveler par la réactivation de certaines voies et par l'acquisition de mutations supplémentaires serait devenue leucémogène. Notamment, les patients atteints d'une leucémie aiguë promyélocytaire (LAP, ou FAB 3) présentent des blastes leucémiques en partie différenciés qui sont les promyélocytes. De plus, une étude a montré que les cellules leucémiques présentant le transcrite de fusion PML-RAR α issues de ces patients ne font pas partie de la population CD34⁺CD38⁻ mais de celle CD34⁻CD38⁺, attestant d'une cellule initiatrice leucémique non-souche dans ce sous-type de LAM.⁸⁰ Plus récemment, il a été montré une faible représentation des cellules CD34⁺ chez les patients pour lequel le gène *NPM1* est muté. En effet, ils ont identifié la présence de ces LIC majoritairement dans la population CD34⁻ prouvant à nouveau que les cellules initiant la leucémie peuvent être des progéniteurs engagés dans une lignée et exprimant certains gènes propres aux CSH tels que 28 facteurs de transcription.^{81,82}

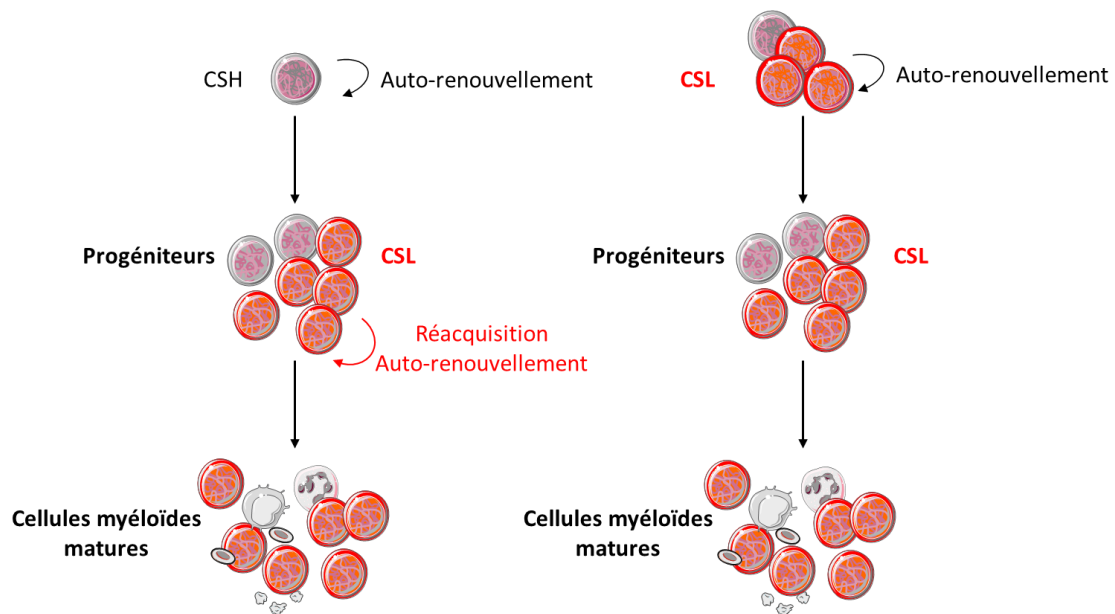


FIGURE 6 - LES CELLULES INITIATRICES DE LA LEUCEMIE: DES CSL OU DES PROGENITEURS/PRECURSEURS PRESENTANT DES PROPRIETES DE CSH. Ces cellules initiatrices de la leucémie peuvent être des CSL qui vont acquérir un avantage prolifératif et une altération de la différenciation, des progéniteurs ou des précurseurs leucémiques qui eux vont réacquérir des propriétés d'auto-renouvellement par la présence d'anomalies génétiques. Inspiré de Passegué *et al.*, 2013.⁸³

Que la leucémie ait pris naissance à partir de l'altération d'une CSH ou d'un progéniteur/précurseur déjà engagé dans la différenciation, cette cellule initiatrice présentera des modifications génétiques lui ayant apporté des capacités de prolifération et d'auto-renouveaulement conférant un avantage compétitif vis-à-vis des autres cellules hématopoïétiques.

c. Stade pré-leucémique, hétérogénéité et évolution clonale

Des mutations somatiques peuvent survenir lors de la division cellulaire des cellules souches ou progéniteurs hématopoïétiques. Celles-ci apportant un avantage compétitif vis-à-vis des autres lignées hématopoïétiques amenant à l'expansion clonale de ces cellules modifiées. L'apparition de mutations somatiques associées à une hématopoïèse clonale augmente avec l'âge et atteint les 5 à 10% chez les personnes âgées de plus de 70 ans.^{16,84}

Des études ont évalué par séquençage la présence de mutations somatiques de gènes impliqués dans l'hématopoïèse dans une cohorte de personnes ne présentant pas d'hémopathies malignes et ont renouvelé l'analyse après plusieurs mois ou années, chez ces mêmes volontaires. Celles-ci ont révélé un risque augmenté d'évolution en hémopathie maligne lorsque les personnes présentaient des mutations lors de la première analyse. Les gènes concernés par ces mutations somatiques sont *TP53*, *IDH1*, *IDH2*, les gènes du spliceosome (*SRSF2*, *SF3B1* et *U2AF1*), *TET2* et

DNMT3A.^{85,86} Ces mutations caractérisent un stade pré-leucémique de ces cellules mais sont insuffisantes à elles seules pour entraîner le développement de la LAM puisqu'elles n'entraînent qu'un avantage compétitif permettant l'expansion clonale. L'évolution de cet hématopoïèse clonale pré-leucémique en LAM n'est pas systématique et survient après l'acquisition d'anomalies génétiques supplémentaires (Figure 7).

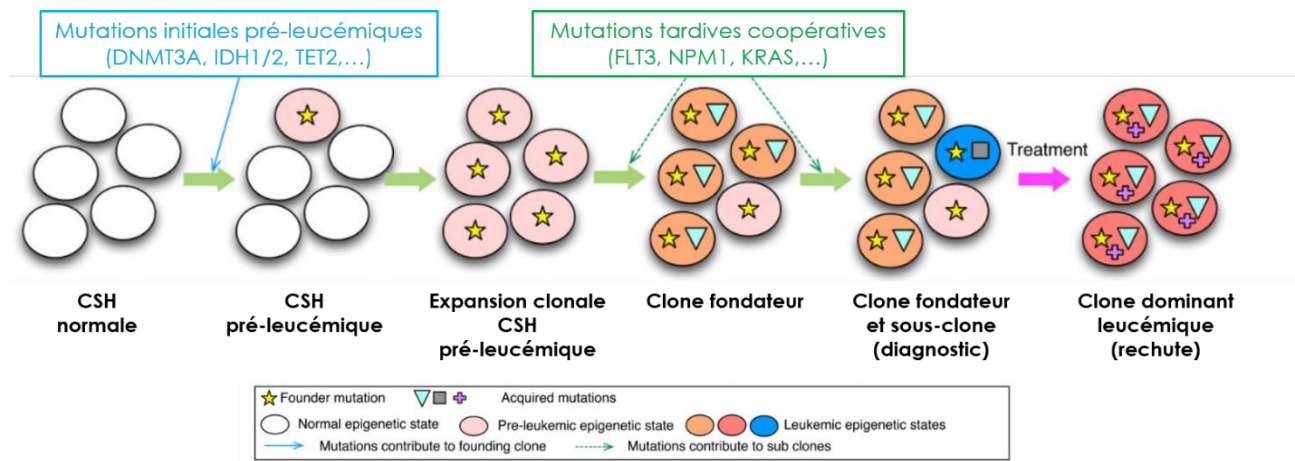


FIGURE 7 - EVOLUTION D'UN CLONE PRE-LEUCEMIQUE EN LAM. Une cellule hématopoïétique (CSH ou progéniteur) va acquérir une mutation initiatrice conférant un avantage compétitif entraînant l'expansion du clone pré-leucémique puis d'autres mutations coopératives vont s'ajouter au fil du temps jusqu'au développement du clone leucémique fondateur. D'autres mutations vont être acquises par certaines cellules entraînant l'existence de sous-clones. Tiré et modifié de Li et al., 2016.⁸⁷

L'étude des fréquences de variants des mutations a révélé la présence simultanée de différents sous-clones leucémiques au diagnostic chez les patients atteints de LAM. Ces sous-clones leucémiques possèdent des anomalies génétiques identiques reflétant l'origine clonale, c'est-à-dire le clone fondateur et des altérations spécifiques amenant à la présence de sous-clones variés. Ceci implique que les différents sous-clones leucémiques vont être présents simultanément au sein de la moelle osseuse des patients créant une composition cellulaire hétérogène tant sur le plan morphologique, phénotypique ou encore fonctionnel et moléculaire.⁸⁸

Certaines études se sont intéressées à l'ordre d'apparition de ces anomalies génétiques au cours de la progression leucémique et ont montré la présence de mutation initiale touchant les gènes impliqués dans la régulation épigénétique (hématopoïèse clonale pré-leucémique), suivie par des mutations additionnelles. Les dernières mutations acquises n'étant pas présentes dans les cellules pré-leucémiques suggèrent que celles-ci sont des évènements plus tardifs permettant le déclenchement de la leucémie. Ces évènements tardifs impliquent notamment la mutation des gènes *FLT3* ou *NPM1* (Figure 7).^{12,33,89}

Des études se sont intéressées à l'évolution de ces sous-clones en comparant, par des techniques de séquençage à haut débit, des échantillons de patients atteints de LAM au diagnostic et en rechute. Ils ont ainsi montré l'existence d'une évolution clonale après traitement. En effet, soit le clone fondateur, soit un sous-clone sera responsable de la rechute leucémique après l'acquisition de nouvelles mutations et l'expansion clonale achevée.¹³ D'autres auteurs ont montré que le sous-clone à l'origine de la rechute peut être un sous-clone minoritaire qui serait résistant à la chimiothérapie et aurait ensuite proliféré induisant la rechute.⁹⁰

I. B. 4. DIAGNOSTIC

L'identification et la caractérisation des LAM se fait à l'aide d'analyses morphologiques, phénotypiques et génétiques. De plus, la recherche d'éventuels antécédents familiaux d'hémopathie ou d'hémorragies pouvant attester d'une prédisposition génétique est importante.

a. Caractérisation morphologique

Le diagnostic des LAM se fait en premier lieu par l'analyse morphologique de la moelle osseuse et du sang des patients. Pour cela, un myélogramme dénombrant 500 leucocytes et un hémogramme comptant 200 leucocytes sont réalisés. Le diagnostic est posé lorsque le sang ou la moelle osseuse du patient présente au minimum 20% de blastes, à l'exception des LAM présentant les translocations t(8;21) ; t(15;17), t(16;16) ou l'inversion 16 où le pourcentage d'infiltration blastique peut être moindre (10%). Le dénombrement des blastes prend en compte la quasi-totalité des lignées myéloïdes, c'est-à-dire les myéloblastes, les monoblastes et les mégacaryoblastes ainsi que les promonocytes en cas de LAM à différenciation myélomonocytaire ou monocyttaire pure mais fait exception des érythroblastes.²⁷ La numération formule sanguine permet de compléter le diagnostic et de mettre en évidence des cytopénies, une éventuelle hyperleucocytose, une différenciation monocyttaire, tout cela permettant de compléter et de préciser le type de LAM touchant le patient.

b. Caractérisation phénotypique par cytométrie en flux

En plus d'une hétérogénéité morphologique avec différentes lignées myéloïdes et stades de maturation touchés dans les LAM, ces blastes peuvent présenter des immunophénotypes variés (marqueurs membranaires et cytoplasmiques). Ces marqueurs peuvent aider au diagnostic de certaines LAM présentant une cytologie complexe et insuffisante pour poser le diagnostic telles que les LAM0, LAM6 et LAM7 (classification FAB). De plus, certaines anomalies génétiques tels que la translocation t(8 ;21) ou l'inversion 16 présentent des profils immunophénotypiques

particuliers.⁹¹ Le panel d'anticorps utilisé pour l'immunophénotypage doit également permettre de distinguer les leucémies aiguës de phénotype mixte mais aussi des immunophénotypes aberrants associés aux leucémies (LAIP) en vue d'un suivi de la maladie résiduelle mesurable du patient par cytométrie en flux.⁹² Le tableau suivant référence les marqueurs membranaires et cytoplasmiques recommandés par l'European LeukemiaNet (ELN) pour le diagnostic des LAM et leucémies aiguës de phénotype mixte (Tableau 1).

Marqueurs pour le diagnostic des LAM	
Précurseurs	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Lignée granulocytaire	CD65, myeloperoxydase (MPO)
Lignée monocytaire	CD14, CD36, CD64
Lignée mégacaryocytaire	CD41 (glycoprotéine IIb/IIIa), CD61 (glycoprotéine IIIa)
Lignée érythrocytaire	CD235a (glycophorin A), CD36
Marqueurs pour le diagnostic des leucémies aiguës de phénotype mixte	
Lignée myéloïde	MPO ou différenciation monocytaire (au minimum deux critères suivants: cytochimie positive des estérases non-spécifiques, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)
Lignée lymphocytaire T	Expression membranaire ou cytoplasmique CD3 (anticorps CD3ε)
Lignée lymphocytaire B	Expression élevée CD19 et au moins un autre marqueur exprimé : CD79a (cytoplasmique), CD22 (cytoplasmique) ou CD10 Expression faible CD19 avec au moins deux marqueurs fortement exprimés : CD79a, CD22 (cytoplasmique) or CD10

TABLEAU 1 – MARQUEURS MEMBRANAIRES ET CYTOPLASMIQUES RECOMMANDÉS PAR ELN POUR LE DIAGNOSTIC DES LAM ET DES LEUCEMIES AIGÜES DE PHÉNOTYPE MIXTE. Tiré de Döhner et al.,2017.²⁷

c. Caryotype et cytogénétique moléculaire

La cytogénétique conventionnelle est une analyse indispensable lors du suspicion d'une LAM. Un peu moins d'un patient sur deux va présenter un caryotype aberrant tel que la présence de chromosomes surnuméraires ou de monosomies, l'existence de translocations, de délétions ou d'insertions. Certaines de ces anomalies servent à la détection et au suivi de la maladie, mais ont également un rôle pronostic et une influence sur le choix thérapeutique. En effet, huit de ces aberrations génétiques furent intégrées à la classification OMS 2008 des LAM. La détection de certains de ces réarrangements est suffisante pour poser le diagnostic de LAM secondaire à

un syndrome myélodysplasique si le myélogramme ou l'hémogramme révèle une infiltration supérieur ou égale à 20%.⁹³ Si la cytogénétique n'est pas concluante, il est possible d'effectuer une hybridation *in situ* en fluorescence pour identifier certains réarrangements (AML1-ETO, CBFβ-MYH11, perte chromosome 5q, ...).²⁷

d. Génétiques moléculaires pour la recherche de mutations

Comme nous l'avons vu précédemment, les patients peuvent présenter de nombreuses combinaisons de mutations. Il est indispensable de rechercher ces mutations génétiques au diagnostic. Parmi ces nombreuses mutations, on retrouve les mutations du gène *NPM1*, *CEBPA* ou *AML1* définissant des catégories spécifiques de LAM. Les mutations du gène *FLT3* (TKD et ITD) doivent également être recherchées puisqu'elles ont un rôle pronostic et peuvent permettre aux patients de bénéficier de thérapies ciblées à l'aide d'inhibiteurs. Enfin, certaines mutations somatiques doivent être recherchées pour leur rôle pronostic, c'est le cas des mutations des gènes *ASXL1* ou *TP53* qui sont associées à un mauvais pronostic.^{27,94} Certains centres utilisent un panel d'un plus grand nombre de gènes détectés par séquençage nouvelle génération, notamment en vue d'une utilisation comme marqueur de la maladie résiduelle mesurable (transcrits de fusion, *NPM1*, *WT1*, ...) mais aussi un panel de gènes attestant de prédisposition familiale aux hémopathies myéloïdes (*CEBPA*, *DDX41*, *ETV6*, *GATA2*, *RUNX1*, ...).

I. B. 5. CLASSIFICATION DES LEUCEMIES AIGUES MYELOÏDES

a. Classification Franco-Américano-Britannique (FAB)

Historiquement, en 1976, un groupe de 7 hématologues Français, Américains et Britanniques ont établi une classification des leucémies aiguës lymphoïdes et myéloïdes afin d'uniformiser le diagnostic de ces patients. Ils ont différencié les leucémies aiguës (LA) lymphoïdes des LA myéloïdes avec respectivement 3 sous-groupes (L1 à L3) et 7 sous-groupes (M0 à M7) (Tableau 2). La classification des LAM prend en compte la lignée hématopoïétique impactée par la maladie, le niveau d'immaturation de ces cellules et des critères cytochimiques reposant sur l'étude de l'activité enzymatique de la myéloperoxydase et des estérases (estérases non-spécifiques et une enzyme spécifique dégradant le Naphthol AS-D chloroacétate (CAE)).⁹⁵

Classification FAB	Nom usuel (de la classification OMS)	Critères cytologiques	Critères cytochimiques	
			MPO	Estérases
MO	LAM avec différenciation minimale	Myéloblastes indifférenciés sans granulations	<3%	-

M1	LAM sans maturation morphologique	Myéloblastes avec différenciation minimale (<10% différenciation granulocytaire)	>3%	-
M2	LAM différenciée	Myéloblastes avec maturation morphologique, ≥10% de promyélocytes ou plus matures	≥3%	-
M3	LA promyélocytaire (LAP)	Promyélocytes anormaux, présence de corps d'Auer	+++	-
M4	Leucémie aiguë myélo-monocytaire	Blastes d'origine myéloïde et monocytaire, Monocytose sanguine	≥3%	≥20%
M5	LA monoblastique	<u>Monocytose médullaire :</u> - LAM 5a (indifférenciée) : monoblastes - LAM 5b (différencié): promonocytes ou monocytes	+/-	+++ (>80%)
M6	LA érythroblastique	Erythroblastes (>50%)	+	-
M7	LA à mégacaryoblastes	Blastes polymorphes	-	-

TABLEAU 2 - CLASSIFICATION FAB DES LEUCEMIES AIGÜES MYELOÏDES. Inspiré de Bennett *et al.*, Neame *et al.*, et de l'atlas de poche d'hématologie. ⁹⁵⁻⁹⁷

Cette classification reste utilisée couramment en pratique clinique mais une autre classification se basant sur des anomalies génétiques et selon leur caractère secondaire à un syndrome myélodysplasique a ajouté une valeur pronostic à cette classification FAB, il s'agit de la classification OMS.

b. Classification OMS

Cette classification plus récente, a été possible grâce au développement de technologies innovantes de séquençage distinguant un plus grand nombre de LAM sur la base d'anomalies moléculaires et/ou cytogénétiques, ainsi que la prise en compte de la présence d'une myélodysplasie ou d'un traitement par chimiothérapie (Tableau 3). Pour définir la présence d'une LAM, la moelle osseuse doit comporter au moins 20% de blastes sauf en cas de certaines aberrations comme par exemple la translocation *AML1-ETO*.²⁷

Nom usuel	Anomalies associées et type de LAM
LAM <i>de novo</i> présentant des anomalies cytogénétiques récurrentes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ t(8;21)(q22;q22.1) : <i>AML1-ETO</i> (Leucémie à composante monocytaire) <ul style="list-style-type: none"> ▪ t(9;11)(p21.3;q23.3) : <i>MLLT3-MLL</i> ▪ t(6;9)(p23;q34.1) : <i>DEK-NUP214</i> ▪ t(1;22)(p13.3;q13.3) : <i>RBM15-MKL1</i> (Leucémies rares mégacaryoblastiques, surtout de l'enfant associées à un syndrome de Down) ▪ inv(16)(p13.1;q22) ; <i>CBFB-MYH11</i> (Leucémie érythroïde) ▪ inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) : <i>GATA2, EVI1</i> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>PML-RARA</i> (Leucémie aiguë promyélocytaire) ▪ <i>BCR-ABL1</i> (Leucémie aiguë à phénotype mixte) <ul style="list-style-type: none"> ▪ LAM présentant une mutation <i>NPM1</i> ▪ LAM présentant une mutation bi-allélique <i>CEBPA</i> <ul style="list-style-type: none"> ▪ LAM présentant une mutation <i>AML1</i>
LAM faisant suite à un syndrome myélodysplasique	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucémies aiguës indifférenciées consécutives à un syndrome myélodysplasique (SMD) ou myéloprolifératif (SMP) ▪ Leucémies associées à une (des) anomalie(s) cytogénétique(s) de SMD
Hémopathies secondaires à un traitement	Incluant les néoplasmes myéloïdes faisant suite à un traitement dont les LAM-t (LAM associées à une thérapie)
LAM <i>de novo</i> sans autre distinction (cytogénétique normale)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LA avec différenciation minimale <ul style="list-style-type: none"> ▪ LA sans différenciation ▪ LA avec maturation ▪ LA myélo-monocytaire ▪ LA mégacaryoblastique ▪ LA myéloblastique à composante basophile

TABLEAU 3 - CLASSIFICATION OMS 2018 DES LAM. Inspiré de Döhner *et al.*, 2017.²⁷

I. B. 6. FACTEURS PRONOSTIC

Le développement des LAM est particulièrement hétérogène, cela dépend de nombreux facteurs notamment des paramètres liés au patient lui-même et d'autres dépendants des caractéristiques cellulaires et moléculaires de la leucémie. En règle générale, les caractéristiques attribuables au patient vont avoir une importance quant à la mortalité liée au traitement (TRM) alors que les facteurs de la leucémie vont intervenir plutôt dans la réponse à celui-ci (sensibilité ou résistance). Ces différents facteurs sont pris en compte lors du choix thérapeutique.

a. Les facteurs liés au patient

(1) L'âge

L'âge du patient va intervenir dans le pronostic du patient et dans la réponse au traitement sur différents points. En effet, plusieurs études montrent un pronostic plus défavorable pour les patients âgés de plus de 56 ans (Figure 8). En réalité, cela s'explique par une plus importante résistance aux traitements des LAM des patients âgés, ils présentent plus souvent des aberrations chromosomiques associées à un mauvais pronostic tels que les délétions touchant le chromosome 5 ou 7 ou une cytogénétique défavorable. De plus, il est constaté un risque de mortalité plus élevée pour les patients âgés en cas d'utilisation de chimiothérapies intensives.^{22,94,98}

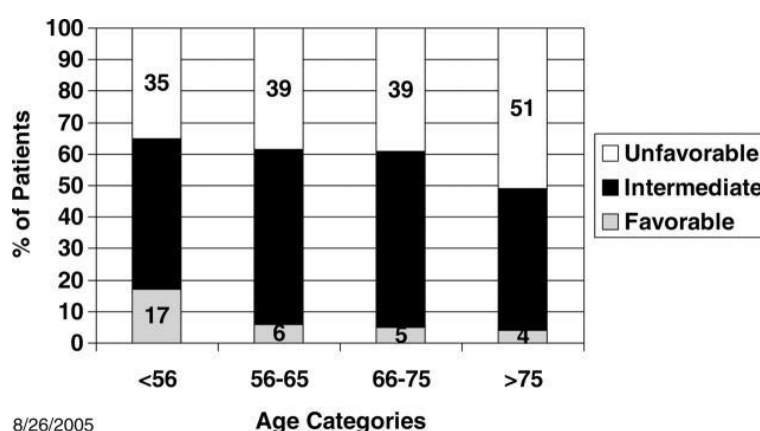


FIGURE 8 – RISQUE PRONOSTIC EN FONCTION DE L'ÂGE DU PATIENT. Le pronostic de la maladie est en corrélation avec l'âge du patient. Tiré de Appelbaum *et al.*, 2006 ²²

(2) L'état global de santé du patient et les facteurs de comorbidités

Le choix du traitement intensif va également se faire en fonction de l'état du patient (indice de performance) et de la présence ou non de facteurs de comorbidités. Les comorbidités sont les autres maladies qui vont coexister avec la leucémie et vont influencer le choix thérapeutique, la réponse au traitement et la survie du patient tels que des anomalies cardiaques, hépatiques ou rénales. Plusieurs systèmes ont été mis en place pour calculer un score de comorbidités et/ou de mortalité suite au traitement (TRM) permettant d'évaluer si le patient va pouvoir recevoir une chimiothérapie intensive ou non. ⁹⁹

b. Les facteurs liés à la leucémie

Leucocytose initiale

Une hyperleucocytose (leucocytes >50 et <100G/L) est un facteur de mauvais pronostic pour la réponse thérapeutique et la survie globale. Une hyperleucocytose dépassant les 100 G/L est associée à

	des risques de leucostases, c'est-à-dire une adhérence des cellules leucémiques aux parois vasculaires entraînant des symptômes pulmonaires (dyspnée, désaturation, détresse respiratoire), neurologiques (confusion, fièvre) et/ou cardiaques.
Caractère secondaire de la leucémie	Une LAM secondaire fait suite à un syndrome myélodysplasique (SMD) ou à un syndrome myéloprolifératif (SMP). Elles sont généralement de plus mauvais pronostic car souvent associées à des anomalies génétiques défavorables et des survies globales plus courtes.
Leucémie induite par un traitement	Un patient développant une LAM à la suite d'un traitement (souvent le traitement d'un autre cancer par chimiothérapie ou radiothérapie) a un pronostic plus défavorable par rapport à une LAM <i>de novo</i> .
Dysplasie multi-lignées (DML)	Cela correspond à la présence de plus de 50% de cellules anormales (dysmyélopoïèse) et touchant au moins 2 des lignées hématopoïétiques. Une DML est souvent retrouvée chez des patients âgés et/ou des leucémies à caractère secondaire.
Phénotype multi-résistants aux thérapies (MDR)	Les cellules leucémiques expriment à leurs surfaces la protéine assurant l'efflux des xénobiotiques, la P-glycoprotéine (P-gp) dont notamment les anthracyclines.

TABLEAU 4 - FACTEURS DE RISQUE LIÉS À LA LEUCEMIE AIGUË MYÉLOÏDE. Tiré de Döhner *et al.*, 2017.²⁷

A ces facteurs s'ajoute les anomalies génétiques retrouvées chez ces patients qui ont un rôle pronostic et qui sont classées selon 3 groupes : favorable, intermédiaire et défavorable (Tableau 5).

Classe pronostic	Anomalies génétiques
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> - t(8 ;21)(q22 ;q22) ; <i>AML1-ETO</i> - inv(16)(p13.1q22) ; <i>CBFB-MYH11</i> - <i>NPM1 muté (FLT3-ITD négatif ou faible)</i> - Mutation biallélique de <i>CEBPA</i>
Intermédiaire	<ul style="list-style-type: none"> - <i>NPM1 muté associé à FLT3-ITD fortement exprimé</i> - <i>NPM1 sauvage (FLT3-ITD négatif ou faible)</i> - t(9 ;17)(p21.3 ;23.3) ; <i>MLLT3-KMT2A</i>

	- Autres anomalies n'appartenant ni à la classe favorable, ni à la classe défavorable
Défavorable	<ul style="list-style-type: none"> - t(6 ;19)(p23 ;q34.1) ; <i>DEK-NUP214</i> - réarrangements <i>KMT2A</i> - t(9 ;22)(q34 ;11.2) ; <i>BCR-ABL1</i> - inv(3)(q21.3q26.2) ; <i>GATA2-EVI1</i> - del(5q) ; del(7) ; del(17p) - Caryotypes complexes, monosomie - <i>NPM1</i> sauvage et <i>FLT3-ITD</i> fortement exprimé - Mutations de <i>AML1</i> ou <i>ASXL1</i> ou <i>TP53</i>

TABLEAU 5 - LES TROIS CLASSES PRONOSTIQUES ET LES ANOMALIES ASSOCIEES. Inspiré de Döhner *et al.*, 2017.²⁷

En réalité, le plus grand facteur pronostique permettant d'estimer la réponse au traitement est l'évaluation précoce de la maladie résiduelle une fois la phase de chimiothérapie d'induction terminée. Une absence de MRD détectable est plutôt de bon pronostic et inversement. La maladie résiduelle mesurable/minimale sera expliquée par la suite (§. II, p-56-).

I. B. 7. LES TRAITEMENTS

Le traitement conventionnel des LAM n'a pas fortement changé depuis ces 40 dernières années et comporte deux principales étapes utilisant essentiellement la chimiothérapie.

Tout d'abord, une phase d'induction intensive afin d'obtenir la rémission complète puis un traitement post-rémission (Figure 9). Pour ce traitement post-rémission, plusieurs choix peuvent être envisagés : la chimiothérapie de consolidation et l'intensification, l'allogreffe ou l'autogreffe de CSH. Depuis quelques années, de nouvelles thérapies ont vu le jour. Ce sont des thérapies ciblant certaines anomalies récurrentes des LAM, des composés agissant sur les désordres métaboliques ou épigénétiques, ou encore l'immunothérapie qui permet de stimuler le système immunitaire vis-à-vis des cellules leucémiques.

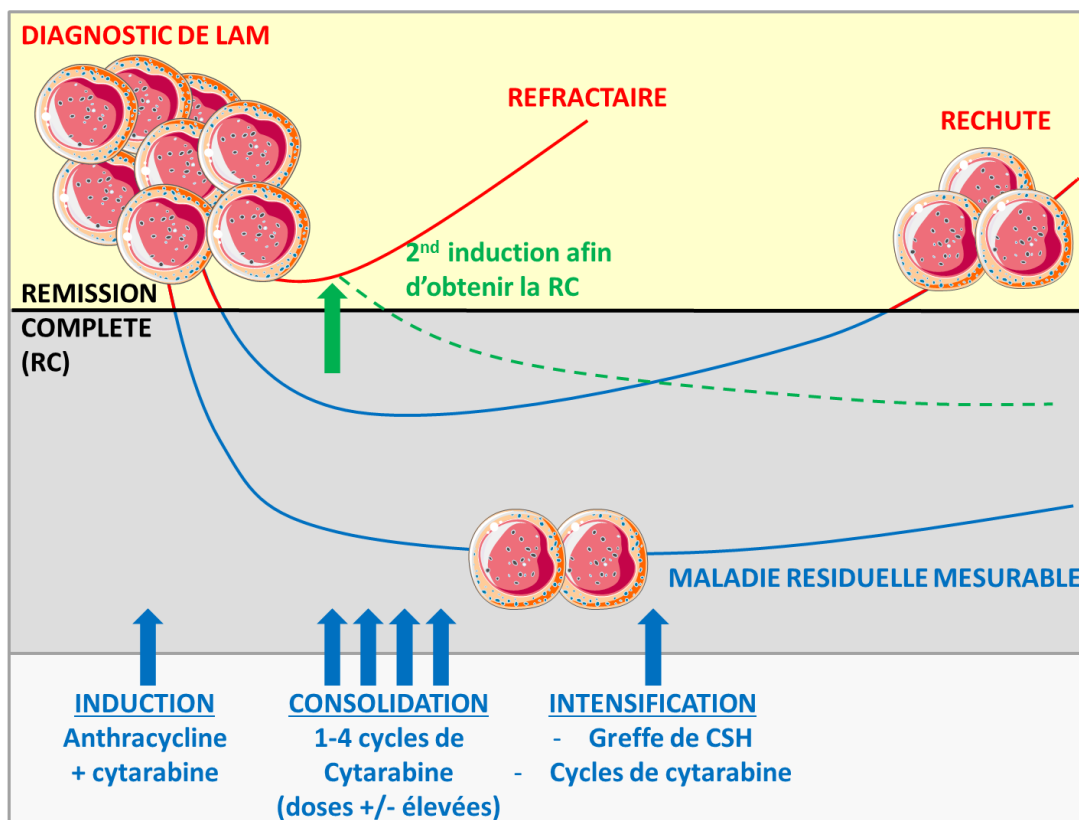


FIGURE 9 - SCHEMA THERAPEUTIQUE DES LAM. La plupart des patients diagnostiqués pour une LAM seront traités par une chimiothérapie d'induction intensive suivie d'une étape de consolidation et d'intensification afin d'obtenir une rémission complète. Certains patients à risque pourront subir une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Pour les patients réfractaires au traitement, une seconde phase d'induction pourra être réalisée en vue d'obtenir la rémission complète et de passer à la phase de consolidation.

a. La phase d'induction intensive

Cette première phase du traitement se fait généralement sur 10 jours avec l'association de 3 jours de traitement avec une anthracycline (daunorubicine à 60mg/m²/jour) et de 7 jours de cytarabine (100-200mg/m²/jour, Ara-C). L'objectif est d'obtenir la rémission complète et celle-ci est obtenue pour environ 60 à 80% des jeunes adultes et pour 40-60% pour les personnes âgés de plus de 60 ans.^{27,100}

Le patient est considéré en rémission complète dès lors que les critères cyto-morphologiques suivant sont atteints¹⁰¹ :

- Présence d'une quantité de granulocytes neutrophiles circulants supérieure ou égale à 1500 millions/L et une quantité de plaquettes supérieure à 100 000 millions/L.
- Absence de blastes dans la circulation sanguine
- Présence d'au minimum 20% de cellules matures dans la moelle osseuse et ceci pour les différentes lignées hématopoïétiques. De plus, celle-ci doit présenter moins de 5% de blastes et une absence de corps d'Auer.

- Enfin, aucune infiltration extramédullaire ne doit être observée telle qu'une atteinte du système nerveux central ou des tissus mous.

Cependant, cette définition de la rémission complète est ancienne et inexacte puisqu'une grande majorité de ces patients vont rechuter à plus ou moins long terme. Ceci est dû à la présence de cellules résiduelles non détectables par la méthode de détection cytomorphologique. De plus, on parle de rémission partielle lorsque le patient présente l'ensemble des critères de la rémission complète mais conserve un pourcentage de blastes médullaires compris entre 5 et 25%.

b. La phase de consolidation

La phase d'induction est toujours suivie d'une phase dite de consolidation afin de conserver le patient en rémission complète.

Il existe plusieurs stratégies pour cette phase de traitement en fonction des facteurs de risque génétiques. Le traitement de consolidation emploie généralement des doses importantes de cytarabine et celui-ci est préconisé pour les groupes à risque favorable ou intermédiaire. Concernant les patients à pronostic intermédiaire ou défavorable, une greffe de cellules souches hématopoïétiques peut leur être proposée.

(1) Traitement de consolidation

La consolidation classique consiste en 2 à 4 cycles de hautes doses de chimiothérapie (cytarabine ou des agents similaires). Cependant, différentes études ont montré que des doses intermédiaires de chimiothérapie avaient des effets similaires remettant en cause l'intérêt des hautes doses utilisées.^{102,103} La détection des cellules leucémiques persistantes permet maintenant d'adapter le traitement et éventuellement de proposer au patient une greffe de cellules souches hématopoïétiques si cela est possible.

Il n'a pas été montré un avantage thérapeutique à la greffe de cellules souches hématopoïétiques par rapport à la chimiothérapie de consolidation mais celle-ci peut être une alternative pour certains patients à risque (patients présentant un risque de rechute élevé ou ceux ayant une leucémie réfractaire au traitement).²⁷

(2) La greffe de cellules souches hématopoïétiques

Deux types de greffe de cellules souches hématopoïétiques sont possibles : l'autogreffe et l'allogreffe. Celles-ci ont deux objectifs, premièrement restaurer l'hématopoïèse et deuxièmement provoquer le développement d'une réponse immunitaire des cellules allogreffées contre les cellules leucémiques.

Tout d'abord, l'autogreffe se faisant à partir des cellules souches isolées du patient lui-même après un cycle intensif de consolidation ayant éliminé les cellules résiduelles et créé une déplétion de la moelle osseuse pour favoriser la prise de greffe. Cette greffe autologue est employée pour les patients jeunes à risque intermédiaire en première rémission complète, et dans le cas où un donneur possédant un HLA (Human leucocyte antigen) compatible n'a pas été trouvé.¹⁰⁴

Concernant l'allogreffe, elle sera réalisée si le bénéfice est supérieur au risque. Les cellules souches hématopoïétiques proviennent d'un donneur sain ayant un HLA compatible. Au préalable de la greffe, deux possibilités existent, un traitement myéloablatif ou une chimiothérapie à des doses réduites. Cette dernière est principalement utilisée pour traiter les patients âgés ou pour les jeunes avec des comorbidités graves. Il est préconisé d'utiliser le traitement myéloablatif pour les jeunes adultes pouvant tolérer le traitement.²⁷

La greffe est le seul choix thérapeutique pour les patients réfractaires au traitement et peut aussi être préconisée pour les patients avec un risque de rechute élevée (risque supérieur à 35-40%).

Après greffe, un suivi de la prise ou, au contraire, de la non-prise de greffe est effectuée par une analyse du chimérisme à partir du sang ou de la MO des patients. Cette analyse permet de discerner et de quantifier les populations hématopoïétiques provenant du donneur et du receveur à l'aide de marqueurs génétiques identifiés en amont de la greffe.

c. Adaptation du traitement selon le patient

Comme nous avons pu le voir précédemment, le choix thérapeutique s'appuie sur les facteurs pronostics afin de réduire la mortalité liée au traitement tout en permettant d'éliminer les cellules leucémiques.

En règle générale, le traitement d'induction sera le même pour l'ensemble des patients, sauf pour des patients ne pouvant supporter celui-ci. Dans ce cas, le patient s'il est éligible pourra être inclus dans un essai clinique ou recevoir des doses plus faibles de cytarabine. La stratégie de consolidation est beaucoup plus variable et doit être adaptée à chaque patient en prenant en compte les facteurs de risque liés au patient lui-même mais surtout ceux liés à la leucémie.

(1) Traitement de l'adulte jeune (moins de 60 ans)

Une consolidation de plusieurs cycles de hautes doses de cytarabine sera privilégiée pour les patients en bon état général après le traitement d'induction et présentant des anomalies

considérées comme à risque favorable ou intermédiaire. Pour les autres, c'est-à-dire avec des risques de comorbidités élevés ou appartenant à la classification défavorable, ils pourront bénéficier d'une allogreffe de CSH.

(2) Traitement du sujet âgé

L'âge de 60-65 ans est généralement la tranche d'âge utilisé pour définir le sujet âgé. Comme vu précédemment, la moyenne d'âge au diagnostic est de 71 ans, les sujets âgés sont donc une majorité des patients à traiter. Il n'existe pas de consensus quant à la procédure thérapeutique à entreprendre, cependant, les sujets considérés en bon état général (pas de comorbidités, bon statut de performance, ...) peuvent recevoir la phase d'induction et de consolidation classique bien que des doses de cytarabine intermédiaires sont souvent l'option employée pour la consolidation.

Pour les patients présentant des risques cytogénétiques intermédiaires ou défavorables, il n'existe pas de consensus quant à la procédure thérapeutique à entreprendre. Il est conseillé de penser à l'allogreffe pour les patients sans comorbidités élevées ou se diriger vers des thérapies plus spécifiques.^{27,100}

d. Les thérapies ciblées

Une majorité de ces nouvelles thérapies sont évaluées chez les patients réfractaires au traitement ou en rechute leucémique. Ces nouveaux traitements sont des composés ciblant des gènes impliqués dans le métabolisme, la régulation épigénétique, le cycle cellulaire ; des inhibiteurs de protéines kinases ; des immunothérapies cellulaires ou des anticorps bloquants ; et également des thérapies ciblant le microenvironnement leucémique.

(1) Inhibiteurs de protéines kinases

Il existe des inhibiteurs de protéines kinases et d'autres protéines impliquées dans des voies de signalisation modifiées dans les LAM tels que les inhibiteurs ciblant FLT3 et/ou c-KIT. Une majorité des inhibiteurs de première génération ne sont pas spécifiques d'une protéine mais d'un ensemble de protéines kinases et ont été utilisés en premier lieu dans d'autres hémopathies malignes.

Actuellement, plusieurs générations d'inhibiteurs de FLT3 sont en cours d'essai clinique à différents stades de développement. C'est le cas d'un inhibiteur de première génération (midostaurin) qui a fait l'objet d'un essai clinique de phase III en association avec la chimiothérapie standard chez des patients jeunes mutés pour le gène *FLT3* et a montré une amélioration de la survie globale.¹⁰⁵ Les autres inhibiteurs de première génération ne semblent

pas augmenter la survie de ces patients. De plus, une étude récente semble montrer des résistances à un inhibiteur FLT3 de seconde génération, le quizartinib chez certains patients leucémiques.¹⁰⁶

(2) Ciblage de modulateurs épigénétiques

Suite à la découverte de modifications épigénétiques récurrentes chez les patients atteints de LAM, le développement de traitements ciblant ces modulateurs a rapidement suivi. En effet, plusieurs inhibiteurs sont en cours d'essai clinique tels que des inhibiteurs d'IDH1 et IDH2 muté, ou des inhibiteurs de protéines appartenant à la famille BET (bromodomain and extra-terminal).¹⁰⁷ Notamment, un inhibiteur d'IDH2 muté, l'enasidenib, a montré une amélioration de la survie globale associée à une différenciation des myéloblastes leucémiques semblant participer aux effets bénéfiques de la thérapie.¹⁰⁸ Cependant, une étude a révélé une résistance acquise à cet inhibiteur chez deux patients qui ont vu leur maladie progresser associé à une augmentation du taux de 2-HG sanguins. Cette résistance semble due à l'émergence d'une seconde mutation d'IDH2 chez ces patients.¹⁰⁹ De même, un inhibiteur d'IDH1 muté est en cours d'essai clinique et semble montrer une amélioration de la survie de ces patients avec un taux d'effets secondaires tels que le syndrome de différenciation aigu assez faible (environ 2%).¹¹⁰ Une autre étude a montré que la restauration de la différenciation par ce traitement était variable selon les patients et dépendait des clones leucémiques (selon le stade ancestral à terminal). De plus, les auteurs ont démontré que le blocage de la différenciation et les rechutes leucémiques ne sont pas la conséquence d'une nouvelle mutation IDH2 mais de mécanismes de sélection et d'évolution clonale.¹¹¹

(3) L'immunothérapie cellulaire et humorale

Le système immunitaire est, en condition physiologique, capable d'éliminer les éléments étrangers, notamment il assure la surveillance et la dégradation des cellules transformées de l'organisme avant le développement tumoral. Cependant, différents mécanismes sont employés par les cellules cancéreuses pour échapper au système immunitaire. Parmi ces derniers, on retrouve une diminution ou une perte d'expression d'antigènes leucémiques, l'expression aberrante de ligands inhibiteurs des lymphocytes T (PD-L1), l'expression de cytokines immunosuppressives (TGF- β , IDO) ou encore le recrutement de cellules immunosuppressives tels que les lymphocytes T régulateurs ou les cellules myéloïdes immunosuppressives par les cellules leucémiques.¹¹²

C'est pourquoi, les thérapies s'intéressant à rétablir et/ou stimuler le système immunitaire sont en développement depuis ces dernières années. Notamment, il existe des anticorps

monoclonaux couplés à des agents cytotoxiques et ciblant des antigènes présents à la surface des cellules leucémiques. C'est le cas de l'anti-CD33 (Gemtuzumab ozogamicine) qui après avoir été commercialisé puis retiré du marché en 2010 pour des complications sévères a été réintroduit en 2017 aux Etats-Unis à des doses beaucoup plus faibles et en association avec la chimiothérapie conventionnelle. L'antigène CD123, le récepteur à l'interleukine 3 est exprimé par les progéniteurs et les blastes leucémiques. Un anticorps spécifique de ce dernier a fait l'objet d'un essai clinique de phase I mais semble montrer peu de bénéfices.¹¹³ Plus récemment, cet anticorps bloquant couplé à un agent cytotoxique a été évalué *in vitro* sur des échantillons de patients et *in vivo* sur des modèles de xénogreffes et a montré une forte efficacité antitumorale.¹¹⁴

L'immunothérapie s'est également intéressée aux inhibiteurs des « checkpoints » immunitaires régulant négativement la fonctionnalité des lymphocytes T. On retrouve notamment les anticorps monoclonaux ciblant la protéine PD1 (Program cell-death protein) présente sur les lymphocytes T ou son ligand, PDL1 exprimé par les cellules tumorales et également les anti-CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated-protein 4). L'utilisation de ces anticorps bloquant permet de lever l'inactivation des lymphocytes T via l'interaction avec les cellules cancéreuses.¹¹⁵ Un essai clinique de phase II chez des patients leucémiques en rémission et traités par une chimiothérapie conventionnelle combinée au nivolumab (anti-PD1) est en cours d'étude.

Une autre stratégie repose sur la vaccination utilisant soit des peptides antigéniques tels que les antigènes WT1, PR-3 (Protéinase 3) ou PRAME (Preferentially expressed antigen of melanoma) directement; soit des cellules dendritiques qui vont présenter l'antigène leucémique et qui sera ainsi reconnue par les lymphocytes T.¹¹⁶

Ces dernières années, la génération de cellules CAR-T (Chimeric Antigen Receptor) a émergé afin d'éduquer les lymphocytes T du patient pour qu'ils reconnaissent et lysent les cellules leucémiques. Les CAR sont des récepteurs membranaires de synthèse liant un antigène tumoral exprimé à la surface des cellules cancéreuses. *In vitro*, les lymphocytes T du patient sont modifiés génétiquement afin qu'ils expriment le CAR. Cela permet d'induire la réponse lymphocytaire de manière indépendante de la liaison au HLA, pouvant être sous-exprimé par les cellules leucémiques.¹¹⁷ Les antigènes CD33 et CD123 sont exprimés seul ou en combinaison chez la quasi-totalité des patients atteints de LAM faisant de ces marqueurs des cibles intéressantes. Cependant, ces antigènes sont également exprimés par les cellules myéloïdes saines rendant l'utilisation de cette thérapie complexe et aspécifique. Une étude préclinique a

évalué l'efficacité des CAR-T ciblant le CD33 *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xénogreffes et a montré une action cytotoxique vis-à-vis des blastes leucémiques et une amélioration de la survie mais également une cytopénie et une diminution des progéniteurs myéloïdes sains suggérant une toxicité au long terme.¹¹⁸ L'antigène CD123 a donné des résultats similaires concernant l'impact sur les cellules saines. Une récente étude a testé l'action des cellules CAR-T (CD4⁺ et CD8⁺) anti-FLT3 et a également montré son efficacité *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une synergie lors de l'utilisation avec un inhibiteur de FLT3. Dans le but d'améliorer leur efficacité, Cartellieri et ses collaborateurs ont développé un système « on » /« off » permettant de contrôler de manière rapide et réversible l'activité des CAR-T afin de réduire les effets indésirables.¹¹⁹

(4) Thérapies ciblant le microenvironnement leucémique

Les CSL modifient leur microenvironnement pour favoriser leur développement notamment par l'utilisation d'un signal de « homing » vers la niche hématopoïétique nécessitant l'interaction CXCR4-CXCL12. Des inhibiteurs de CXCR4 sont en cours d'étude clinique (phase I/II) en vue de bloquer ce signal et ainsi obliger les cellules leucémiques à retourner dans la circulation sanguine afin d'augmenter leur sensibilité aux traitements. Une étude incluant des patients réfractaires au traitement ou en rechute ont reçu une chimiothérapie conventionnelle en association avec un antagoniste de CXCR4, le plérixafor, les résultats de cette étude ont montré une faible amélioration du taux de rémission complète.¹²⁰

Grâce à l'ensemble de ces thérapies (conventionnelles ou ciblées), la rémission complète est obtenue pour la plupart des patients adultes jeunes et pour 40 à 60% des patients ayant plus de 60 ans. Cependant, la majorité d'entre eux vont voir leur maladie réapparaître des mois voire des années après la fin du traitement et seulement 30 à 40% des jeunes adultes et moins de 20% des patients âgés survivront sur le long terme.^{94,121}

II. LA MALADIE RESIDUELLE MESURABLE/MINIMALE

II. A. GENERALITES

Le concept de maladie résiduelle mesurable ou anciennement appelée maladie résiduelle minimale (MRD) est à l'origine employé pour les hémopathies malignes même si ce terme est également utilisé dans les cancers solides.¹²² La maladie résiduelle est le mot générique pour parler de la présence de cellules cancéreuses persistant en faible quantité après le traitement. Comme vu précédemment, un patient présentant moins de 5% de blastes dans la moelle osseuse et une absence de cellules leucémiques circulantes est considéré en rémission complète. Ce seuil de 5% correspond en réalité à la limite de détection de l'analyse cyto-morphologique, permettant de détecter jusqu'à une cellule leucémique sur 20 cellules hématopoïétique.¹²³

La présence de patients rechutant parfois des années après la rémission complète a soulevé l'idée de la persistance de cellules résiduelles chez ces patients, cellules qui étaient jusqu'alors indétectables par l'analyse cyto-morphologique en place à cette époque.¹²⁴ En 1988, les premières études réalisées à l'aide des nouvelles techniques de biologie moléculaire ont mis en évidence le transcrite de fusion *BCR-ABL* chez des patients considérés en rémission complète et ont permis la détection de cette MRD.¹²⁵

En effet, la majeure partie des cellules leucémiques est éliminée par la chimiothérapie d'induction permettant d'obtenir la rémission complète des patients. Cependant, une faible quantité peut échapper à cette élimination, persister dans différents organes tels que la moelle osseuse et être responsable des rechutes après un laps de temps plus ou moins important, c'est le cas d'environ 50% des patients adultes jeunes atteints de LAM.¹²¹

Détecter cette maladie résiduelle fut donc un centre d'intérêt important afin de répondre à différents objectifs. Le but premier de cette détection était de mieux considérer les patients en rémission ou non en améliorant la sensibilité des méthodes utilisées pour déceler les cellules leucémiques et ainsi adapter le traitement. Le deuxième objectif était d'améliorer la prédiction des rechutes et ainsi de prendre en charge plus précocement ces patients. Enfin, la détection de ces cellules tout au long du traitement permet d'évaluer l'efficacité de celui-ci afin de déterminer si le patient est répondeur ou réfractaire et ainsi moduler ou non la prise en charge et le traitement.

Le développement des techniques d'analyses ont permis de mettre en évidence des marqueurs génétiques et phénotypiques pouvant permettre le suivi d'une manière la plus sensible, la plus reproductible et la plus spécifique possible ces cellules résiduelles.

Depuis les années 2000, il existe deux principales méthodes qui permettent de suivre la MRD chez les patients atteints de LAM durant et après le traitement. La première méthode est une approche cellulaire qui détecte des marqueurs phénotypiques aberrants (LAIP ou DfN) exprimés par les cellules leucémiques par cytométrie en flux. La seconde méthode est la PCR en temps réel (qPCR) pour suivre l'expression des anomalies cytogénétiques ou des mutations de gènes exprimés par les blastes leucémiques. De nouvelles méthodes d'analyse incluant la PCR digitale et la technique NGS (séquençage de nouvelles générations) sont en cours de développement afin d'améliorer la sensibilité de ce suivi, cependant ces dernières restent des techniques coûteuses et donc difficilement applicables à la détection en routine.¹²³

La limite de détection de la maladie résiduelle leucémique varie selon les méthodes employées. En effet, la cytométrie en flux permet d'identifier au mieux une cellule sur 10000 cellules. Tandis que les techniques de qPCR et NGS peuvent descendre jusqu'à la différenciation d'une cellule anormale sur 1 million de cellules. De plus, la détection n'est pas seulement dépendante de la méthode utilisée mais également du type d'échantillon et du marqueur permettant le suivi de la maladie du patient. Par exemple, la limite de détection par qPCR d'un gène surexprimé est d'environ 10^{-4} tandis que celle d'un gène muté ou d'un gène de fusion peut descendre jusque 10^{-6} .^{126,127} Ces techniques ont permis d'améliorer le suivi des patients et leurs prises en charge puisque certains marqueurs sont de très bons indicateurs de la MRD et permettent ainsi de prédire les rechutes chez ces patients bien avant les signes et symptômes de la maladie. Cela permet ainsi de mettre en place une nouvelle ligne de traitement plus précocement. De nombreuses études indiquent qu'une MRD positive a une valeur pronostique forte puisqu'elle est associée à un risque de rechute augmenté et une survie globale plus courte que les patients MRD négatifs (Figure 10).^{128,129} Le terme de rémission moléculaire est utilisé quand un patient suivi par l'expression d'un marqueur moléculaire spécifique ne présente plus cette expression. Dès la réapparition de la MRD par cytométrie en flux ou RT-qPCR, le patient est considéré en rechute moléculaire.²⁷

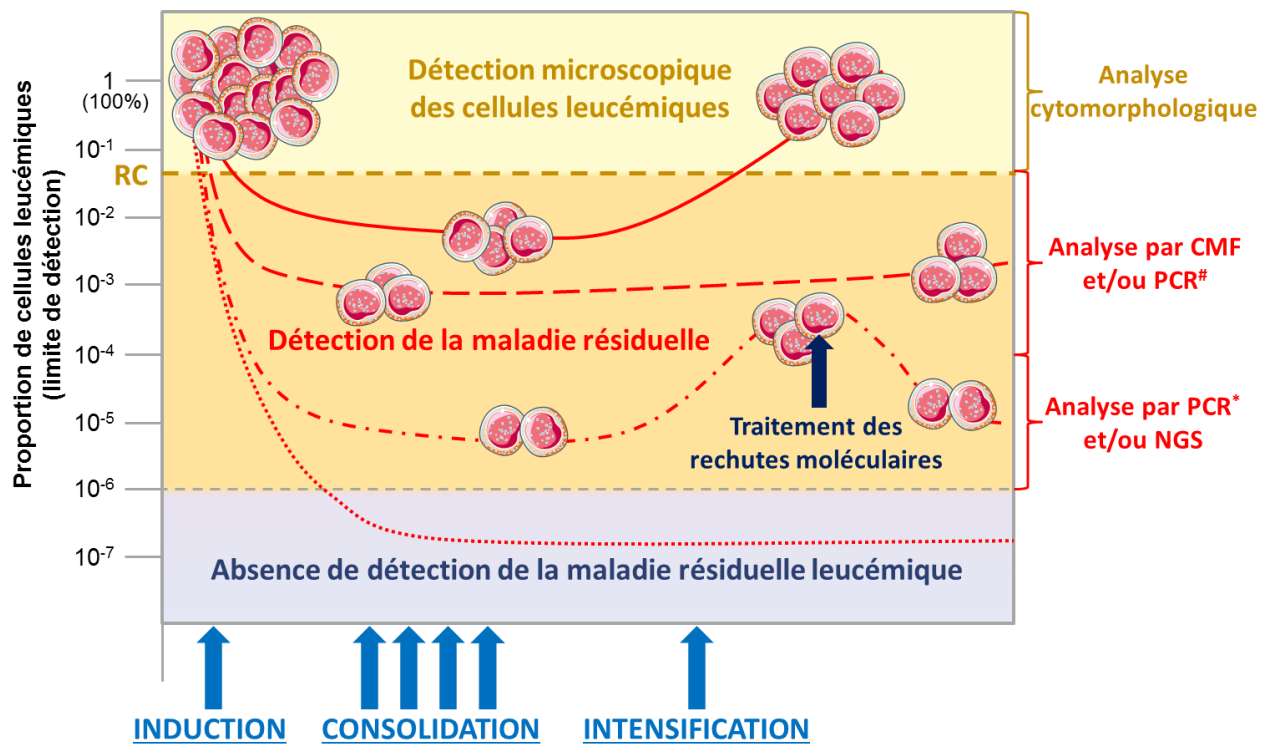


FIGURE 10 - METHODES ET LIMITES DE DETECTION DE LA MALADIE RESIDUELLE LEUCEMIQUE.

L'analyse cytomorphologique est réalisée par un anatomopathologiste qui pourra au mieux détecter 1 cellule leucémique sur 20. La cytométrie en flux peut, elle détecter une cellule anormale parmi 10000 cellules. Les techniques de PCR et de NGS peuvent descendre jusqu'à une sensibilité de 10^{-6} selon le type de marqueurs. En effet, la limite de détection pour une surexpression de gènes ne pourra pas être supérieure à 10^{-4} (#) tandis que des gènes de fusion, ou des mutations (*) pourront permettre d'identifier une cellule sur un million. CMF : cytométrie en flux, PCR : réaction de polymérisation en chaîne, NGS : séquençage de nouvelles générations, RC : rémission complète. Inspiré de Hourigan *et al.*, 2013.¹²⁷

L'identification des marqueurs pouvant servir au suivi de la MRD de chaque patient est réalisée au diagnostic à partir du sang et/ou de la moelle osseuse par les deux principales méthodes de détection. La sensibilité de détection semble être corrélée selon ces deux types de prélèvement avec en général une sensibilité supérieure pour la détection dans la moelle osseuse par cytométrie en flux. D'autres études ont observé des résultats similaires concernant la détection par qPCR, notamment lors de l'utilisation du marqueur *CBF* et la surexpression du gène *WT1*.^{92,130,131}

La détection et le suivi de cette MRD est rendu difficile par l'hétérogénéité de cette maladie. En effet, un patient peut présenter dès le diagnostic, différents sous-clones leucémiques avec des aberrations, des phénotypes différents. Ces sous-clones présents au diagnostic ne seront pas forcément retrouvés après le traitement et les aberrations les caractérisant auront disparu avec eux.¹³ La difficulté est donc d'avoir un marqueur stable au cours de la maladie et du traitement mais aussi de sélectionner le marqueur représentatif de la maladie c'est-à-dire celui associé à

la cellule ayant le potentiel leucémogène et donc pouvant induire les rechutes.¹²⁶ La plupart des études récentes s'accordent à dire qu'il est nécessaire de combiner différentes techniques pour le suivi de la MRD afin d'avoir des résultats concordants et également de combiner un maximum de marqueurs afin de pallier aux problèmes de l'hétérogénéité et de l'évolution clonale.¹³²

II. B. DETECTION DE LA MALADIE RESIDUELLE MESURABLE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Dans les années 70, plusieurs études abordaient la possibilité de modifications phénotypiques des cellules leucémiques par la mise en évidence de réponses anticorps contre ces cellules et une absence de réponse vis-à-vis des cellules saines attestant d'antigènes spécifiques aux cellules cancéreuses. Suite à cela de nombreuses études décrivent l'expression anormale d'antigènes leucémiques.^{133,134}

Théoriquement, l'immunophénotypage peut être appliqué au suivi de la maladie résiduelle de l'ensemble des patients atteints de leucémie. Cependant, la sensibilité de cette technique est plus faible que les analyses par biologie moléculaire et peut atteindre un seuil maximal de 10^{-4} (Figure 10).¹²⁷

II. B. 1. LES DEUX APPROCHES DE DETECTION DES LAIP

Ce suivi peut se faire selon deux approches. La première approche associe un grand nombre d'anticorps dirigés contre des antigènes membranaires ou cytoplasmiques permettant de déterminer la présence ou non de phénotypes aberrants (LAIP) au diagnostic. Ces phénotypes aberrants sont ensuite détectés pour le suivi de la MRD, évaluer l'efficacité du traitement de façon précoce et prévenir une éventuelle rechute. Chaque immunophénotype est spécifique du patient, et il est primordial de l'identifier précisément au moment du diagnostic.¹³⁵

Ces immunophénotypes aberrants associés à la leucémie sont classés en quatre groupes, l'expression d'antigènes asynchrones, c'est-à-dire l'expression d'antigènes myéloïdes de différents stades de maturation comme par exemple des antigènes de cellules immatures (CD34 ou CD117) associés à des antigènes de maturité tels que le CD11b ou le CD65; l'expression d'antigènes de plusieurs lignées cellulaires par exemple des marqueurs lymphoïdes sur des myéloblastes, et la perte ou la surexpression d'antigènes souvent des antigènes d'immaturité (CD117, HLA-DR).¹³⁶

La seconde approche identifie les phénotypes différents des cellules normales (phénotypage de la moelle osseuse lors de la régénération médullaire post-traitement), c'est la méthode DfN (Different from Normal). Cette seconde méthode est moins utilisée, souvent pour les patients dont le phénotypage au diagnostic n'a pas été réalisé ou alors en cas d'apparition de nouveaux

phénotypes aberrants différents du diagnostic et révélateurs d'une évolution de la leucémie (moins de 10% des patients). Cette évolution peut être expliquée par une instabilité antigénique du clone leucémique, d'une sélection clonale par le traitement avec l'émergence d'un sous clone minoritaire, ou encore d'une totale évolution clonale avec l'apparition d'un nouveau clone leucémique associé à un changement du phénotype. Le changement d'au moins un antigène (LAIP) entre le diagnostic et le suivi est retrouvé chez 91% des patients atteints de LAM et correspondant en grande majorité à une surexpression d'antigènes myéloïdes et/ou de cellules souches.¹³⁷ Cependant, il est important de noter que la surexpression d'antigènes peut être visible dans les précurseurs myéloïdes sains, notamment lors de la reconstitution de la MO après une greffe de CSH ou un traitement par chimiothérapie. C'est pourquoi la seconde approche (DfN) peut éviter ces limitations.

Dans la majorité des cas, les deux méthodes apportent un résultat identique, cependant il est préconisé par l'ELN (European Leukemia Net) de combiner les deux approches afin de détecter au mieux une éventuelle évolution de la leucémie et d'un changement phénotypique au cours du traitement ou lors du suivi.¹²³ Cependant, il n'existe pour le moment pas de méthode standardisée de détection.

De nombreuses études s'intéressent à améliorer la détection de la MRD par cytométrie en flux. Notamment, une étude de Zeijlemaker et ses collaborateurs a mis en place un immunophénotypage des CSL à partir d'un seul tube identifiant ces cellules à l'aide de 13 marqueurs fluorescents permettant ainsi de pallier à la faible quantité de cellules récupérées parfois dans la moelle osseuse des patients notamment lors du traitement qui entraîne une immunodéplétion de la moelle osseuse.⁹²

II. B. 2. VALEUR PRONOSTIQUE ET PREDICTIVE DES RECHUTES DE CETTE METHODE DE DETECTION DES LAIP

Plusieurs études se sont intéressées au rôle pronostique de cette détection par cytométrie en flux en fonction du moment thérapeutique. En effet, il a été montré l'importance de cette détection précoce des cellules leucémiques résiduelles que ce soit chez des patients jeunes ou ayant plus de 65 ans puisqu'elle permet de savoir si le patient est répondeur au traitement.¹³⁸ Une étude de la maladie résiduelle de patients en rémission complète, après chimiothérapie d'induction ou de consolidation a été effectuée par l'équipe de Kern et a pu détecter au moins un phénotype aberrant pour chaque patient. Une réduction du ratio des cellules LAIP positives entre le diagnostic et la rémission complète (après induction et consolidation) est associée à une amélioration significative de la survie sans rechute de ces patients.¹³⁹

La MRD a également été évaluée dans la moelle osseuse des patients atteints de LAM puis traités par plusieurs cycles de chimiothérapie ou après une greffe de CSH autologues et a montré une corrélation entre la survie sans rechute de ces patients et le pourcentage de cellules résiduelles détectées par immunophénotypage.¹³⁶

Ces différentes études montrent donc la valeur pronostic de ce suivi à différents temps du traitement (post-induction, post-consolidation ou après greffe). Cela permet d'évaluer la réponse au traitement mais également d'apporter une information sur une éventuelle rechute ou une rémission complète à long terme.

II. C. DETECTION DE LA MALADIE RESIDUELLE MESURABLE PAR DES MARQUEURS MOLECULAIRES (qPCR)

Le nombre de marqueurs moléculaires identifiés est en constante augmentation avec les nouvelles techniques de séquençage, cependant, le pourcentage de patients dont la MRD peut être suivie à l'aide d'un de ces marqueurs moléculaires par qPCR n'atteint que les 40-50%. Pour ces patients, le suivi de la maladie résiduelle sera réalisé par des approches de PCR en temps réel et de PCR digitale qui sont les techniques les plus sensibles de détection puisqu'elles permettent une détection entre 10^{-4} et 10^{-6} (Figure 10).¹³²

Il existe des marqueurs moléculaires de plusieurs types, il peut s'agir de gènes mutés (*NPM1*), de transcrits de fusion (*AML1-ETO*, *PML-RAR α*), ou de surexpression de gènes tels que *WT1* que nous développerons plus précisément par la suite (voir §III, -p60-) (Figure 11).

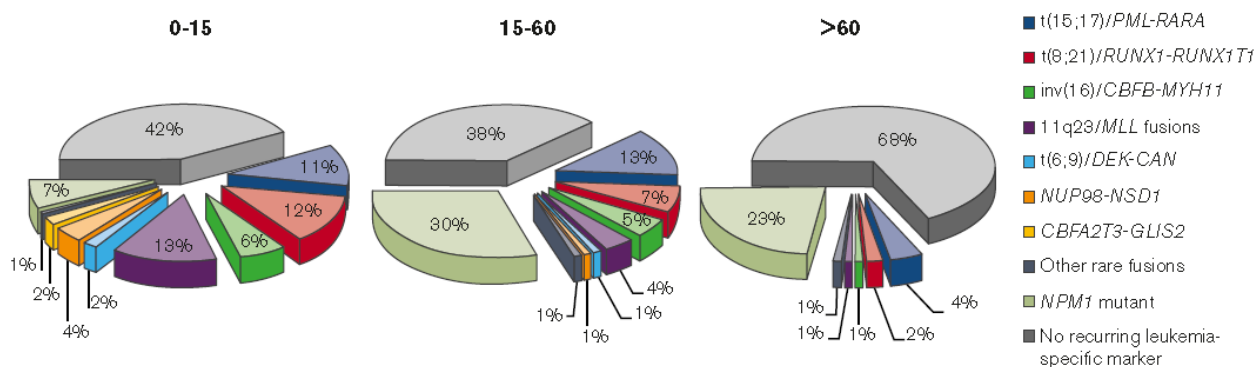


FIGURE 11 – MARQUEURS DE LA MALADIE RESIDUELLE ET PROPORTION DE DETECTION SELON L'AGE DU PATIENT PAR LES TECHNIQUES DE QPCR. Ne sont représentés ici que les marqueurs considérés comme de bons indicateurs de la maladie résiduelle et la proportion des patients présentant

ces différentes anomalies. Indifféremment de l'âge environ la moitié des patients ne peuvent être suivis à l'aide d'un marqueur spécifique par qPCR. Tiré de Ravandi *et al.*, 2018.¹²⁶

Chaque marqueur n'offre pas les mêmes renseignements, certains pourront être détectés de manière très sensible et auront un rôle prédictif des rechutes par leur stabilité d'expression (*NPM1*) et d'autres auront plutôt une valeur pronostique (*FLT3-ITD*).

II. C. 1. DETECTION DES GENES DE FUSION POUR LE SUIVI DE LA MRD

Les techniques de RT-qPCR ont été développées au départ pour le suivi de transcrits de fusion tels que *CBFβ-MYH11*, *AML1-ETO* ou *PML-RARα*. En effet, la persistance de l'expression de ces transcrits après traitement d'induction et/ou de consolidation est indicatrice d'un risque de rechute élevé.

Une étude réalisée sur 278 patients a suivi l'expression des transcrits de fusion impliquant le gène CBF. Plus précisément, la maladie résiduelle de ces patients présentant la translocation t(8;21) ou l'inversion 16 fut suivie par l'expression du gène de fusion *AML1-ETO* et *CBFβ-MYH11*, respectivement. Après la chimiothérapie d'induction, les patients considérés en rémission complète et présentant une diminution de l'expression de *AML1-ETO* dans la moelle osseuse supérieure à 3 logarithmes (log) avaient un risque de rechute nettement diminué (4%). Des résultats similaires ont été observés pour le suivi de l'aberration *CBFβ-MYH11* avec un risque de rechute de 21% pour les patients présentant une expression du transcrit inférieure à 10 copies. Ces observations sont identiques après les différents cycles de consolidation et montrent que le suivi de ces marqueurs est un bon indicateur de la réponse au traitement.¹⁴⁰

Une autre étude ayant classé les patients en deux groupes à faible ou fort risque de rechute, a ainsi entrepris une greffe allogénique de CSH pour les patients à haut risque de rechute. Les résultats indiquent une survie sans maladie prolongée pour 61% de ces patients contrairement aux patients non-greffés à haut risque (19,6%).¹⁴¹ Cela suggère un rôle informatif de la MRD pour moduler la prise en charge thérapeutique du patient non-répondeur.

II. C. 2. LES MUTATIONS DE GENES COMME MARQUEUR DE LA MRD

Comme nous avons pu le voir précédemment, certains gènes sont mutés de manière précoce avant le développement leucémique. Ce processus d'hématopoïèse pré-leucémique concerne notamment les gènes *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1*. Cependant, il est nécessaire de prendre en considération que ces mutations sont également retrouvées chez des patients sains qui ne sont pas atteints d'hémopathies malignes. La plupart du temps l'expression de ces marqueurs est stable et persiste même après l'obtention de la rémission complète pendant plusieurs

années.¹⁴² Une étude par NGS a analysé l'évolution de ces mutations (DNMT3A, TET2, ...) après traitement, chez des patients présentant au moins l'une de ces mutations pré-leucémiques au diagnostic. Cette analyse a révélé la persistance de ces mutations chez plus de la moitié des patients en rémission complète et les auteurs n'ont pas montré un risque de rechute augmenté associé à cette persistance. Il pose d'ailleurs l'hypothèse que ces anomalies génétiques persistent dans des clones pré-leucémiques qui reconstituent la moelle osseuse après le traitement d'induction.¹²⁹ Cette persistance ne semble donc pas être associée à un risque de rechute augmenté, cependant, la disparition de ces mutations précoces associées à la disparition des autres mutations plus tardives devraient normalement signifier de l'élimination du clone pré-leucémique et des cellules leucémiques.

De même, les mutations de certains gènes sont instables au cours du traitement et rendent leur utilisation pour le suivi non fiable, c'est le cas des mutations du gène *FLT3* (ITD et TKD), des gènes *RAS* ou des gènes *IDH1/2*.^{90,123} Cependant, certains d'entre eux peuvent tout de même être utilisés en association avec un autre marqueur car ils peuvent avoir un rôle pronostique (Tableau 4).¹²³

La mutation récurrente du gène *NPM1* touchant 20 à 30% des patients a fait l'objet de plusieurs études. L'ensemble de ces études ont révélé une sensibilité élevée de détection de ce transcrite entre 10^{-5} et 10^{-6} dans le sang et la moelle osseuse.¹²³ Notamment, une étude rétrospective sur 245 patients atteints de LAM et présentant des mutations sur le gène *NPM1* a été réalisée. Celle-ci a évalué l'expression de ce gène aux différents cycles du traitement (induction et consolidations) et il a été montré qu'une MRD négative est associée à une incidence de rechute faible et une survie globale nettement améliorée après l'induction et la consolidation.¹⁴³ De plus, ce transcrite est exprimé chez 69 patients sur 70 au moment de la rechute contrairement à d'autres gènes étudiés témoignant de sa stabilité au cours de l'évolution clonale et donc de sa fiabilité pour le suivi de la maladie résiduelle.¹⁴⁴

Une autre anomalie génétique pouvant servir au suivi des cellules leucémiques persistantes après traitement est la surexpression du gène *WT1* dans plus de 90% des LAM.

Chapitre 2 : Le gène et la protéine Wilms' Tumor 1

Le gène *WT1* porte le nom de la pathologie cancéreuse pédiatrique pour laquelle il a été identifié comme gène prédisposant à cette maladie en 1990. Cette tumeur de Wilms est un cancer rénal touchant environ 1 enfant sur 10 000. Celle-ci peut être associée à différents syndromes tels que le syndrome WAGR (Wilms tumor predisposition, Aniridia, Genitourinary abnormalities and Mental retardation), de Denys-Drash ou encore le syndrome de Frasier où des mutations germinales de *WT1* sont retrouvées. Dans environ 10% des cas de tumeurs de Wilms', on retrouve une délétion ou une mutation somatique du gène *WT1*, considérée comme un évènement précoce dans les formes sporadiques de la maladie.^{145,146}

Ce gène *WT1* a pu être décrit suite à l'identification et la caractérisation d'une délétion constitutionnelle sur le chromosome 11p13 d'enfants atteints du syndrome WAGR.^{147,148} Deux études de Call et Haber ont montré une expression tissulaire spécifique de ce gène, principalement par les cellules rénales et gonadiques, ainsi que certaines cellules hématopoïétiques. Ils ont également fourni une description plus précise de la séquence du gène avec notamment l'identification de 4 structures en doigt de zinc et d'une séquence riche en proline/glutamine attestant d'un probable rôle de facteur de transcription. Peu de temps auparavant en 1971, Alfred Knudson proposait l'hypothèse du double évènement (Two-hit hypothesis) pour expliquer les différences entre les formes sporadiques et héréditaires du rétinoblastome de l'enfant. Dans les formes familiales du rétinoblastome, l'hypothèse est qu'un premier évènement est germinal et à celui-ci s'ajoute au minimum un évènement somatique tandis que pour les formes sporadiques il s'agit d'au moins deux évènements somatiques.^{149,150} Les enfants présentant le syndrome WAGR ont au moins une copie délétée du gène dans l'ensemble des cellules analysées. Cependant lors de l'analyse des tumeurs, l'autre copie du gène est retrouvée mutée ou délétée. C'est pourquoi *WT1* a été classé comme un gène suppresseur de tumeur.^{151,152}

Des études plus récentes ont mis en évidence une surexpression de *WT1* dans de nombreux cancers de l'adulte incluant les leucémies, suggérant un rôle oncogénique du gène.¹⁵³⁻¹⁵⁷ Cependant, dans le cadre des leucémies aiguës myéloïdes, le gène *WT1* est muté chez environ 10% des patients laissant plutôt à penser à nouveau à un rôle suppresseur de tumeur.^{158,159}

Ces contradictions quant à la fonction oncogénique ou suppressive de tumeur de *WT1* peuvent s'expliquer par l'existence de nombreuses isoformes de la protéine ayant des fonctions biologiques variées.

I. GENERALITES – STRUCTURE DU GENE ET DE LA PROTEINE

Le gène *WT1* est localisé sur le bras court du chromosome 11 (11p13) chez l'Homme et sur le chromosome 2 de la souris. Ce gène couvre une séquence génomique d'environ 50 kilobases (kb) comprenant 10 exons qui génèrent un ARN messager (ARNm) d'environ 3,2kb. Plusieurs mécanismes mis en jeu sur cet ARNm vont conduire à l'existence d'au moins 36 isoformes connues de *WT1*.

I. A. PLUSIEURS SITES D'INITIATION DE LA TRADUCTION

Tout d'abord, plusieurs codons d'initiation de la traduction ont été identifiés. Le premier codon d'initiation ATG fut décrit en 1991 par Haber et ses collaborateurs ainsi qu'une description de la structure génomique de *WT1* (annoté +1 sur la figure 16).¹⁶⁰ Quelques années plus tard, deux autres équipes ont mis en évidence deux sites d'initiation supplémentaires, un ATG en position +378 par rapport à la première méthionine décrite et une leucine (codon CTG), 219 paires de bases avant l'ATG +1.^{161,162} En 2004, un quatrième site d'initiation a été décrit par Dallosso et ses collaborateurs, mettant en évidence l'existence d'un exon 1 alternatif muni de son propre promoteur (promoteur 1a) se situant dans l'intron 1 du gène. Ce transcrite *AWT1* (aussi connu sous la dénomination *sWT1*) ainsi formé conserve les exons 2 à 10 restants mais est dépourvu des 147 premiers acides aminés (Figure 12). Ce promoteur 1a est soumis à l'empreinte génétique dans certaines pathologies comme les tumeurs rénales où son expression est silencieuse sur l'allèle maternel par méthylation. Ceci n'a pas été confirmé dans le cadre des LAM et des tissus hématopoïétiques.¹⁶³

I. B. DIFFERENTS EPISSAGES ALTERNATIFS DECRITS

Suite à cela, l'ARNm peut subir deux types d'épissages alternatifs. Le premier épissage est localisé dans l'exon 5 (ex5) avec l'excision de 17 acides aminés dont les isoformes sont référencées par +/- ex5. Celui-ci n'est présent que chez les mammifères. Le second coupe 3 acides aminés (une lysine, une thréonine et une sérine, KTS) liant la troisième et la quatrième structure en doigt de zinc dont l'isoforme est symbolisé par +/-KTS.¹⁶⁰ Ce second épissage alternatif a été conservé au cours de l'évolution et est présent chez l'ensemble des vertébrés, attestant de son importance fonctionnelle.¹⁶⁴ Ceci conduit à la formation de 4 isoformes de taille allant de 36 à 62 kDa et celles-ci sont nommées A (-/-), B (+/-), C (-/+) et D (+/+) avec respectivement la présence (+) ou l'absence (-) de l'exon5/ la séquence KTS.

Ces 4 isoformes peuvent présenter les 4 sites d'initiation amenant donc à un total de 16 isoformes possibles. L'abondance protéique des 4 isoformes principales semblent être

conservée au cours du développement. En effet, les différentes études effectuées sur des tissus ou lignées cellulaires sain(e)s ou pathologiques humain(e)s ou murin(e)s montrent que l'isoforme majoritaire est l'isoforme D (+/+), suivi par les isoformes C et B dont l'abondance semble équivalente et enfin l'isoforme A est exprimée à un plus faible niveau.^{160,165,166} Ce ratio d'expression est retrouvé dans les différents tissus étudiés tels que la moelle osseuse, les reins, les ovaires, les testicules ou l'utérus.

En 2015, une nouvelle forme de WT1, désignée comme l'isoforme Ex4a(+), a été décrite présentant des effets antagonistes aux isoformes principales. Il s'agit d'une protéine tronquée en partie C-terminale par un phénomène d'épissage alternatif et ne possédant pas le domaine en doigt de zinc de liaison à l'ADN. Cette protéine est exprimée plus faiblement que les autres isoformes dans des lignées cellulaires de leucémies myéloïdes (K562, Kasumi-1 ou HL-60) mais aussi dans des lignées de cancers solides (poumons, fibrosarcomes, ...).¹⁶⁷

I. C. PHENOMENES D'EDITION ET DE MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES

Un premier phénomène d'édition de l'ARNm a été décrit par l'équipe de Sharma en 1994, où le changement d'un nucléotide en position 839 situé dans l'exon 6 induisait la transformation d'une leucine (CTC) en une proline (CCC) en position 280. Ceci a été décrit chez le rat mais est également retrouvé chez l'Homme. Les auteurs ont également montré, dans des cellules pulmonaires et rénales que ce mécanisme d'édition était impliqué dans le développement puisque le raton présentait majoritairement la forme de WT1 possédant la leucine tandis qu'à l'âge adulte les deux formes sont exprimées dans ces tissus.¹⁶⁸ Ainsi, la présence de ces sites d'initiation de la traduction, des épissages alternatifs et d'édition font monter à 36 le nombre d'isoformes de WT1 identifiées jusqu'à aujourd'hui.

Les isoformes de WT1 peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations au niveau du domaine de liaison à l'ADN (doigt de zinc 2 et 3) ou encore des sumoylations dans le domaine répresseur.¹⁶⁹ Aucun effet de la sumoylation sur l'activité de WT1 n'a encore été décrit. Cependant, un blocage de la capacité à lier l'ADN ainsi qu'une rétention de la protéine dans le cytoplasme a été montré pour la protéine phosphorylée.^{170,171}

L'exon 1 à 6 constitue la partie N-terminale du gène *WT1* et comporte une région riche en proline et glutamine jouant un rôle dans la régulation transcriptionnelle. Les résidus 84 à 179 codent pour un domaine répresseur de la transcription et à la suite un domaine d'activation s'étendant jusqu'au résidu 294. Ces deux domaines peuvent fonctionner de manière indépendante. L'isoforme AWT1 démarre après le domaine répresseur, pouvant expliquer des

fonctions opposées aux autres isoformes.^{172,173} Cette partie N-terminale comporte également un domaine d'homodimérisation (résidus 1-182), pouvant être une explication de l'effet dominant négatif de sa forme mutée dans les syndromes de Denys-Drash.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ La partie C-terminale qui s'étend de l'exon 7 à 10 est composée d'un domaine de liaison aux acides nucléiques (ADN et ARN) ainsi qu'aux protéines avec 4 structures en doigts de zinc de type Cystéine 2-Histidine 2 (Figure 12).¹⁷⁷

Trois des quatre doigts de zinc de cette protéine (ZF2-4) présentent environ 65% d'homologie de séquence protéique avec le facteur de transcription EGR-1 et est capable de reconnaître la séquence consensus de celui-ci.¹⁷⁸ Jusqu'à aujourd'hui, la première structure en doigt de zinc (ZF1) était considérée comme participant pas ou peu à la liaison des ADN et son rôle n'était pas connu. Cependant, des études récentes ont montré que ZF1 jouait un rôle dans la stabilité et l'affinité de liaison aux acides nucléiques. De plus, il serait capable de changer de conformation selon l'acide nucléique lié par les autres domaines en doigt de zinc mais ne participerait pas à la spécificité de l'ADN fixé.^{179,180} Le ZF1 aurait plus particulièrement un rôle à jouer dans la liaison des ARN.¹⁸¹

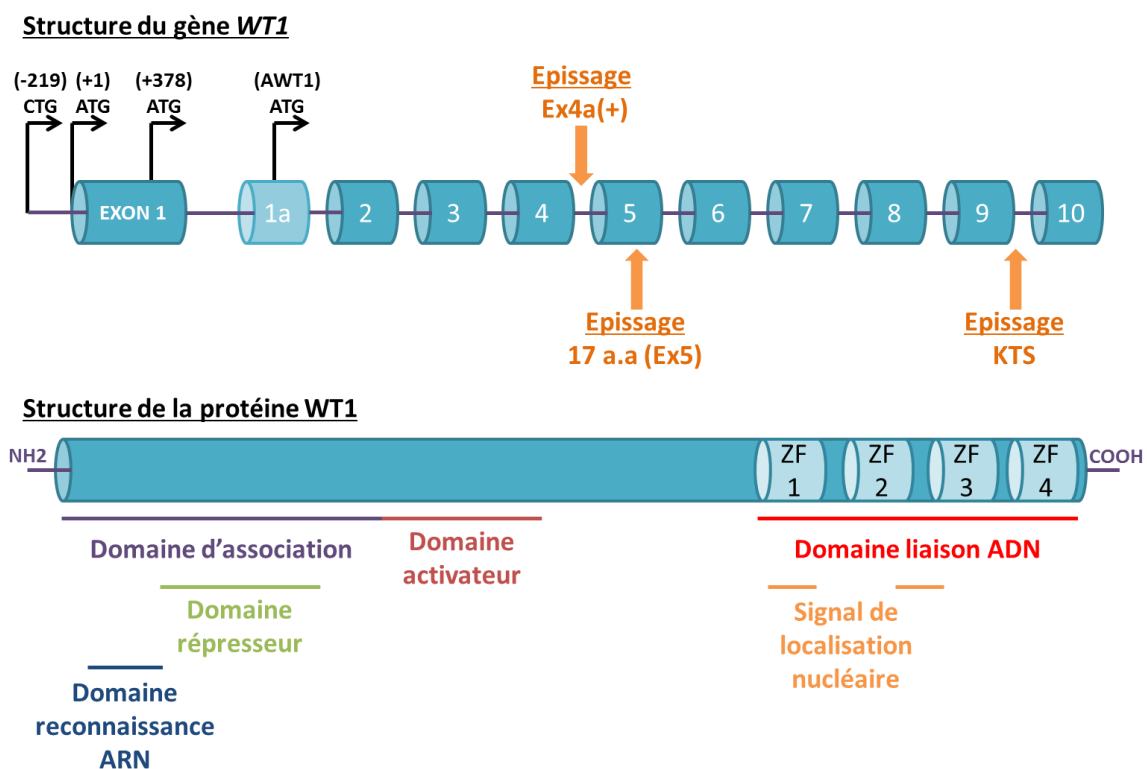


FIGURE 12 - SCHEMA DE LA STRUCTURE DU GENE ET DE LA PROTEINE WT1. Le gène *WT1* est constitué de 10 exons et possède 4 sites d'initiation de la traduction (indiqué par une flèche noire accompagné de la position). L'isoforme AWT1 démarre à partir d'un ATG alternatif se trouvant dans la partie intronique séparant l'exon 1 et 2 (1a). Une fois ce gène transcrit, il va subir plusieurs épissages alternatifs (symbolisés par les flèches orange) dont l'épissage des 17 acides aminés (a.a) dans l'exon 5

et des 3 acides aminés (KTS) entre l'exon 9 et 10 vont produire les 4 isoformes principales. La protéine WT1 possède plusieurs domaines. En partie C terminale, on retrouve les quatre structures en doigt de zinc (ZF1-4) permettant la liaison à l'ADN et également le signal de localisation nucléaire se trouvant au niveau du premier et entre le deuxième et troisième doigt de zinc. En partie N-terminale de la protéine se trouve les domaines d'association aux partenaires de WT1 et permettant aussi son homodimérisation ainsi qu'un domaine activateur, un domaine répresseur et un domaine de reconnaissance des ARN. Inspiré de Yang *et al.*, 2007.¹⁸²

I. D. LOCALISATION NUCLEAIRE DE LA PROTEINE WT1

Une localisation nucléaire de la protéine WT1, en concordance avec son rôle de facteur de transcription a été mise en évidence.¹⁸³ Des expériences de colocalisation ont montré que les isoformes +KTS de WT1 se situait dans des compartiments nucléaires (corps de Cajal et speckles) impliqués dans l'épissage des ARN pré-messagers tandis que les isoformes -KTS étaient retrouvées principalement co-exprimées à d'autres facteurs de transcription et à des séquences d'ADN spécifiques.¹⁸¹ De plus, des traitements à la RNase altèrent uniquement la localisation nucléaire des isoformes +KTS suggérant un rôle post-transcriptionnel de ces isoformes.¹⁸⁴ Des expériences de résonance magnétique nucléaire ont confirmé la formation d'une structure plus stable des isoformes -KTS en présence d'un ADN cible par rapport aux isoformes comprenant les trois acides aminés KTS. Les auteurs expliquent que cette perte de stabilité est due à l'insertion de ces acides aminés diminuant les interactions entre les deux structures en doigt de zinc.¹⁸⁵ L'intégration ou non de l'exon 5 ne semble pas impacter sa localisation.

Des auteurs ont identifié à l'aide de mutants spécifiques, l'existence de deux signaux de localisation nucléaire (NLS) sur la séquence de WT1 se trouvant entre la position 291 et 350, plus précisément au niveau de la première structure et entre la deuxième et troisième structure en doigt de zinc (figure 12).¹⁸⁶

Ces localisations différentes des isoformes +/- KTS attestent de rôles spécifiques à chacune, ceci étant certainement lié à la modification de la liaison des acides nucléiques par la présence ou l'absence de cet épissage de 3 acides aminés influençant la liaison du domaine en doigt de zinc. La localisation de ces isoformes ainsi que sa structure laisse penser à un rôle transcriptionnel et post-transcriptionnel de WT1.

II. REGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL ET POST-TRANSCRIPTIONNEL

II. A. WT1 ET SES GENES CIBLES

De par son domaine de liaison des acides nucléiques avec ses structures en doigt de zinc, WT1 peut réguler la transcription de gènes cibles. Selon le type cellulaire, les isoformes de WT1 et le taux d'expression de celles-ci, il pourra agir comme activateur ou répresseur de la transcription. Plusieurs motifs d'ADN reconnus par WT1 ont été référencés, le premier a été le motif reconnu par EGR-1 grâce à l'homologie entre le domaine en doigt de zinc de ces deux gènes.¹⁸⁷ Deux autres motifs dérivant du motif EGR-1 ont été décrits par la suite par Hamilton et ses collaborateurs ainsi que Nakagama et son équipe avec le motif WTE.^{188,189} Par la suite, lors de l'identification de nouvelles cibles de WT1, d'autres séquences ont été décrites tels que le motif (TCC)_n, ou le motif WKE.^{190,191} La plupart de ces motifs de liaison reconnus par WT1 concorde avec la séquence décrite par des études de cristallographie.¹⁸⁰

De nombreuses cibles de WT1 ou de certaines de ses isoformes ont été décrites et celles-ci sont des gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires. On retrouve des gènes régulant le développement de certains organes tels que les reins et les gonades, la régulation de gènes participant au métabolisme ou au cycle cellulaire, à la prolifération, la différenciation ou encore à l'apoptose (Tableau 6).

Gènes cibles	Activation/ Répression	Isoforme(s) de WT1 impliquée(s)	Référence(s)
Rôle dans la croissance et/ou le développement			
RAR- α (retinoic acid receptor- α)	Répression	WT1 total	192
TGF- β (transforming growth factor- β)	Répression	WT1 -KTS (+/-Ex5)	193
EPO (érythropoïétine)	Activation	WT1 -KTS (+/-Ex5)	194
EGFR (early growth factor receptor)	Répression	WT1 +/-KTS (+/-Ex5)	195
IGF-II (insulin growth factor-II)	Activation/ Répression	WT1-KTS (activation) WT1+KTS (repression)	173,196,197
Rôle dans la différenciation			
CSF-1 (colony stimulating factor 1)	Répression	WT1 total	198
HOXA10 (Homeobox A10)	Répression	WT1 total	199
P21	Activation	WT1 -KTS (+/-Ex5)	200
c-Myb	Répression	WT1 total	201
Rôle dans l'apoptose			
BCL2	Activation	WT1 -KTS (+/-Ex5)	202
c-MYC	Activation	WT1 +/-KTS (+/-Ex5)	203,204
A1/BFL1	Activation	WT1 -KTS (+/-Ex5)	205
Régulation épigénétique			
DNMT3A	Activation	WT1 total	206
Autres cibles			
MDR-1 (multidrug resistance 1)	Répression	WT1 total	207
MMP9 (matrix metalloproteinase-9)	Répression	WT1 +/-KTS (+/-Ex5)	208

TABLEAU 6 - LISTES NON EXHAUSTIVES DE CERTAINES CIBLES TRANSCRIPTIONNELLES DE WT1. Ces différentes études ont été réalisées sur des lignées ou tissus sain(e)s ou cancéreux (ses) de

reins, de gonades, et hématopoïétiques. Pour chaque gène, il est précisé si WT1 a un rôle activateur ou répresseur et également si l'effet a été étudié sur la protéine totale ou si cela est induit par une ou plusieurs isoformes particulières. Inspiré de Toska *et al.*, 2014.¹⁶⁴

II. B. WT1, SON ROLE DE REGULATEUR POST-TRANSCRIPTIONNEL

En 1995, il a été mis en évidence une localisation nucléaire différentielle des isoformes de WT1 dans la lignée cellulaire mésonéphrique fœtale M15.¹⁸⁴ Les isoformes -KTS étaient colocalisées avec le facteur de transcription Sp1 et présentaient une liaison des ADN cibles avec les ZF3-4 tandis que les isoformes +KTS étaient retrouvées localisées au même niveau que l'antigène Sm détectant les protéines Sm qui sont l'un des constituants du spliceosome. De plus, ces isoformes +KTS présentaient une modification de la conformation des 2 derniers doigts de zinc augmentant la flexibilité de la structure et une diminution de la stabilité impactant les interactions entre l'ADN cible et le ZF4.^{185,209} Cette localisation des isoformes +KTS a ensuite été confirmée par une étude réalisée sur les ovocytes de *Xenopus* où les transcrits en formation, les snurposomes β et les nucléoles étaient colocalisés avec les isoformes +KTS.¹⁸¹

Ces différentes études ont amené l'idée d'un rôle post-transcriptionnel de cette protéine et plus tard, il a été mis en évidence son implication dans l'épissage des pré-ARN messagers, et son association avec des facteurs d'épissage tels que U2AF65 ou WTAP ou avec d'autres protéines.

II. B. 1. WT1 ET SA LIAISON AUX ARN MESSAGERS

Caricasole et ses collaborateurs furent les premiers à décrire la liaison spécifique d'une séquence d'ARN *Igf2* dépendant du domaine en doigt de zinc de WT1 (+/-KTS) et plus particulièrement du ZF1²¹⁰, ceci fut confirmé dans des expériences *in vivo* sur des ovocytes de *Xenopus*.¹⁸¹ Une autre étude a montré la liaison d'une séquence d'ARNm de l'actinine- α 1 (*ACTN1*) par le domaine en doigt de zinc de WT1 et une autre équipe a mis en évidence un site de reconnaissance des ARN (RRM, RNA recognition motif) se trouvant en partie N-terminale de la protéine en amont du domaine répresseur.^{211,212} WT1 se lie préférentiellement aux régions 3'UTR des ARNm afin d'augmenter leur stabilité et d'éviter leur dégradation.^{213,214}

II. B. 2. WT1 ET LES FACTEURS D'ÉPISSAGE

La protéine WT1 (isoformes +KTS) étant décrite comme associée à des composants du spliceosome, différentes études ont tenté d'approfondir les analyses et de mettre en évidence son implication dans les phénomènes d'épissage. Ces études ont montré l'association des isoformes +KTS à des facteurs d'épissage tels que les protéines U2AF65 (facteur auxiliaire U2 participant à un complexe fixant l'ARN), WTAP (WT1 associated protein) et RBM4 (RNA binding protein 4). Pour cette dernière, WT1 inhibe son activité d'épissage *in vivo*.²¹⁵⁻²¹⁸

Puisque WT1 possède un domaine d'homodimérisation, les auteurs ont proposé l'hypothèse d'une coopération entre les isoformes de WT1 (+KTS et -KTS) s'assurant de la synthèse mais également de l'épissage correct de ces ARNm.²¹⁵

II. B. 3. WT1, UN EVENTUEL ROLE DANS LA TRADUCTION

La protéine WT1 serait impliquée dans la migration du noyau vers le cytoplasme. En effet, les auteurs ont montré dans deux lignées cellulaires murines de mésothélium (AC29) ou mésonéphrique fœtale (M15), un pourcentage non négligeable (10-50%) de la protéine WT1 (isoformes +/-KTS) était retrouvé dans la portion cytoplasmique dont une majeure partie associée à des ribonucléoprotéines (RNPs) suggérant un rôle dans le métabolisme des ARN. Ils ont également montré l'association de WT1 à des polysomes suggérant ici une implication dans la traduction protéique.²¹⁹ Bor et son équipe ont montré que WT1 augmentait l'expression d'ARN non épissés contenant un signal CTE (constitutive transport element), permettait leur export nucléaire et leur association à des polyribosomes afin d'induire leur traduction.²²⁰

Ces différentes études attestent d'un rôle transcriptionnel des isoformes -KTS pouvant se lier de manière spécifique à des séquences d'ADN et d'un rôle post-transcriptionnel pour les isoformes +KTS. Cependant, les fonctions précises de ces différentes isoformes restent encore à être approfondies.

II. B. 4. WT1 ET SES PARTENAIRES

WT1 possède de nombreux partenaires tels que d'autres facteurs de transcription, des protéines régulatrices, qui vont participer à son rôle dans le développement, la croissance, la différenciation ou encore l'apoptose. Le tableau suivant énumère un certain nombre de protéines avec lesquelles cette protéine va collaborer (Tableau 6).

Facteurs de transcription	<ul style="list-style-type: none"> - STAT3 - WT1 (homodimérisation, effet dominant négatif) - Hsp70 - p53
Co-régulateurs	<ul style="list-style-type: none"> - BASP1 - Par-4

Facteurs intervenant dans la production et le métabolisme des ARN	<ul style="list-style-type: none"> - Actine - RBM4 - WTAP - U2AF65
Facteurs épigénétiques	<ul style="list-style-type: none"> - DNMT1 - DNMT3A - TET2

TABLEAU 7 - PARTENAIRES DE WT1 (LISTE NON EXHAUSTIVE). Ce tableau présente quelques protéines qui vont soit réguler l'expression de *WT1*, soit participer à son action physiologique et/ou pathologique. Inspiré de Toska et Roberts, 2014.¹⁶⁴

III. EXPRESSIONS ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE WT1

L'expression de *WT1* est, contrairement à de nombreux facteurs de transcription, restreinte à certains tissus et types cellulaires. De plus son expression varie selon des périodes de développement ou des stades de différenciation particuliers.

III. A. ROLES DANS LE DEVELOPPEMENT

L'expression du gène *WT1* est hautement régulée lors de l'embryogenèse. Son rôle de facteur de transcription va cibler de nombreux gènes impliqués dans le développement tissulaire, la croissance, ou encore la différenciation cellulaire et l'apoptose. *WT1* est retrouvé exprimé dans de nombreux tissus composés de mésothélium et dérivés du mésoderme. En effet, des expériences d'hybridation *in situ* chez la souris ont permis de détecter *WT1* dans le coelome (cavité embryonnaire), le tissu cardiaque, les intestins, le foie, les poumons et la crête urogénitale qui donnera les gonades, l'appareil urinaire mais aussi les ligaments du diaphragme et inguinaux.²²¹

III. A. 1. DEVELOPPEMENT DES REINS ET DES GONADES

Les fonctions de *WT1* dans le développement des organes uro-génitaux ont été mises en évidence à partir de l'identification des anomalies présentes chez les patients atteints du syndrome de Denys-Drash.

Au niveau rénal, *WT1* est exprimé au cours du développement embryonnaire puis restreint ensuite aux podocytes des glomérules. Kreidberg et ses collaborateurs, dans l'optique d'étudier le rôle de *WT1* dans le développement urogénital, ont établi un modèle murin déficient pour ce gène chez des souris C57BL/6J. Les souris déficientes et homozygotes (*WT1*^{-/-}), mouraient *in*

utero entre le 13^e et le 15^e jour de gestation à cause d'une apoptose cellulaire massive des cellules mésenchymateuses du métanéphros empêchant la formation du bourgeon urétéral. Les auteurs ont également observé l'absence de développement des gonades, une atrophie cardiaque et pulmonaire, ainsi qu'un diaphragme discontinu.^{222,223} Un autre rôle important de *WT1* est qu'il participe à la transition mésenchymato-épithéliale à l'origine de la formation des vésicules rénales à partir du mésenchyme métanéphrique en augmentant l'expression de *Wnt4*.²²⁴ Après la naissance, *WT1* reste exprimé dans les podocytes des glomérules rénaux murins pour maintenir l'homéostasie rénale en régulant l'expression de certains gènes tels que *Pax2* ou la néphrine.^{225,226}

Les souris déficientes pour *WT1* ont montré en plus d'un défaut de développement rénal, une altération dans la formation des gonades attestant également du rôle primordial de ce gène. A l'aide de deux souris déficientes pour les isoformes +KTS ou -KTS, il a été mis en évidence un défaut du déterminisme sexuel en absence de l'isoforme +KTS qui apparait essentiel pour maintenir un taux élevé du gène *Sry* (Sex determining Region of Y chromosome) et induire la signalisation via *Sox9* (*Sry* box-9) et le développement des gonades mâles chez la souris.^{227,228} Le rôle essentiel de *WT1* dans la survie et la maintenance des cellules germinales et de Sertoli a été prouvé par l'utilisation des ARN interférences.²²⁹ Les gonades femelles expriment aussi *WT1* durant le développement des ovaires mais aussi au cours de chaque cycle à l'âge adulte au niveau des cellules de la granulosa des follicules primordiaux, primaires et secondaires, attestant de son rôle dans la folliculogénèse.²³⁰

III. A. 2. DEVELOPPEMENT D'AUTRES TYPES DE TISSUS

WT1 est également impliqué, dans de moindres mesures, dans le développement d'autres tissus de l'organisme. Notamment, il est associé au développement de l'épicarde en régulant des gènes d'adhésion, la TEM et la migration, et la formation des coronaires irriguant le cœur.^{231,232} On le retrouve exprimé au niveau de la capsule de la rate (site de l'hématopoïèse embryonnaire)²³³, au niveau du système nerveux²³⁴ et des cellules ganglionnaires rétiniennes²³⁵ ou encore dans les cellules mésothéliales des bourgeons pulmonaires²³⁶ et du foie adulte ou en développement.^{221,237}

III. B. ROLE DANS L'HEMATOPOÏESE

Le rôle de *WT1* dans l'hématopoïèse physiologique est encore mal connu, la plupart des études s'étant intéressées à son rôle dans les désordres hématopoïétiques. De plus, les différentes études existantes présentent des résultats plus ou moins discordants qui peuvent s'expliquer

notamment par la variété de modèles étudiés et la prise en compte ou non des différentes isoformes de WT1.

Cependant, lors de l'embryogenèse, les sites assurant l'hématopoïèse tels que la rate, le thymus et le foie fœtal expriment *Wt1*, suggérant un rôle de ce gène dans l'hématopoïèse.^{234,238} De plus, la sous-population CD34⁺ de la moelle osseuse (humaine et murine) ainsi que le sang fœtal de cordon présente une expression élevée de *Wt1* renforçant l'idée d'une éventuelle implication de ce gène.^{239,240} Une étude de l'expression de *Wt1* au cours de la différenciation hématopoïétique murine a été réalisée et a montré que celle-ci était spécifique à des sous-types cellulaires. En effet, les cellules souches hématopoïétiques n'expriment pas *Wt1*, et une très faible quantité (moins de 1%) des cellules progénitrices multipotentes l'expriment. Les mêmes auteurs ont montré que l'expression la plus forte était retrouvée dans les progéniteurs myéloïdes communs (CMP), les progéniteurs granulocytes-monocytes (GMP) et les progéniteurs érythroïdes-mégacaryocytes (MEP) à raison d'environ 4%, 1% et 17% respectivement. Puis, ils ont observé une diminution de l'expression au cours de la différenciation des précurseurs et une très faible expression dans certains sous-types de cellules matures (Figure 13).²⁴¹

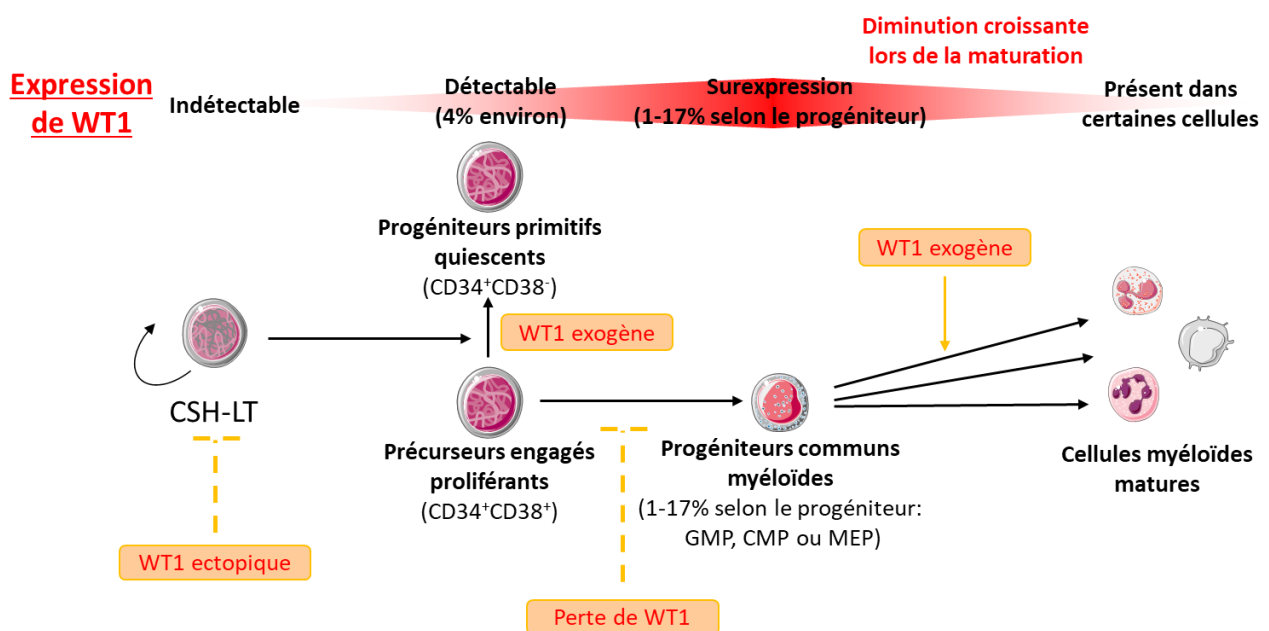


FIGURE 13 - EXPRESSION DE *WT1* AU COURS DE L'HEMATOPOÏÈSE. *WT1* est retrouvé exprimé dans une faible proportion de cellules CD34⁺ CD38⁻ (quiescentes ou proliférantes), puis cette expression augmente dans les progéniteurs communs myéloïdes pour diminuer ensuite lors de la maturation des précurseurs. Inspiré de Huff *et al.*, 2011.^{241,242}

En accord avec ces données, Menssen et ses collaborateurs ont montré que des progéniteurs isolés du sang fœtal de cordon exprimant fortement *WT1* et remis en culture avec des facteurs

de croissance voyaient leur expression diminuer jusqu'à disparaître au cours de la différenciation.²⁴⁰ Ceci a été confirmé par des études sur les lignées leucémiques K562 et HL60, où *WT1* était sous-exprimé lors de l'induction de la différenciation érythrocytaire/mégacaryocytaire ou monocyttaire/granulocytaire, respectivement.^{243,244} De manière contradictoire, l'isoforme A de *WT1* (-Ex5/-KTS) a été décrite comme induisant la différenciation granulocytaire d'une lignée de progéniteur myéloïde.²⁴⁵ Une étude distinguant le rôle de la partie N-terminale et C-terminale de la protéine *WT1* a montré que la première était suffisante pour inhiber la croissance des cellules myéloïdes et induire la différenciation tandis que la seconde partie correspondant au domaine en doigt de zinc était requise pour réduire la prolifération érythrocytaire et inhiber leur différenciation. Cela implique que l'altération de la prolifération myéloïde ne passe pas par le domaine en doigt de zinc mais plutôt par l'interaction avec d'autres facteurs en partie N-terminale.²⁴⁶

Des modèles de surexpression de *WT1* ont montré une augmentation de la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques associée à un blocage de la différenciation dépendant de la signalisation G-CSF (Granulocyte- Colony Stimulating Factor)^{247,248} A l'inverse, une autre étude a montré que la transduction de *WT1* dans des progéniteurs CD34⁺ isolés de cordon, entraînait une inhibition de la prolifération de ces cellules (formation de colonies érythrocytaires et myéloïdes).²⁴⁹ Ellissen propose que les fonctions de *WT1* varient en fonction du stade de maturation de la cellule hématopoïétique. En effet, la différenciation serait induite dans les précurseurs déjà engagés dans une lignée précise tandis qu'une quiescence des cellules primitives serait modulée par les isoformes +KTS de *WT1*.²⁵⁰

Une étude de King-Underwood n'a pas retrouvé d'expression de *Wt1* dans la moelle osseuse adulte, le foie fœtal ou la région AGM chez la souris. De plus, le transfert adoptif de cellules provenant du foie fœtal permet de reconstituer une souris préalablement irradiée. Cela implique que *Wt1* doit avoir un rôle mineur dans l'induction de l'hématopoïèse murine et doit certainement participer à la régulation de l'expression de gènes des voies de signalisation hématopoïétique.^{251,252}

Quelques études se sont focalisées sur les gènes impliqués dans l'hématopoïèse et pouvant être régulés par *WT1*. Parmi ces gènes, on retrouve le récepteur à l'érythropoïétine (EpoR) dont *WT1* active la transcription ou le gène IRF8 (Interferon regulatory factor 8) dont sa transcription serait inhibée, tous deux par liaison de *WT1* aux promoteurs de ces gènes.^{253,254}

Cependant, le rôle de WT1 dans l'hématopoïèse physiologique reste encore peu connu ainsi que son implication dans les leucémies.

IV. WT1 ET LES LEUCEMIES

Dans le cadre des cancers, il existe différents exemples attestant de son rôle de gène suppresseur de tumeur comme dans les cancers rénaux de l'enfant. A l'inverse, d'autres observations orientent sur des propriétés oncogéniques notamment la présence quasi systématique d'une surexpression du gène au diagnostic des LAM. Cette surexpression n'est pas véritablement expliquée puisque cela n'est pas seulement dépendant de l'immaturité des cellules leucémiques. En effet, le niveau d'expression de *WT1* au diagnostic est nettement supérieur à celui des progéniteurs hématopoïétiques sains chez les patients leucémiques. De plus, une autre différence significative est que les CSL des patients leucémiques (CD34⁻) surexpriment *WT1* contrairement aux CSH de donneurs sains.^{131,255,256}

IV. A. *WT1*, UN GENE SUPPESSEUR DE TUMEUR

IV. A. 1. MUTATIONS DU GENE *WT1* DANS LES LEUCEMIES

La première évidence supportant le rôle suppresseur de tumeur de *WT1* est la présence de mutations chez 5 à 15% des échantillons de moelle osseuse de patients atteints de LAM *de novo*.^{257,258} Ces mutations touchent principalement les exons 7 à 9, et sont des insertions ou des délétions entraînant un décalage du cadre de lecture mais peuvent plus rarement se retrouver dans la partie N-terminale (Figure 14). Cela conduit à la formation de protéines tronquées entraînant une diminution des capacités de liaison à l'ADN voire à une perte totale des fonctions de *WT1*. Une étude *in vitro* a montré une augmentation de la prolifération et l'induction de gènes impliqués dans la division cellulaire et la différenciation érythrocytaire dans des cellules CD34⁺ exprimant une protéine *WT1* tronquée ayant perdu son domaine de liaison à l'ADN.²⁵⁹

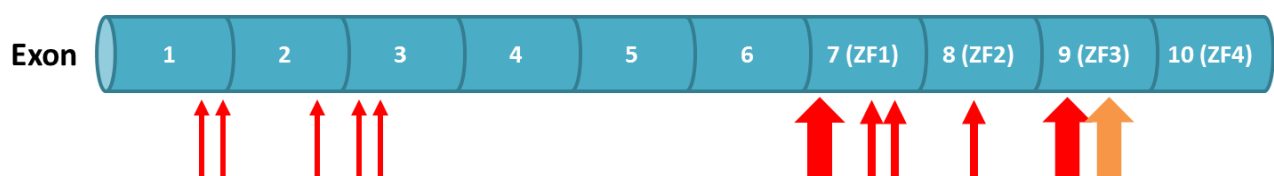


FIGURE 14 - PRINCIPAUX SITES DE MUTATION DE *WT1* RETROUVEES DANS LES LAM. Le schéma présente les 10 exons du gène *WT1* et les sites de mutation indiqués par des flèches rouge pour les mutations de type délétion ou insertion et décalage du cadre de lecture, et en orange les mutations faux-sens. Les principales mutations se trouvant dans les exons 7 et 9, avec la présence de mutations faux-sens décrites dans ce dernier. La largeur des flèches est dépendante du nombre de mutations décrites. Inspiré de Huff *et al.*, 2011. ²⁴²

A l'heure actuelle, la présence de ces mutations n'a pas été corrélée avec l'induction de la leucémie et les conséquences sur les fonctions cellulaires n'ont pas encore été décrites. Ces mutations sont plus souvent retrouvées chez les patients jeunes avec une cytogénétique normale ou présentant des mutations des gènes *FLT3*, *CEBPA* ou *PML-RAR α* .^{260,261} L'impact clinique de ces mutations sur la survie des patients n'est pas précisément connu. En effet, les études donnent des résultats conflictuels puisque certaines attestent d'une survie globale et d'une survie sans rechute plus défavorable lorsque *WT1* est muté^{258,262} tandis que d'autres n'ont pas démontré de corrélation entre la survie et le statut mutationnel de *WT1* chez ces patients.²⁶⁰ Une étude a mis en évidence un risque de résistance à la chimiothérapie augmentée chez les patients possédant des mutations de *WT1*.²⁶³

IV. A. 2. AUTRES PROPRIETES DE SUPPRESSEUR DE TUMEURS

Hormis la présence de ces mutations, des études sont en faveur de son rôle de suppresseur de tumeur. Notamment l'étude de Smith et ses collaborateurs a mis en évidence, dans un modèle murin, son rôle dans la différenciation monocyttaire de l'isoforme +KTS accompagné d'une régression du développement tumoral sur une lignée de LA myéloblastique.^{264,265} De plus, l'isoforme -KTS a montré un effet antiprolifératif dans ce modèle caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et l'induction de l'apoptose.²⁶⁶

Une autre étude a mis en évidence l'interaction fonctionnelle directe des protéines WT1 et TET2. Ainsi, TET2 est recruté par la protéine WT1 au niveau de sites spécifiques du génome pour réguler l'expression de gènes cibles spécifiques de celui-ci. De plus, les auteurs ont montré qu'il s'agissait d'une liaison fonctionnelle puisque ce recrutement est associé à une augmentation des 5hmc et d'une diminution concomitante des 5mc. Cette interaction entraîne notamment une inhibition de la prolifération des cellules leucémiques. Ceci est en corrélation avec les mutations récurrentes et exclusives de ces deux gènes dans les LAM. Ces mutations convergent vers les mêmes effets que ceux provoqués par les mutations des gènes *IDH1* ou *IDH2* (Figure 15).²⁶⁷

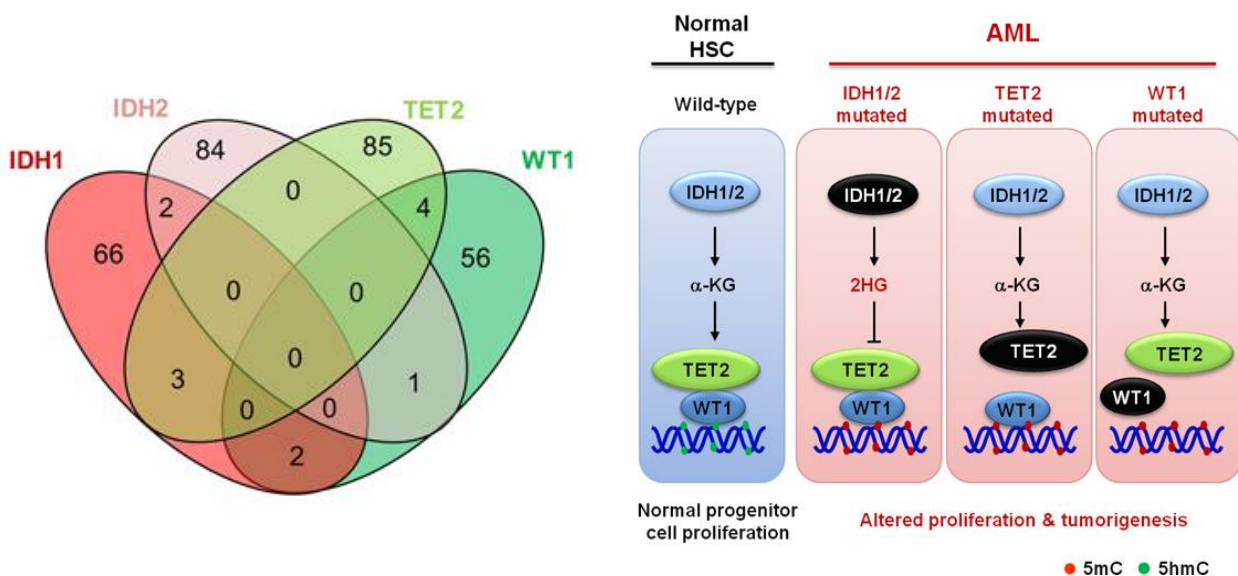


FIGURE 15 - MUTATIONS EXCLUSIVES DES GENES WT1, TET2, IDH1 ET IDH2 AINSI QUE LA SIGNALISATION MISE EN JEU. Les auteurs ont analysé le résultat de séquençage de ces gènes sur 1056 patients atteints de LAM (6 études différentes) et dont 303 patients présentaient au moins un des gènes mutés. Ils ont ainsi montré le caractère mutuellement exclusif de survenue de ces mutations. Les auteurs ont proposé une voie physiologique d'action de ces gènes pouvant être impactée lors de mutation de l'un de ces gènes dans le cadre des LAM. Tiré de Wang *et al.*, 2015.²⁶⁷

Un autre mécanisme pouvant être touché lors de la leucémie et confirmant un rôle suppresseur de tumeur à WT1 est la signalisation WT1-MEG3 (Maternally expressed gene 3). Les auteurs montrent que cet ARN non codant inhibe la croissance tumorale en activant la voie p53. De plus, WT1 et son co-facteur TET2 viennent activer la transcription du gène *MEG3* favorisant ainsi son effet antiprolifératif.²⁶⁸

Cependant, de nombreuses études attestent également d'un rôle oncogénique de WT1 dans les leucémies.

IV. B. WT1, SON ROLE D'ONCOGENE

IV. B. 1. SUREXPRESSON DU GENE DANS LES HEMOPATHIES

Le principal indicateur d'un rôle oncogénique de *WT1* est sa surexpression dans de nombreux cancers incluant les leucémies aiguës. Dans le cadre des LAM, plusieurs études ont montré la surexpression de ce gène dans la moelle osseuse et le sang des patients au diagnostic laissant supposer un rôle favorisant le développement de ces hémopathies. Cette surexpression est aussi observée dans les échantillons sanguins et médullaires des patients atteints de syndromes myélodysplasiques avec une augmentation de l'expression du gène observée lors de la progression vers une LAM.²⁶⁹ De plus, un haut niveau d'expression du gène *WT1* au diagnostic est associé à un plus mauvais pronostic et une survie à long terme plus courte.²⁷⁰ Cette

surexpression semble être indépendante de l'âge, du type de LAM ou des antécédents de MDS chez les patients.²⁷⁰

IV. B. 2. ACTEUR A FONCTIONS ONCOGENIQUES

Un modèle murin a montré une coopération entre la protéine chimérique AML1-ETO et la surexpression de WT1 dans la moelle osseuse de ces souris. Ces souris exprimant ce gène de fusion développent rapidement un syndrome de type myélodysplasique. Les auteurs montrent qu'avec la surexpression de WT1 (isoforme D), les souris développent une LAM de type myéloblastique, avec une expansion des progéniteurs myéloïdes et un blocage de leur différenciation.²⁷¹

Des études *in vitro*, sur des lignées cellulaires leucémiques humaines (K562, HL60, U937, ...) ou des échantillons de moelle osseuse de patients au diagnostic, ont également montré un rôle oncogénique de WT1 via l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens ou par l'utilisation d'ARN interférent. Ces études ont montré que l'inhibition de *WT1* par ces techniques induisait une diminution de la prolifération cellulaire. De plus, l'un des auteurs a montré une diminution de la viabilité avec une augmentation du nombre de cellules apoptotiques.²⁷²⁻²⁷⁵

Plusieurs études se sont intéressées à son rôle dans la régulation de l'apoptose, cependant les résultats sont conflictuels. En effet, nous avons vu précédemment que WT1 peut induire l'apoptose dans certains cas. D'autres études ont, quant à elles, révélé un rôle anti-apoptotique de ce gène intervenant donc dans la leucémogénèse. Par exemple, Ito et ses collaborateurs ont montré que les isoformes +exon5 inhibaient les gènes impliqués dans l'apoptose tels que *Bax*, *Bak* ou les caspases 3 et 9 dans des lignées leucémiques (K562, HL-60 et Kasumi-1).²⁷⁶ Un autre mécanisme pouvant être mis en jeu est l'activation de la transcription du gène *A1/BFL1* par l'isoforme WT1^{-/-} entraînant une différenciation des cellules myéloïdes (lignée cellulaire 32D) et une résistance à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques.²⁰⁵

D'autres études sur les lignées leucémiques myéloïdes (HL-60 et U937) montrent que WT1 empêche la différenciation de ces cellules en présence d'agents différenciants, ce qui est concordant avec un rôle oncogénique.^{277,278}

V. MARQUEUR DE LA MALADIE RESIDUELLE MESURABLE LEUCEMIQUE

Lors du diagnostic d'une LAM, 70 à 90% des patients vont présenter une forte expression de *WT1* que ce soit au niveau médullaire ou sanguin, avec une expression en général plus élevée dans la moelle osseuse.^{131,270,279} De plus, le transcrit est très faiblement exprimé à l'état basal

dans ces deux compartiments faisant de lui une cible intéressante pour le suivi de la maladie résiduelle afin d'évaluer l'efficacité du traitement et prévenir une éventuelle rechute (Figure 16).²⁸⁰

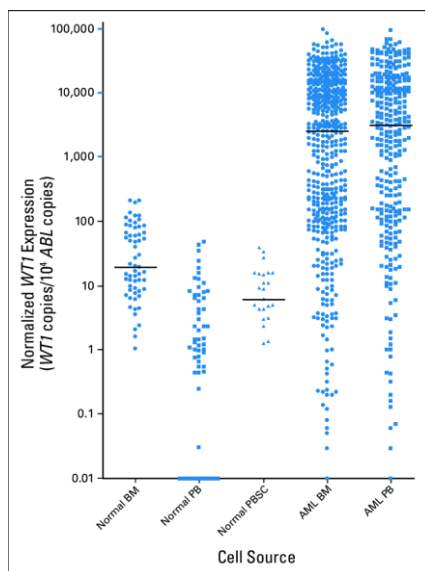


FIGURE 16 - EXPRESSION DE *WT1* AU DIAGNOSTIC CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE LAM. Expression de *WT1* de donneurs sains avec une moyenne de 19 copies dans la moelle osseuse et de 0,01 copies *WT1*/10⁴ copies d'*ABL1* dans le sang. Tandis que l'expression de *WT1* au diagnostic de patients atteints de LAM est en moyenne de 2505 copies pour la moelle osseuse et 3107 copies *WT1*/10⁴ copies d'*ABL1* dans le sang. Tiré de Cilloni *et al.*, 2009.¹³¹

La première équipe qui proposa ce gène comme marqueur de la MRD fut celle d'Inoue en 1994, où ils analysèrent l'expression par RT-PCR de *WT1* dans une grande cohorte de patients atteints d'hémopathies malignes (LAM, LAL, CML et lymphomes non-hodgkiniens). Ils comparèrent l'expression sanguine et médullaire au diagnostic des LAM à celle de la lignée leucémique humaine K562 et montrèrent qu'elles étaient similaires. De plus, ils observèrent une augmentation de l'expression du gène dans le cas d'une progression d'un syndrome myélodysplasique vers une LAM. A cela, ils montrèrent une corrélation entre le niveau d'expression du gène au diagnostic et le pronostic des LAM. En effet, les patients exprimant plus faiblement le gène *WT1* présentent une meilleure chance d'atteindre la rémission complète et une survie globale supérieure tandis que les patients avec un niveau élevé (supérieur à celui des K562) n'atteignent pas la rémission complète.²⁸¹ Cependant, la valeur pronostique de l'expression médullaire ou sanguine de *WT1* au diagnostic ne semble pas être confirmée par les études récentes utilisant des techniques plus sensibles et spécifiques de détection.^{131,282}

Des études ont confirmé la légitimité d'utiliser le gène *WT1* comme marqueur de la MRD en suivant l'expression de ce gène en parallèle de la détection d'un transcrit de fusion tels que

PML-RAR α , *CBF β -MYH11* ou *AML1-ETO*.^{279,283} Il fut mis en évidence que l'expression dans la moelle osseuse et le sang de *WT1* chute rapidement lors du traitement d'induction comparé aux gènes de fusion et, de manière similaire augmente rapidement et plus précocement à la rechute, faisant de lui un bon marqueur de la MRD et des rechutes.²⁸⁰ De même, une excellente concordance a été obtenue lors d'une étude comparant le suivi de la maladie résiduelle *via* l'expression médullaire de *WT1* par RT-qPCR et la détection des LAIP par cytométrie en flux.²⁸³

Alonso-Dominguez a montré une corrélation entre l'expression de *WT1* et le nombre de cellules leucémiques infiltrant la moelle osseuse des patients après analyse par cytométrie en flux. Cependant, les auteurs suggèrent que la mesure de la maladie résiduelle par l'expression de *WT1* après le traitement d'induction peut être biaisé par l'expression de ce gène dans les cellules saines reconstituant la moelle osseuse du patient et préconise d'utiliser un autre marqueur moléculaire quand cela est possible au moins à ce temps précis du traitement.²⁸⁴

V. A. UNE METHODE STANDARDISEE EUROPEENNE DE DETECTION DE WT1

A l'heure actuelle, *WT1* est utilisé comme marqueur de la MRD et est détecté par des techniques de RT-qPCR en routine pour les patients ne possédant pas d'autres marqueurs moléculaires plus spécifiques (transcrits de fusion ou mutations de *NPM1*). Jusqu'alors, les différentes études avaient des méthodes de quantification et de normalisation qui leur étaient propres, tels que des normalisations en fonction d'un gène de référence (*ABL*, Abelson) ou d'une lignée leucémique humaine surexprimant *WT1* (K562). Chaque étude déterminait donc un seuil de positivité ou de négativité. De plus, les amorces n'étaient pas les mêmes, notamment les études les plus anciennes utilisaient des amorces se trouvant au niveau des exons 6-7, principaux sites mutationnels de ce gène pouvant entraîner des faux-négatifs. Toutes ces variables ont eu pour conséquence de modifier la spécificité et la sensibilité de détection de l'expression de *WT1* entraînant des discordances entre les études quant au rôle pronostic de ce gène. C'est pourquoi en 2009, un consortium de 11 laboratoires européens a travaillé sur l'uniformisation de la détection et de la normalisation de l'expression de *WT1*, réalisé auparavant pour les gènes de fusion.^{131,285} L'optimisation de la détection de l'expression du gène par RT-qPCR se fait à l'aide d'amorces se situant dans l'exon 1-2 évitant ainsi l'absence de détection chez des patients pouvant présenter une mutation du gène. La normalisation de l'expression médullaire et sanguine se fait maintenant selon un nombre de copies du gène *WT1* pour 10⁴ copies du gène *ABL1*.

V. B. WT1, UNE VALEUR PRONOSTIQUE ET PREDICTIVE DES RECHUTES

La plupart des études considèrent qu'une augmentation de l'expression de *WT1* dans le sang ou la moelle osseuse des patients lors du traitement ou au cours du suivi de la MRD est associée à un pronostic moins favorable et une survie globale plus courte, et cela pour les LAM pédiatriques ou de l'adulte.²⁸⁶⁻²⁸⁹

Dans ce sens, des auteurs ont montré qu'une diminution de l'expression équivalente à 2 logarithmes après la chimiothérapie d'induction était de meilleur pronostic pour les patients puisqu'ils présentaient un risque de rechute plus faible (Figure 17).¹³¹ L'intérêt de cette détection rapidement après la chimiothérapie d'induction est de pouvoir adapter le traitement de consolidation en fonction de la MRD.

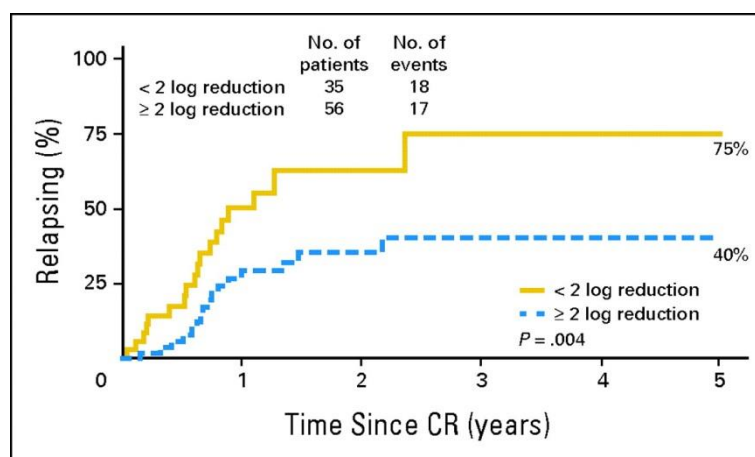


FIGURE 17 – LE RISQUE DE RECHUTE SEMBLE DEPENDANT DU TAUX DE DIMINUTION DE L'EXPRESSION DU GENE WT1 APRES TRAITEMENT D'INDUCTION. Les patients présentant une diminution supérieure ou égale à 2 logarithmes par rapport à l'expression de *WT1* au diagnostic ont un risque de rechute inférieur aux patients dont la diminution est inférieure à ce seuil. Tiré de Cilloni *et al.*, 2009.¹³¹

Une large étude rétrospective sur les échantillons médullaires de 584 cas de LAM a été réalisée afin de quantifier l'expression du gène *WT1* au diagnostic, en post-induction et en post-intensification. Au diagnostic, les auteurs suggèrent qu'une expression supérieure à 5000 copies *WT1*/10⁴ copies d'*ABL1* est de mauvais pronostic pour le patient surtout si elle est associée à une leucocytose. Après le traitement d'induction, les auteurs montrent que le groupe de patients exprimant plus de 170 copies de *WT1* correspond soit à des patients en échec thérapeutique, soit avec un risque de rechute élevé. Enfin, en post-intensification, les patients présentant une expression de *WT1* inférieure à 10 sont ceux pour lequel le traitement a été efficace et dont le pronostic est favorable.²⁸⁸

V. C. DETECTION DE WT1 POST-ALLOGREFFE DE CSH

En 2003, une étude s'est focalisée sur l'utilité de détecter l'expression de *WT1* après la réalisation d'allogreffes de CSH chez des patients atteints de LA, ceci en vue de prédire des rechutes. Depuis, plusieurs études ont porté sur le suivi de la MRD chez ces patients et l'expression de *WT1* paraît être un bon indicateur de la MRD. Notamment, l'une des études montrent que la détection de *WT1* dans la moelle osseuse et le sang de ces patients leucémiques par RT-qPCR permet de prédire la rechute avant les techniques de cytométrie en flux ou de chimérisme qui détectent la réapparition des cellules leucémiques plus tardivement. De plus, il semble que la détection de la MRD *via* l'expression de *WT1* soit plus sensible et spécifique que ces deux autres techniques.²⁹⁰⁻²⁹⁴

VI. WT1, UN ANTIGENE LEUCEMIQUE ET CIBLE DE L'IMMUNOTHERAPIE

VI. A. WT1, UN ANTIGENE IMMUNOGENE DANS LES LAM

La surexpression de *WT1* dans les LAM mais aussi dans de nombreux cancers a laissé penser aux chercheurs qu'il pouvait être un antigène associé à ces cancers. En effet, les cellules cancéreuses présentent à leur surface une grande variété d'antigènes issus de la dégradation de protéines de fusion (AML1-ETO), mutées (FLT3-ITD), ou surexprimées (*WT1*).²⁹⁵ Une étude du National Cancer Institute a réalisé un classement des antigènes tumoraux en fonction de différents critères tels que leur immunogénicité, leurs fonctions thérapeutiques ou leur expression afin d'évaluer les meilleurs antigènes pouvant être la cible d'immunothérapie vaccinale et *WT1* se trouve au premier rang du classement.²⁹⁶

Une étude de Gaiger et ses collaborateurs a étudié la réponse immunitaire vis-à-vis de l'antigène *WT1* chez la souris et chez l'Homme. Ils ont réalisé l'immunisation de souris avec un vaccin contenant 3 peptides en partie N-terminale de la protéine *WT1*. Les souris immunisées étaient capables de développer une réponse cytotoxique spécifique contre ces 3 peptides et de lyser des lignées cellulaires leucémiques exprimant l'antigène *WT1* sans affecter l'hématopoïèse normale. De plus, ces souris immunisées produisent également des anticorps anti-*WT1* comme retrouvé dans le sérum de certains patients atteints de LAM.^{297,298}

Par la suite, plusieurs études se sont intéressées à la réponse immunitaire développée vis-à-vis de *WT1* chez les patients atteints de LAM. Notamment, la présence de lymphocytes T CD8⁺ capables de reconnaître quatre épitopes de *WT1* (restreints à la molécule HLA-A*0201, HLA de

classe I fréquent dans la population caucasienne) a été détectée chez certains patients atteints de LAM (Figure 18).^{299,300}

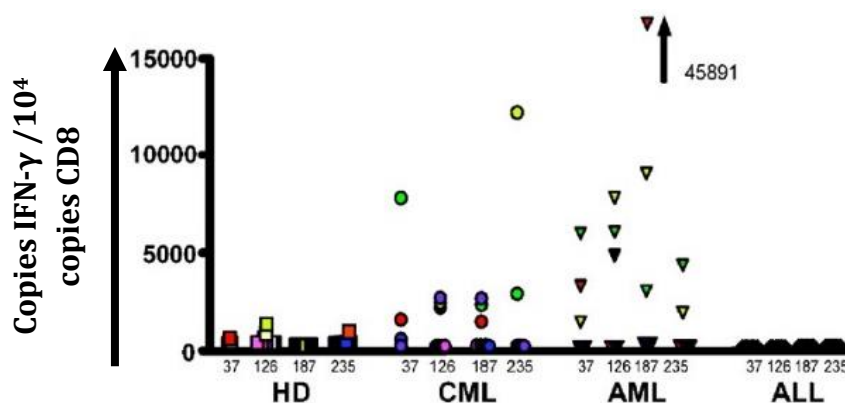


FIGURE 18 - REPONSE CYTOTOXIQUE VIS A VIS DE QUATRE EPITOPES DE WT1 CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS D'HEMOPATHIES MALIGNES DONT LES LAM. La réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ issus de patients atteints d'hémopathies malignes (CML : leucémie myéloïde chronique, AML : leucémie aiguë myéloïde et ALL : leucémie aiguë lymphoïde) et de donneurs sains (HD) a été évaluée *via* l'expression d'IFN-γ par RT-qPCR après stimulation avec quatre peptides : WT37 (VLDFAPPGA), WT126 (RMFPNAPYL), WT187 (SGLEQQYSV) et WT235 (CMTWNQMNL). Chaque point correspond à la réponse retrouvée chez un patient. Tiré de Rezvani *et al.*, 2005.³⁰⁰

Une étude s'est intéressée à cette réponse lymphocytaire T après traitement par chimiothérapie ou greffe de CSH et a montré que les patients avec une survie globale prolongée présentaient une fréquence plus importante de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques de WT1 en comparaison des patients ayant rechuté. Cela suggère que cette réponse cytotoxique anti-WT1 pourrait participer au maintien de la rémission complète chez les patients leucémiques faisant de cette protéine une cible thérapeutique intéressante.³⁰¹

Dans ce sens, une étude de vaccination a été menée chez des souris C57BL/6J par injection par voie intramusculaire d'un plasmide codant pour la protéine WT1. Ces souris ont développé des CTL spécifiques de cet antigène et étant capables de protéger les souris du développement d'une LAM exprimant WT1.³⁰²

VI. B. VACCINATION ANTI-WT1

Les études précédentes ont révélé le potentiel de la vaccination anti-WT1 dans le cadre des LAM. C'est pourquoi de nombreux groupes ont travaillé sur cette vaccination, en évaluant ses effets sur l'évolution de la maladie et également sur les modifications pouvant améliorer l'immunogénicité des peptides.

Notamment, l'équipe de Tsuboi et ses collaborateurs a montré que le changement d'un acide aminé en position 2 du peptide CMTWNQMNL augmente sa liaison au HLA-A*2402 et amplifie la réponse lymphocytaire cytotoxique par rapport au peptide naturel.³⁰³

Une équipe a évalué les effets d'une vaccination combinant 4 peptides de WT1, induisant plutôt une réponse lymphocytaire de type CD8⁺ (HLA-A*2402) ou de type CD4⁺ (HLA-DR.B1) ou les deux. Ceci a été réalisé chez des patients en rémission complète d'une LAM mais présentant une MRD positive pour le marqueur moléculaire *WT1*. Ces patients ont reçu 6 vaccinations durant 2 semaines en association d'adjuvants. Une réponse T de type CD4⁺ a été observée chez tous les patients sauf un qui a rechuté à l'arrêt du traitement. Une réponse T de type CD8⁺ a également été détectée (production d'IFN- γ et lyse cytotoxique) chez les patients. La survie sans rechute de ces patients a été estimée supérieure à 35 mois, donc nettement améliorée par rapport à la survie sans vaccination (10 mois en moyenne).³⁰⁴ Par la suite, cette vaccination a été administrée à un plus grand nombre de patients en rémission complète et certains ont reçu 12 vaccinations. Cette immunothérapie a induit une réponse lymphocytaire T de type CD4⁺ et CD8⁺ chez ces patients avec une survie globale depuis le diagnostic estimée à 67,6 mois.³⁰⁵

L'utilisation de cellules dendritiques (DC) pour produire des CTL spécifiques de l'antigène WT1 a été développée. En effet, une étude clinique de phase I/II réalisée sur des patients en rémission partielle ou complète d'une LAM après traitement par chimiothérapie a évalué les effets de l'administration de DC autologues transfectées avec un ARNm de *WT1* (DC WT1⁺). Les patients en rémission partielle ont atteint la rémission complète après l'administration des DC WT1⁺. Pour l'ensemble des patients, l'induction d'une rémission moléculaire a été observée par le suivi des marqueurs leucémiques aberrants. De plus, une augmentation des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de WT1 et produisant de l'IFN- γ ainsi que des cellules NK a été détectée après la vaccination. Cette approche thérapeutique post-rémission semble avoir une action préventive des rechutes en facilitant la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et leur activation.³⁰⁶

Ces différents résultats présentent des effets immunitaires bénéfiques et une survie nettement améliorée, plus de 5 ans pour certains patients. Cependant, il reste encore à tester sur des plus grandes cohortes de patients l'efficacité de cette immunothérapie.

Chapitre 3 : Objectifs du projet de recherche

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la persistance des cellules leucémiques chez les patients. La première cause peut être une résistance au traitement d'induction et de consolidation. Nous savons aujourd'hui que les patients présentent une hétérogénéité clonale dès le diagnostic. Il est donc possible que certains de ces sous-clones leucémiques présentent des anomalies génétiques intrinsèques leur conférant une résistance ou un phénotype quiescent les rendant moins sensibles à la chimiothérapie. Notamment, la mutation *FLT3-ITD* induit une résistance à la cytarabine ou l'expression de *MDR1* (Multi Drug Resistance 1) entraîne un efflux de différents traitements.^{307,308} De plus, les analyses de LAM par séquençage ont montré l'existence de cellules pré-leucémiques qui persistaient régulièrement après traitement chez ces patients signifiant que ces cellules possèdent des capacités de chimiorésistance et peuvent participer à cette MRD. La seconde explication de cette persistance pourrait être liée à l'existence de cellules souches leucémiques naturellement quiescentes au sein de la niche hématopoïétique leur conférant une résistance aux traitements cytotoxiques actifs sur les cellules en prolifération. Ceci a été mis en évidence dans un modèle de xénogreffes dans des souris NOD/SCID où les CSL migraient vers la niche et étaient protégées de l'apoptose induite par la chimiothérapie via leur quiescence.³⁰⁹ Enfin, une troisième cause pouvant être évoquée serait l'implication du système immunitaire. Il a été montré que celui-ci participe au contrôle de la croissance tumorale, c'est le concept de l'immuno-édition se déroulant en trois grandes étapes : l'élimination, la phase d'équilibre et l'échappement. Lors de la phase d'élimination, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques vont éliminer les cellules leucémiques, cependant certaines cellules peuvent échapper à cette lyse tumorale. Une étude a notamment montré que certaines cellules étaient résistantes à la mort induite par les granules de granzyme B produites par les cellules T cytotoxiques.³¹⁰ D'autre part, une étude a mis en évidence le maintien d'un état dormant des cellules cancéreuses par les lymphocytes T CD8⁺ dans des sites particuliers (moelle osseuse et ganglions lymphatiques).³¹¹ Dans un modèle murin de lymphome, il a été démontré que la production d'IFN- γ par les lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) permettaient l'induction et la maintenance d'une quiescence des cellules cancéreuses.³¹² Dans ce sens, une autre étude réalisée dans un modèle de sarcome pancréatique a mis en évidence un arrêt de la prolifération tumorale sous l'action simultanée de l'IFN- γ et du TNF- α (tumor necrosis factor α).³¹³ Enfin, le rôle des lymphocytes T (de type CD4⁺ et CD8⁺) dans le contrôle de la croissance des cellules de sarcome moins immunogènes via la production d'IFN- γ a été mis en évidence.³¹⁴

De nombreux modèles murins ont été développés afin de décrypter les mécanismes de la leucémogénèse, ils ont notamment permis de comprendre la hiérarchie existant au sein des

cellules leucémiques en injectant des cellules de patients à des souris SCID (severe combined immunodeficient) et ont montré que seule une faible proportion de ces cellules sont capables de proliférer chez ces souris.⁷⁷ De manière similaire, en utilisant le système Cre-lox, un modèle murin de translocation *MLL-ENL* a été mis en place et a montré que cette translocation induisait un phénotype leucémique chez ces souris.³¹⁵ D'autres modèles de souris « Knock-out » et de « Knock-in » ont mis en évidence l'implication des voies RAS et des mutations génétiques tels que *NPM1* et *FLT3* dans le processus leucémique.^{316,317} Ces modèles ont aussi servi à évaluer la réponse thérapeutique telle que l'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle pour les patients atteints de LAM et présentant la mutation du gène *FLT3-ITD*.³¹⁸

Ces modèles murins permettent donc l'étude du développement et de la persistance leucémique sur le plan cellulaire, phénotypique et moléculaire. Cependant, ils ne peuvent répondre aux questions expliquant la persistance sur le plan immunitaire telles que : « La réponse lymphocytaire participe-t-elle à la persistance leucémique ? Quels sont les mécanismes mis en jeu par le système immunitaire dans la maintenance de cette MRD et également ceux responsables des rechutes leucémiques ? »

Afin de pouvoir étudier certains mécanismes immunitaires mis en jeu lors de cette persistance leucémique, mon projet de thèse a porté sur le développement d'un modèle murin syngénique et immun de LAM et de MRD se rapprochant au mieux de la pathologie humaine. L'objectif final étant de pouvoir étudier l'implication de la réponse immunitaire dans le contexte de MRD mais aussi éventuellement de pouvoir évaluer l'efficacité de certains traitements (notamment les immunothérapies) à éliminer les cellules résiduelles. C'est pourquoi, nous avons décidé de développer un modèle murin syngénique surexprimant ou non le gène *Wt1*, marqueur de la MRD chez les patients mais aussi considéré comme un antigène associé aux LAM. De plus, la protéine WT1 murine présente 96% d'homologies de séquence avec la protéine humaine.³¹⁹

Pour réaliser ce projet, des souris immunocompétentes C57BL/6J ont été injectées par voie intraveineuse avec des sous-clones leucémiques isolés à partir de la lignée leucémique C1498 et surexprimant ou non le gène *Wt1*. Puis dans un second temps, ces souris ont été traitées par une chimiothérapie conventionnelle, la cytarabine, par voie intrapéritonéale en vue d'éliminer une majorité des cellules leucémiques et d'obtenir la persistance d'une faible quantité de cellules leucémiques (Figure 19).

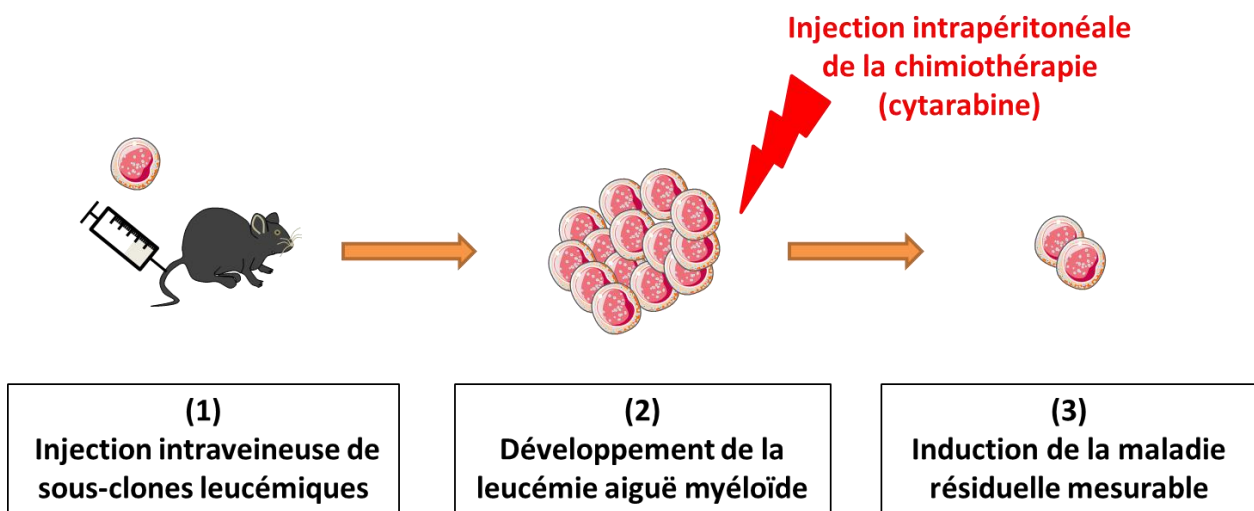


FIGURE 19 - ETAPES CLES DANS LE DEVELOPPEMENT DE CE MODELE DE LAM ET DE MRD. Les souris immunocompétentes C57BL/6J sont injectées par voie intraveineuse avec des sous-clones syngéniques isolées à partir de la lignée leucémique C1498. Ces souris développant la leucémie vont recevoir la cytarabine par voie intrapéritonéale afin d'induire une élimination de la plupart des cellules leucémiques en vue d'obtenir le modèle murin de MRD.

Les objectifs de ce projet de thèse étaient :

- 1) En premier lieu de caractériser la lignée leucémique murine C1498 ainsi que la leucémie induite *in vivo* chez les souris suite à son injection ;
- 2) Dans un second temps, de caractériser phénotypiquement et génotypiquement les sous-clones isolés à partir de la lignée leucémique et de leur faire surexprimer de manière stable WT1 ;
- 3) Enfin, de développer le modèle murin syngénique de maladie résiduelle mesurable surexprimant ou non le gène *Wt1*

MATERIELS ET METHODES

I. LIGNEE CELLULAIRE ET SOUS-CLONES

La lignée cellulaire murine C1498 est issue d'une souris C57BL/6J (CD45.2⁺) ayant développée de manière spontanée une leucémie aigüe myélo-monocytaire.³²⁰ Les cellules leucémiques ont ainsi été isolées en 1941³²¹ et sont commercialisées par ATCC (TIB-49™, American Type Culture Collection, Molsheim, France).

Précédemment au sein de l'équipe, une transfection stable de la lignée C1498 a été réalisée avec le plasmide pVitro1.2.ZsGreen par électroporation et une dilution limite en milieu complétement en blasticidine a permis l'isolement de différents sous-clones exprimant de manière stable la protéine fluorescente ZsGreen (Zoanthus green fluorescent protein) afin de faciliter leur détection et leur suivi *in vivo*. Les 6 sous-clones utilisés pour ce projet ont été nommés ainsi : B11, C5, E2, E7, F1 et G10.

Cette lignée leucémique, ainsi que les sous-clones qui en sont issus ont été cultivés dans du milieu RPMI complétement avec 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de glutamine, 100U/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine, 50µM de β-mercaptoéthanol, 10mM d'HEPES, 1mM d'acides aminés non-essentiels et 1mM de pyruvate de sodium (Gibco, Thermo Fisher, Saint-Aubin, France).

La lignée EL4 (TIB-39™, ATCC) est une lignée murine isolée à partir d'un lymphome induit chez des souris C57BL/6J qui a été cultivée en milieu RPMI dont la composition était identique à celle utilisée pour la lignée et les sous-clones C1498.

L'ensemble des lignées cellulaires et des sous-clones ont été cultivés dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère humide (90% d'humidité et 5% CO₂) et maintenus à une concentration cellulaire comprise entre 0,5 et 1 million (M) de cellules/mL.

II. INJECTION DES SOURIS ET SUIVI DE LA MALADIE

Plusieurs souches de souris ont été utilisées pour cette étude. Ce sont principalement des souris femelles syngéniques de la souche C57BL/6J obtenues de l'élevage Charles River (L'Arbresle, France) à l'âge de 4 semaines qui ont été utilisées. Pour la caractérisation de la lignée leucémique C1498, il a été utilisé des souris C57BL/6J présentant un fond génétique CD45.1.

Lors de l'étude des différents sous-clones isolés à partir de la lignée leucémique C1498, il a été utilisé des souris NOD-SCID (NOD.CB17-*Prkdc^{scid}*) provenant également de l'élevage Charles River. Les souris sont élevées dans une animalerie exempte de pathogènes.

L'élevage et l'ensemble des procédures expérimentales ont été approuvées par le comité d'éthique et de protection des animaux (Numéro d'agrément 512012).

II. A. INJECTION DES CELLULES LEUCEMIQUES

Les souris ont été injectées à l'âge de 6 semaines par voie intraveineuse dans la veine de la queue ou par voie intrapéritonéale avec la lignée C1498 ou les différents sous-clones issus de cette lignée.

Pour se faire, le milieu des cellules en culture était renouvelé le jour précédant l'injection. Le jour de l'injection, les cellules en culture étaient au préalable lavées, comptées sur cellule de Thoma et reprises dans du PBS (phosphate buffer saline 1X) à la concentration adaptée pour réaliser l'injection d'un volume de 100 μ L. Le nombre de cellules injectées a varié lors de la mise en place de ce modèle entre 10^4 et 5×10^6 cellules par souris.

II. B. TRAITEMENT PAR CHIMIOThERAPIE

La chimiothérapie qui a été utilisée pour le développement de ce modèle de maladie résiduelle est la cytarabine (AraC) (Abcam, Paris, France). Cette chimiothérapie fut administrée aux souris par voie intrapéritonéale à la dose de 100 ou 200mg/kg/souris et ceci durant 3 à 5 jours successifs ou 4 injections successives par semaine durant 2 semaines (correspondant à 8 injections au total).

III. PRELEVEMENTS DU SANG ET DES ORGANES MURINS

III. A. PRELEVEMENT SANGUIN ET ISOLEMENT DES CELLULES

III. A. 1. PRELEVEMENTS SANGUINS

Le suivi de la leucémie ou de la maladie résiduelle a été réalisé par un prélèvement sanguin en submandibulaire au maximum une fois par semaine. Ce type de prélèvement nous a permis en général d'obtenir un volume de 100 μ L de sang.

Des échantillons de sang ont également été prélevés au moment du sacrifice des souris. Afin d'obtenir un volume sanguin supérieur, le prélèvement a été réalisé par ponction en intracardiaque permettant ainsi la récupération d'un volume maximal de 1 mL.

Nous avons à disposition au laboratoire, un hémocytomètre qui nous a permis de quantifier les différentes lignées composant le sang des souris de cette étude (Sysmex, Roissy, France).

III. A. 2. ISOLEMENT DES CELLULES LEUCEMIQUES

Afin de détecter par cytométrie en flux ou par qPCR les cellules leucémiques, une lyse des globules rouges était réalisée en utilisant un tampon de lyse « maison ». Celui-ci est composé d'un mélange du réactif A et du réactif B à volume équivalent auquel est ajouté 3 volumes d'eau stérile. Le réactif A est composé de 1,55 mol/L de NH_4Cl et de 0,37 g/L de Na_2EDTA dans 100 mL d'eau stérile. Le réactif B est une solution de KHCO_3 à 0,1 mol/L.

Le tampon de lyse devait être laissé en contact avec l'échantillon sanguin durant 1 à 2 minutes puis dilué directement dans du PBS avant d'effectuer une centrifugation pour culotter les cellules et éliminer les hématies lysées.

En cas d'utilisation pour une analyse d'expression par RT-qPCR, le culot cellulaire était conservé en RNeasy® (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour éviter la dégradation des ARN.

Si l'analyse se faisait par cytométrie en flux, le marquage était réalisé après cette étape de lyse des globules rouges en veillant à effectuer un lavage supplémentaire en PBS avant de débiter l'immunomarquage.

III. A. 3. ISOLEMENT DES CELLULES MONONUCLEÉES DU SANG (PBMC)

Les cellules sanguines mononucléées murines ont été isolées par centrifugation sur un gradient de Pancoll®, polymère de glucide ramifié de densité 1,086 g/mL (Dutscher, Brumath, France).

Pour se faire, le volume sanguin prélevé des souris était ajusté à 500 μL avec du PBS et déposé délicatement sur un volume équivalent de Pancoll®, en évitant tout mélange des deux solutions. La séparation était effectuée par centrifugation à 800 g durant 20 minutes à température ambiante (TA). Les cellules mononucléées étaient ainsi séparées des autres éléments sanguins et nettement visualisables par la présence d'un anneau blanchâtre, qu'il suffisait de prélever et laver avec du PBS avant toutes analyses.

III. B. PRELEVEMENT DES ORGANES

Les souris leucémiques qui présentaient des signes du développement de la leucémie tels qu'une piloérection, un isolement de l'animal par rapport aux autres animaux présents, ou une diminution des déplacements étaient sacrifiées par dislocation cervicale. Les souris contrôles injectées avec du PBS ont également été euthanasiées par cette technique en parallèle des souris leucémiques.

Le prélèvement des organes a été réalisé à l'aide d'outils stériles et une fois prélevés, ils étaient conservés dans du PBS et dans la glace.

Les tibias et fémurs des souris ont été prélevés puis les épiphyses étaient coupées afin de récupérer la moelle osseuse contenue dans les diaphyses et épiphyses de ces os.

Les cellules des différents organes ont été isolées par broyage mécanique, filtrées et les globules rouges ont été éliminés à l'aide d'un tampon de lyse particulier (BD Pharm Lyse™, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) qui n'a pas d'activité sur la lignée et les sous-clones leucémiques. Un dénombrement cellulaire sur cellule de Thoma a été réalisé avant de poursuivre les analyses d'immunomarquage par cytométrie en flux ou d'expression des acides nucléiques par qPCR. En cas d'utilisation de ces cellules pour l'expression des ARN, des culots sont conservés en RNAlater® au congélateur à -80°C.

IV. MARQUAGE MORPHOLOGIQUE ET PROTEIQUE SUR LAME

IV. A. PREPARATION CELLULAIRE SUR LAME

Les cellules leucémiques (lignée cellulaire ou sous-clones) ont été au préalable lavées en tampon MACS froid (Miltenyi Biotec, Paris, France), reprises à 1 M/mL et conservées dans la glace.

La lame était associée à une chambre à échantillon et une étape d'humidification de la chambre était réalisée par l'ajout de 100µL de tampon MACS. Puis, une centrifugation de cette chambre durant 2 minutes à 200 rotations par minute (rpm) était effectuée sur une cyto centrifugeuse (Cytospin™ 4 Cytocentrifuge, ThermoFisher Scientific, Saint-Aubin, France).

Ensuite, une suspension de 100 000 cellules était déposée sur la chambre et centrifugée à 200 rpm durant 2 minutes pour les lignées cellulaires ou 800 rpm pendant 10 minutes pour les cellules de moelle osseuse murine. Les lames étaient ensuite séchées à l'air libre avant d'effectuer les marquages (MGG, marquage des estérases ou immunomarquage fluorescent).

IV. B. MARQUAGE MAY-GRÜNWARD GIEMSA

Le marquage au May-Grünwald Giemsa a été réalisée en utilisant le kit du fournisseur RAL Diagnostics (Nemours, France).

Pour cela, la première étape a consisté en une fixation des cellules avec le colorant May-Grünwald durant 3 minutes pour les lignées cellulaires ou 5 minutes pour les cellules isolées de la moelle osseuse de souris.

La deuxième étape était réalisée par l'ajout sur ce colorant, d'une quantité égale d'un tampon pH 6,8 provenant du fournisseur, suivi par une étape de mélange permettant de dissocier les sels contenus dans le May-Grünwald et activer leurs pouvoirs colorants durant 1 minute. Afin d'obtenir un développement idéal de la coloration, il était nécessaire d'éliminer le colorant sans effectuer de rinçage.

La troisième et dernière étape était d'ajouter le colorant Giemsa dilué au 1/30^e avec le tampon pH 6,8 durant 10 minutes. Une étape de rinçage des lames à l'eau du robinet durant 10 secondes était réalisée pour permettre le développement polychromique de la coloration. Les lames étaient laissées à l'air libre pour l'étape de séchage avant d'effectuer l'association entre lame et lamelles avec une milieu de montage (Merck, Saint-Quentin Fallavier, France).

IV. C. MARQUAGE DES ESTERASES, DE LA MYELOPEROXYDASE ET DE WT1

IV. C. 1. MARQUAGE DE LA MYELOPEROXYDASE (MPO)

Les cellules préalablement déposées sur lame par cytocentrifugation (§ IV.A) ont été fixées avec une solution méthanol : acétone (1 :1) froide durant 2 minutes puis séchées à l'air. Un rinçage a ensuite été effectué avec du PBS froid pendant 10 minutes.

Un tampon contenant du PBS, 3% de sérum d'albumine bovine (BSA) et 10µg/mL d'anticorps ciblant le CD16 et le CD32 a été ajouté pour bloquer les récepteurs Fc.

Les cellules ont ensuite été incubées sur la nuit, à 4°C en chambre humide avec un anticorps primaire dirigé contre la myéloperoxydase de souris (Santa Cruz-Clinisciences, Nanterre, France) dilué au 1/10^e en PBS/BSA 3%.

Les lames ont été lavées avec un tampon PBS/BSA 0,1% froid avant l'incubation avec l'anticorps secondaire anti-IgG couplé à un fluorochrome, Texas red (Jackson Immunoresearch-Interchim, Montluçon, France) durant 2 heures à TA, en chambre humide et à l'abri de la lumière.

Enfin, les cellules ont été lavées deux fois avec une solution PBS/BSA 0,1% froide et un marquage nucléaire avec le réactif de Hoechst (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) à une concentration de 1 µg/mL a été réalisé à TA durant 2 minutes. Les lames ont à nouveau été lavées avant d'effectuer le montage entre lame et lamelles.

IV. C. 2. MARQUAGE DE LA PROTEINE WT1

Le protocole utilisé est similaire au marquage de la myéloperoxydase mais l'anticorps utilisé était dirigé contre la protéine Myc Tag se trouvant en partie C-terminale de la protéine WT1 exprimée par le plasmide pVitro1.1.WT1.

L'anticorps primaire anti-Myc Tag (clone 4A6, Sigma Aldrich - Merck, Saint-Quentin Fallavier, France) dilué au 1/50^e en PBS/BSA 3% a été incubé sur la nuit à 4°C en chambre humide après l'étape de blocage des récepteurs Fc.

Le lendemain, les lames étaient lavées puis le marquage avec l'anticorps secondaire anti-IgG couplé à un Alexa Fluor 488 dilué au 1/100^e (Jackson Immuno Research - Interchim, Montluçon, France) était réalisé pendant 2 heures à TA, en chambre humide et à l'abri de la lumière. Un marquage des noyaux cellulaires a également été réalisée avec le réactif de Hoechst.

IV. C. 3. MARQUAGE CYTOCHIMIQUE DES ESTERASES

L'expression de deux types d'estérases a été recherchée, l'estérase dégradant l'alpha-naphthyl butyrate (ANBE) et celle catalysant la dégradation du naphthol AS-D chloroacétate (CAE).

Dans un premier temps, ce marquage a été évalué sur deux types cellulaires exprimant ou non ces estérases afin de valider le protocole du fournisseur. Pour cela, des cellules monocytaires CD115⁺ et granulocytaires Ly6G⁺ ont été purifiées sur colonne Miltenyi à partir de la moelle osseuse de souris saines C57BL/6J. Les cellules granulocytaires Ly6G⁺ exprimaient l'estérase dégradant le CAE mais pas l'ANBE et à l'inverse, les cellules monocytaires CD115⁺ exprimaient l'estérase catalysant l'ANBE mais pas le CAE.

Le marquage de ces deux types d'estérase a été réalisé selon les recommandations du fournisseur (α -Naphthyl Butyrate Esterase Kit et Naphthol AS-D chloroacétate Kit, Sigma Aldrich - Merck, Saint-Quentin Fallavier, France) sur les cellules en culture ou sur les cellules isolées de la moelle osseuse murine.

Le marquage cytochimique des estérases et les coloration au MGG des cellules ont été observées sur un microscope inversé à lumière blanche (Leica Biosystems, Allemagne). Concernant les immunomarquages fluorescents, ils ont été observés à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence DMI8 (Leica Biosystems, Allemagne).

V. MARQUAGE IMMUNOPHENOTYPIQUE

Cet immunomarquage a été réalisé soit à partir de cellules en culture dont le milieu a été préalablement retiré par centrifugation et les cellules lavées en tampon MACS avant le marquage, soit à partir de cellules isolées des organes ou du sang des souris.

Les immunomarquages ont été réalisés sur 1 million de cellules préalablement incubées avec un anticorps bloquant les récepteurs Fc (anti-CD16/32 à 10 μ g/mL).

Les cellules ont ensuite été incubées durant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière avec un ou des combinaisons d'anticorps directement couplés à un fluorochrome dilués à la concentration désirée dans du tampon MACS. En parallèle, un marquage de ces cellules était réalisé avec le(s) isotype(s) contrôle(s) de ces anticorps au même concentration.

Pour réaliser le marquage de protéines intracellulaires, une étape supplémentaire de fixation et perméabilisation durant 30 minutes et à 4°C a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur du kit (eBioscience, Thermo Fisher, Saint-Aubin, France). Puis, le marquage avec l'anticorps dirigé contre la protéine intracellulaire d'intérêt a été effectué dans le tampon de perméabilisation durant 30 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière.

Une fois l'incubation terminée, les cellules ont été lavées en PBS puis centrifugées avant d'être reprises dans 500 µL de PBS et conservées à 4°C. L'analyse des différents marquages a été réalisée grâce au cytomètre analyseur Cyan ADP MCL9 (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Les différents anticorps et isotypes, ainsi que les concentrations qui ont été utilisés pour ce projet sont référencés dans le tableau 7 suivant.

Anticorps et fluorochrome (clone)	Isotype contrôle	Concentration finale utilisée (µg/mL)
Anti-B220 APC (RA3-6B2)	Rat IgG2a, κ APC	2
Anti-CD11b PE (M1/70)	Rat IgG2b, κ PE	1
Anti-CD34 eFluor 660 (RAM34)	Rat IgG2a, κ eFluor 660	10
Anti-Sca1 PE (D7)	Rat IgG2a, κ PE	2
Anti-CD117 eFluor 450 (2B8)	Rat IgG2b, κ eFluor 450	2
Anti-CD150 APC (9D1)	Rat IgG1, APC	10
Anti-CD18 FITC (M18/2)	Rat IgG2a, κ FITC	10
Anti-CD3ε eFluor 450 (17A2)	Rat IgG2b, κ eFluor 450	2
Anti-CD3ε PE-Cy5 (145-2C11)	Armenian hamster IgG PE-Cy5	2
Anti-TCRVβ FITC (H57-597)	Armenian Hamster IgG2, FITC	10
Anti-Mac3 PE (M3/84)	Rat IgG1, κ PE	5
Anti-CD45.2 FITC (104)	Souris IgG2a, κ FITC	5
Anti-Ly6C APC (HK1.4)	Rat IgG2c, κ APC	2
Anti-Ly6G APC (RB6-8C5)	Rat IgG2b, κ APC	0,4
Anti-CD115 PE (AFS98)	Rat IgG2a, κ PE	2
Anti-CD19 PE (1D3)	Rat IgG2a, κ PE	1
Anti-CD4 APC (GK1.5)	Rat IgG2b, κ APC	0,4

Anti-CD8 eFluor 450 (53-6.7)	Rat IgG2a, κ eFluor 450	0,4
Anti-CD16/32 biotin (82)	Rat IgG2a, κ biotin	1
Streptavidin PeCy5	/	1
Anti-CD21/35 PE (8D9)	Rat IgG2a, κ PE	4
Anti-panNK PE (DX5)	Rat Lewis IgM, κ PE	4
Anti-NK1.1 PE (PK136)	Souris IgG2a, κ PE	4

TABLEAU 8 - ANTICORPS ET ISOTYPES CONTROLES UTILISES POUR CE PROJET. Ce tableau référence les différents anticorps utilisés pour les immunomarquages, ainsi que les isotypes contrôles associés et la concentration à laquelle ont été utilisés ces anticorps. Ces anticorps proviennent des fournisseurs eBioscience (Thermo Fisher, Saint-Aubin, France) et BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). CD : cluster de différenciation

VI. EVALUATION DE LA SENSIBILITE CELLULAIRE A UN TRAITEMENT

Afin d'évaluer la sensibilité des lignées et sous-clones vis-à-vis du traitement par chimiothérapie (cytarabine), nous avons effectué un test se basant sur la capacité des cellules vivantes à dégrader un sel de tétrazolium (MTT, Sigma Aldrich – Merck, Saint-Quentin Fallavier, France) formant ainsi un précipité de formazan de coloration violette.

Pour cela, 40 000 cellules ont étéensemencées dans des puits de plaques 96 puits à fond rond en milieu RPMI sans rouge de phénol contenant une concentration croissante de cytarabine (concentration allant de 10pg/mL à 100µg/mL).

Ces cellules ont été traitées durant 72h à 37°C et chaque point de concentration a été réalisé en triplicat. Des puits contrôles contenant uniquement des cellules sans traitement ont également étéensemencés pour avoir notre viabilité cellulaire basale.

A la fin des 72h, le MTT a été ajouté dans l'ensemble des puits à une concentration finale de 0,5mg/mL et la réaction a été incubée durant 4h à 37°C à l'abri de la lumière. La réaction a ensuite été stoppée en reprenant le précipité de formazan avec une solution d'isopropanol/HCl.

La mesure d'absorbance a été réalisée sur un spectrophotomètre à 570 nm (A570, Nanodrop, Thermo Fisher). Le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire selon la concentration de cytarabine utilisée a été calculé grâce à la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{A570 \text{ échantillon à tester}}{A570 \text{ échantillon contrôle}}$$

VII. EVALUATION DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE DES LYMPHOCYTES T

L'activité cytotoxique des lymphocytes T (CTL) de souris a été évaluée lors de ce projet d'étude.

Pour cela, les splénocytes des souris survivantes à l'injection du sous-clone C5 ont été isolés et activés *in vitro* en présence de lysat cellulaire provenant du sous-clone lui-même, de l'interleukine-2 (IL-2, Thermo Fischer Scientific, Saint-Aubin, France) à 1 ng/mL et des cellules spléniques saines déplétées en lymphocytes T comme cellules présentatrices de l'antigène. La déplétion des splénocytes de souris saines a été réalisée par un traitement préalable durant 20 minutes à 37°C avec 50 µg/mL de mitomycine C (Sigma Aldrich - Merck, Saint-Quentin Fallavier, France).

Après cette stimulation de 5 jours, les cellules activées ont été récupérées et remises en culture durant 2 jours dans du milieu de culture contenant à nouveau de l'IL-2 à 1 ng/mL. Cette seconde stimulation a permis la prolifération des lymphocytes T afin de pouvoir réaliser l'analyse CTL.

Pour réaliser l'analyse CTL, les lymphocytes T amplifiés ont été mis en culture durant 4h avec 5 000 cellules cibles (lignée C1498, sous-clone C5 ou lignée EL4). Celles-ci étaient préalablement marquées avec un marqueur fluorescent, le CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Thermo Fisher Scientific, Saint-Aubin, France) à 0,25 µmol/L. Les cellules cibles ont été dénombrées après l'incubation en présence des lymphocytes T à l'aide des microbilles par cytométrie en flux (Flow Absolute Count Beads (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) permettant ainsi d'évaluer le pourcentage de cellules cibles lysées par les lymphocytes T.

VIII. SUREXPRESSON D'UN GENE PAR TRANSFECTION STABLE

VIII. A. PRODUCTION D'UN VECTEUR PLASMIDIQUE EXPRIMANT LE GENE *Wt1*

La technique de fusion (In-Fusion HD Cloning, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) a été utilisée pour produire un plasmide portant et exprimant le gène d'intérêt *Wt1*.

Des amorces spécifiques composées de 15 paires de base homologues au plasmide d'insertion et de 18 à 25 paires de base homologues au gène d'intérêt à cloner ont été synthétisées selon les recommandations du fournisseur. La séquence des amorces synthétisées est la suivante :

- 5'-CAATCCGGAGTATACGGATCCGCCACCCTGGACTTCCTCCTGTTCGAG-3' pour l'amorce sens ;

- 5'-GCTCCTAGGCGTACGGGATCCTTAAACCTTATCGTCGTCATCCTTG-3' pour l'amorce antisens.

Le gène *Wt1* a été amplifié à partir du plasmide pCMV6-WT1 (Origene-Clinisciences, Nanterre, France) par PCR, purifié sur une colonne PCR Clean-up selon les recommandations du fournisseur (Macherey-Nagel, Hoerd, France) et la concentration d'ampligène a été mesurée par spectrophotométrie à 260 nm (Nanodrop, Thermo Fisher, Saint Aubin, France).

En parallèle, le plasmide pViro1.1.neo.mcs a été linéarisé, purifié sur colonne et dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

Grâce aux amorces synthétisées, 100 mg d'ampligène de *Wt1* a été fusionné avec 100 ng d'ADN plasmidique de pViro1.1.neo.mcs (Invivogen, Toulouse, France) en suivant le protocole du fournisseur formant ainsi le plasmide pViro1.1.WT1.

L'expression du gène *Wt1* est sous le contrôle du promoteur du facteur d'élongation EF1 α (rEF1). En partie 3' de la séquence du gène *Wt1*, se trouve la séquence Myc-Tag que nous avons décidé de conserver en vue d'une utilisation lors de la détection de l'expression de WT1 dans les cellules transfectées. Son expression est sous la dépendance du même promoteur (Figure 20).

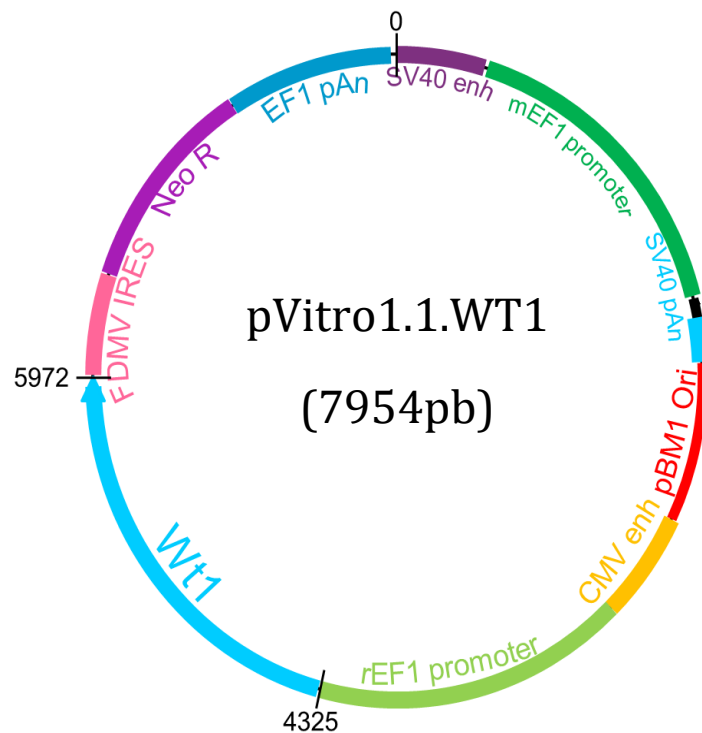


FIGURE 20 - STRUCTURE DU PLASMIDE PVITRO1.1.WT1 SYNTHETISE PAR LA TECHNIQUE DE FUSION. rEF1 et mEF1 sont deux promoteurs du facteur d'élongation 1 α de rat ou de souris,

respectivement. SV40enh et CMVenh permettent l'amplification de l'expression du gène inséré, provenant respectivement du virus Simien 40 et du cytomégalovirus humain. pBM1 est l'origine de réplication bactérienne du plasmide. FDMV IRES est un site d'entrée interne du ribosome permettant la traduction de l'ARNm de *Wt1* et du gène de résistance Neo. NeoR est la séquence entraînant la résistance de la cellule à l'antibiotique G418. EF1 pAn est un signal de polyadénylation permettant d'augmenter la stabilité des ARNm, de faciliter leur transport nucléo-cytoplasmique et de favoriser leur traduction.

VIII. B. AMPLIFICATION ET VALIDATION DU PLASMIDE PRODUIT

Ce plasmide pVITro1.1.WT1 a été amplifié dans des bactéries de la souche *Escherichia coli* compétentes (Zymo research-Ozyme, Saint Quentin En Yvelines, France) qui ont été mises en culture sur une gélose LB (Luria Bertani, ThermoFischer Scientific, Saint Aubin, France) contenant l'antibiotique de sélection kanamycine à 25µg/mL durant 24 heures (Sigma Aldrich - Merck, Saint-Quentin Fallavier, France).

Après cette incubation, une dizaine de colonies ont été récupérées et amplifiées séparément en milieu LB liquide complémenté en kanamycine durant 24h. Ces bactéries ont ensuite été lysées puis une purification sur colonne du plasmide amplifiée par celles-ci a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur (Plasmid DNA purification, Macherey-Nagel, Hoerd, France).

Un dépôt sur gel d'agarose à 1% des différentes purifications plasmidiques digérées par l'enzyme de restriction BamHI (New England Biolabs, Evry, France) ainsi que d'un marqueur de poids moléculaire (1Kb DNA ladder, New England Biolabs, Evry, France) a été réalisé afin de valider et sélectionner le plasmide amplifié exprimant le gène d'intérêt *Wt1* mesurant 1557pb. Ce plasmide a ensuite été transfecté aux différents sous-clones leucémiques C1498.

VIII. C. TRANSFECTION STABLE PAR ELECTROPORATION ET SELECTION DES SOUS-CLONES

La transfection du plasmide pVITro1.1.WT1 a été réalisée par électroporation à l'aide de l'automate Nucleofector® II (Amaxa biosystems-Lonza, Amboise, France) avec le programme T-030 pour l'ensemble des sous-clones C1498 à l'exception du sous-clone G10.

Pour se faire, 5 millions de cellules a été centrifugé, repris dans une solution de nucléofection et mis en présence de 2,5 µg de plasmide pVITro1.1.WT1.

Un plasmide contrôle exprimant la DsRed a été transfecté en parallèle permettant d'évaluer l'efficacité de la transfection par cytométrie en flux dans les 24 à 72 heures suivant l'électroporation.

Les sous-clones leucémiques exprimant le gène *Wt1* ont été sélectionnés par technique de dilution limite en milieu RPMI contenant 400 µg/mL d'antibiotique de sélection (G418, annoté NeoR sur la figure 26, InvivoGen, Toulouse, France) permettant ainsi d'éliminer les cellules n'ayant pas intégrées le plasmide. En effet, le promoteur EF-1α permet la transcription d'un gène de résistance au G418 associée à l'expression du gène d'intérêt *Wt1*.

IX. ANALYSE D'EXPRESSION PROTEIQUE

IX. A. EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines totales sont extraites à partir d'un culot cellulaire de 5 millions en utilisant le tampon de lyse du kit M-PER (Thermo Fisher Scientific, Saint-Aubin, France) selon les recommandations du fournisseur, auquel a été ajouté des inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich – Merck, Saint-Quentin Fallavier, France) et de phosphatases (Cocktail B et C dilués respectivement au 1/100^e et 1/50^e, Santa Cruz – Clinisciences, Nanterre, France) afin d'empêcher la dégradation des protéines extraites.

L'extraction protéique a été effectuée dans la glace durant 10 minutes avec le tampon de lyse et le surnageant contenant les protéines extraites a été récupéré après une étape de centrifugation à 14000g durant 15 minutes à 4°C.

Une fois l'extraction réalisée, les protéines sont dosées par une méthode colorimétrique dérivée de celle de Bradford (Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Fisher, Saint-Aubin, France) à l'aide d'une gamme étalon de sérum d'albumine bovine en suivant les recommandations du fournisseur.

La réaction colorimétrique est analysée sur un spectrophotomètre à 562 nm. Les protéines peuvent être directement préparées pour effectuer une migration sur gel d'électrophorèse ou alors conservées au congélateur à -20°C pour une utilisation différée.

IX. B. MIGRATION DES PROTEINES PAR WESTERN-BLOT

Une quantité constante de protéines (30µg) a été dénaturée dans un tampon LDS en présence d'un agent dénaturant, le sodium dodécyl-sulfate (Invitrogen – Thermo Fisher, Saint-Aubin, France) à 95°C pendant 10 minutes.

La migration des protéines a été réalisée sur un gel d'électrophorèse Bis-Tris 4-12% (Invitrogen – Thermo Fisher, Saint-Aubin, France) dans un tampon de migration MES adapté

aux protéines de petites et moyennes tailles (Invitrogen – Thermo Fisher, Saint-Aubin, France) pendant 45 minutes à 200V.

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à l'appareil iBlot® (Thermo Fisher, Saint-Aubin, France).

Avant d'effectuer le marquage anticorps, une étape de saturation de la membrane a été réalisée durant 45 minutes, sous agitation, dans un tampon TBS 1X (Tris à 50 mmol/L, NaCl à 150 mmol/L et Tween à 0,2%) contenant 5% de lait.

L'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-WT1 (clone H-290, Santa Cruz – Clinisciences, Nanterre, France) dilué au 1/500^e dans du TBS 1X - 5% de lait, a été incubé sur la nuit à 4°C, sous agitation constante.

Le lendemain, la membrane a été rincée en TBS 1X avant d'effectuer l'incubation avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de Raifort (HRP) (chèvre anti-IgG-HRP de lapin, Santa Cruz – Clinisciences, Nanterre, France) dilué au 1/10000^e dans du TBS 1X - 5% lait durant 45 minutes sous agitation et à TA.

La révélation du marquage est réalisée par une réaction de chimiluminescence en incubant la membrane avec le réactif ECL Prime (Fischer Scientific, Illkirch, France) contenant le substrat de la peroxydase. Cette réaction est effectuée à l'obscurité durant 5 minutes avant de révéler la réaction avec le LAS 4000 (GE Healthcare, Buc, France).

Pour s'assurer d'une extraction et d'un dépôt quantitativement homogène des protéines, le marquage des protéines d'actine β a été réalisé après une étape de lavage de la membrane et de « décrochage » des anticorps précédemment fixés à l'aide d'un tampon spécifique (Thermo Fisher, Saint-Aubin, France) sous forte agitation durant 5 minutes et à TA. Il est nécessaire d'effectuer plusieurs lavages en TBS 1X avant d'effectuer une seconde saturation de la membrane et une incubation avec l'anticorps primaire anti-actine β (clone C4 dilué au 1/2000^e) et l'anticorps secondaire anti-IgG-HRP (au 1/5000^e)(Santa Cruz – Clinisciences, Nanterre, France).

X. HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE (CGH)

L'ADN génomique de la lignée C1498 et des différents sous-clones leucémiques a été hybridé contre l'ADN contrôle de lymphocytes T. L'analyse génomique a été réalisée pour la lignée C1498 sur la puce à ADN Agilent CGH Mouse Genome 1M et pour les sous-clones sur les puces

Agilent CGH Mouse Genome 4×180K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) en respectant les recommandations du fournisseur.

La lecture des puces a ensuite été effectuée sur le système Agilent G2505C Micro-Array Scanner et l'analyse des images grâce au logiciel CGH Analytics V4 avec comme référence le génome murin mm9. Les données ont été corrigées en utilisant l'algorithme aCGH éliminant ainsi les aberrations faussement positives.³²²

XI. ANALYSE D'EXPRESSION D'ACIDES NUCLEIQUES

XI. A. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES ET TRANSCRIPTION INVERSE

XI. A. 1. EXTRACTION DES ADN

L'extraction des ADN génomiques (ADNg) des cellules en culture a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur du kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ADNg extraits ont été quantifiés sur un spectrophotomètre à 260 nm et congelés au -80°C.

XI. A. 2. EXTRACTION DES ARN ET TRANSCRIPTION INVERSE

Les culots cellulaires provenant de cellules en culture ou également de cellules isolées à partir des organes de souris ont été conservés en RNAlater au congélateur à -80°C afin d'éviter au plus la dégradation de ceux-ci. Avant d'effectuer les extractions, les culots ont été centrifugés à 4°C et le surnageant a été retiré.

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide de deux kits distincts selon la quantité cellulaire de l'échantillon. En effet, l'extraction des ARN issus de cellules sanguines murines a été réalisée à l'aide du kit Nucleospin RNA XS (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) car plus efficace pour les faibles quantités de cellules. Pour l'ensemble des autres extractions, le kit Nucleospin RNA standard (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) a été employé selon les recommandations du fournisseur. Une fois l'extraction terminée, la quantité d'ARN extraite a été évaluée sur un spectrophotomètre à 260 nm.

La transcription inverse a ensuite été directement réalisée sur 1 µg d'ARN total selon les recommandations du fournisseur du kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ADN complémentaires ainsi que les ARN ont été conservés au congélateur à -80°C avant toute autre analyse.

XI. B. NORMALISATION DE L'EXPRESSION AVEC UNE GAMME PLASMIDIQUE

Afin de comparer les expressions du gène *Wt1* détectées dans la moelle osseuse et le sang des différentes souris (contrôles, leucémiques et présentant une survie prolongée), nous avons mis en place une méthode de normalisation standardisée de cette expression en fonction d'une gamme plasmidique exprimant un nombre de copies connu du gène Abelson 1 (*Abl1*). Cette normalisation d'expression du gène *WT1* par rapport à 10^4 copies du gène *ABL1* est utilisé dans le cadre du diagnostic et du suivi des patients atteints de LAM.¹³¹ Il a été vérifié qu'il n'existait pas d'amplification ou de délétion de ce gène dans les différents sous-clones C1498 avant de sélectionner ce gène de référence.

Pour réaliser cette gamme étalon, nous avons dans un premier temps calculé la masse d'une molécule de plasmide Abl1 (pCMV6-Abl1, Origene-Clinisciences, Nanterre, France) à l'aide de la formule qui suit.

$$\text{Masse 1 molécule plasmide Abl1} = \frac{\text{poids Dalton}}{\text{Nombre d'Avogadro}} = \frac{(8300) \times (660)}{6,022 \times 10^{23}} = 9 \times 10^{-19}g$$

Poids moyen d'une paire de base (pb) = 660

Taille du plasmide pCMV6-Abl1 = 8300pb

Nombre d'Avogadro : constante correspondant au nombre d'entité contenue dans une mole

Nous permettant ainsi de déterminer une masse d'ADN plasmidique correspondant à un nombre de copies souhaité du gène grâce à la formule suivante :

$$\text{Masse d'ADN plasmidique} = \text{Nombre de copies désiré} \times \text{masse 1 molécule plasmide}$$

Lors de l'étude, cette gamme d'ADN plasmidique était composée de 7 points de dilution du plasmide Abl1 (s'étendant de 10^7 copies à 500 copies) et a toujours été réalisée lors de la mesure d'expression du gène *Wt1* ou *ZsGreen* par qPCR. La figure 21 vous présente un exemple de gamme d'ADN plasmidique réalisée lors de cette étude.

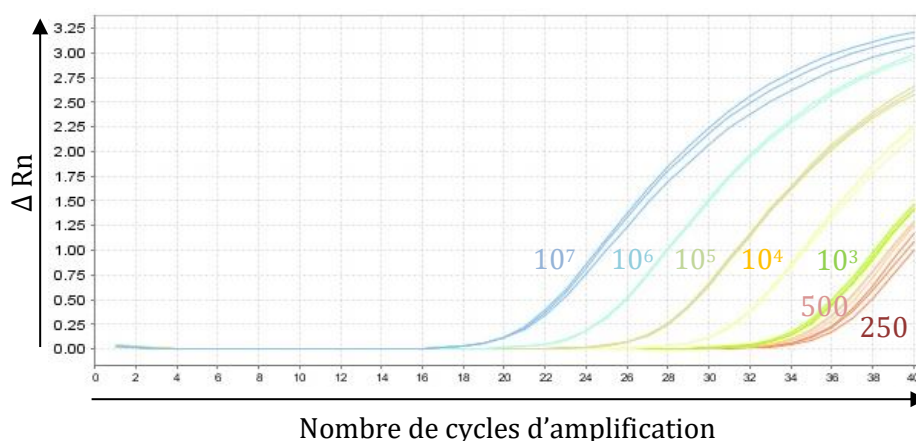


FIGURE 21 - EXEMPLE D'UNE GAMME PLASMIDIQUE ABL1 REALISEE LORS DE CETTE ETUDE. La normalisation des gènes d'intérêt est effectuée en fonction de 10^4 copies d'*Abl1*. Nous réalisons une gamme de normalisation s'étendant de 10^7 à 250 copies du gène *Abl1*. Ces courbes d'amplification vous présente le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour induire un signal fluorescent différent du bruit de fond (valeur ΔRn).

XI. C. REACTION DE PCR QUANTITATIVE

L'expression des gènes *Wt1* et *ZsGreen* dans les différents échantillons (cellules en culture ou issues de souris) a été mesurée par deux types de réactions qPCR.

En effet, le gène *Wt1* a été évalué en utilisant un kit TaqMan™ Universal PCR Master Mix (ThermoFischer, Saint-Aubin, France) avec des sondes commerciales amplifiant un produit situé dans l'exon 3 – 4 de ce gène.

Pour le gène de la *ZsGreen* il a été détecté grâce au kit GoTaq® qPCR Master mix selon les recommandations du fournisseur (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), les amorces ont été synthétisées par Eurogentec (Angers, France) et se fixent en partie terminale de la séquence du gène. Les amorces ou les sondes Taqman qui ont été utilisées pour amplifier le gène de référence *Abl1* se situent dans l'exon 8 – 9 du gène (Tableau 8).

Pour les deux techniques, le volume réactionnel était de 50 μ L et contenait 5 μ L d'ADNc et 40 cycles d'amplification étaient réalisés.

Gène amplifié (technique utilisée)	Séquence des amorces sens et antisens (5'-3') ou référence des sondes et localisation	Taille de l'amplicon (pb)
<i>Abl1</i> (Taqman)	Mm00802037_m1 ; exon 8-9	62
<i>Wt1</i> (Taqman)	Mm01337051_m1 ; exon 3-4	92
<i>Abl1</i> (SYBR Green)	5'-ATGGCATGTACCTTACCCG-3' ,	134

	5'-GTTCCACTGCCAACATGCTC-3' ; exon 8-9	
<i>ZsGreen</i> (SYBR Green)	5'-CCCGTGAAGACCGCAGCGAT-3' , 5'-CGACCGGCGCTCAGTTGGAA-3' ; fin de la séquence <i>ZsGreen</i>	121

TABLEAU 9 - TABLEAU PRESENTANT LES AMORCES UTILISEES POUR CE PROJET. Pour chaque gène d'intérêt, il est précisé la localisation de ces amorces et la taille de l'amplicon en paires de base (pb). Pour les sondes Taqman, les séquences précises ne sont pas mentionnées par le fournisseur, le tableau présente donc la référence des sondes (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Saint-Aubin, France).

XII. GAMME ETALON DETERMINANT LE SEUIL DE DETECTION DU GENE *WT1* ET *ZSGREEN*

Afin de déterminer le seuil de détection par RT-qPCR des gènes *Wt1* et de la *ZsGreen*, il a été réalisé des gammes étalons des sous-clones surexprimant ces gènes dans la moelle osseuse de souris C57BL/6J saines.

Pour réaliser ces gammes, la moelle osseuse de souris saines a été prélevée, les cellules ont été isolées et les hématies ont été lysées selon le protocole § III.B (p-85-) avant d'effectuer une numération cellulaire sur cellule de Thoma.

En parallèle, les différents sous-clones d'intérêt (E2/WT1, le mélange C5/WT1, B11/WT1 et E7WT1 ou le mélange C5, B11 et E7) en culture ont été comptés et mélangés selon des quantités précises à la moelle osseuse contrôle afin de réaliser les différents points de la gamme étalon. La gamme étalon était constituée d'un point contenant uniquement les cellules (100% d'expression du gène d'intérêt) et un point contenant uniquement les cellules de la moelle osseuse murine (0%).

Pour réaliser cette gamme, une dilution en série au 10^e a été réalisée, s'étendant de 10⁻¹(10%) à 10⁻⁵(0,001%) cellules exprimant le gène d'intérêt dans les cellules de la moelle osseuse saine. Chaque point était constitué de 5 millions de cellules totales. Des dilutions intermédiaires (au 1/4^e) ont été réalisées entre 10⁻³-10⁻⁴ et 10⁻⁴-10⁻⁵.

Une fois la gamme étalon réalisée, une extraction et une transcription inverse des ARN étaient effectuées avant d'analyser l'expression par qPCR des gènes d'intérêt (*Wt1* et *ZsGreen*).

RESULTATS

I. CARACTERISATION DE LA LIGNEE MURINE LEUCEMIQUE C1498 ET DE LA LEUCEMIE INDUITE SUITE A SON INJECTION

Afin de valider l'utilisation de la lignée leucémique C1498 et des sous-clones isolées à partir de celle-ci, le premier objectif de ce projet a été d'étudier les caractéristiques morphologiques et phénotypiques de cette lignée murine ainsi que les caractéristiques de la leucémie développée suite à son injection par voie intraveineuse à des souris congéniques C57BL/6J (CD45.1⁺). En effet, la littérature a très peu étudié les caractéristiques de cette lignée et est resté assez confuse quant au type de leucémie induite puisque certains auteurs attestent d'une leucémie granulocytaire, myélo-monocytaire ou plus récemment, une étude a décrit cette leucémie comme étant de type NKT (natural killer T).^{321,323,324}

Pour cela, nous avons effectué dans un premier temps, une caractérisation phénotypique de la lignée cellulaire C1498 après immunomarquage puis analyse par cytométrie en flux et microscopie afin de déterminer le type de lignée hématopoïétique et l'état de différenciation de ces cellules.

I. A. LA LIGNEE LEUCEMIQUE C1498

I. A. 1. IMMUNOPHENOTYPAGE DE LA LIGNEE

Afin de préciser le phénotype cellulaire de cette lignée *in vitro*, les marqueurs des cellules hématopoïétiques ont été évalués avec un panel d'anticorps dirigés contre différentes molécules. L'analyse par cytométrie en flux a révélé une absence d'expression des marqueurs de cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques suivants : CD117 (c-Kit), CD34, Sca-1 (Figure 22) ainsi que les marqueurs CD150, CD16 et CD32 (données non présentées).

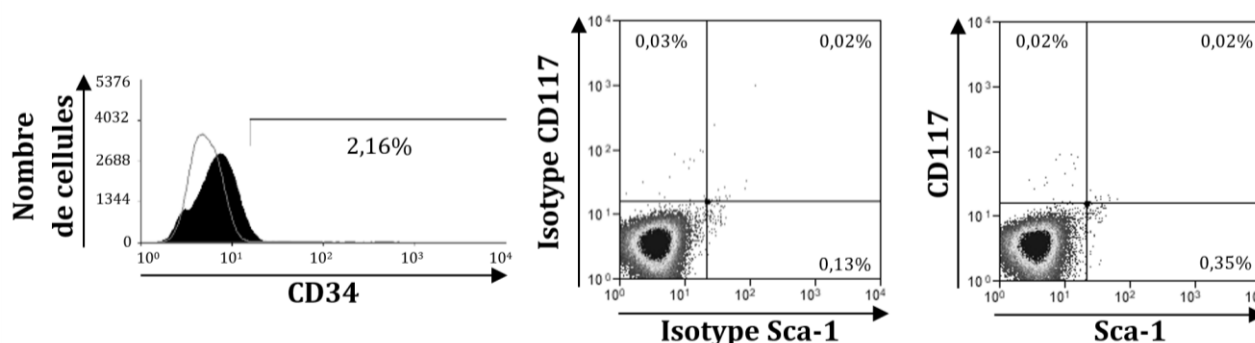


FIGURE 22 - ABSENCE D'EXPRESSION DE MARQUEURS DE CELLULES SOUCHES ET PROGENITEURS HEMATOPOÏÉTIQUES. Résultats représentatifs des marqueurs de cellules souches et progéniteurs testés sur la lignée leucémique C1498. Les cellules ont été comptées, lavées puis marquées directement avec des anticorps dirigés contre le CD34, CD117(c-kit) et Sca-1 ou les isotypes contrôles associés. L'analyse des marquages a été réalisée par cytométrie en flux.

De plus, cette lignée exprime certains marqueurs de différenciation extracellulaire qui sont Mac-1 (CD11b/CD18) à hauteur de 6% et B220 (supérieur à 25%) tandis que les marqueurs Ly6G, Ly6C, CD115, CD21/CD35, CD19, CD4, CD8, NK1.1 et panNK ne sont pas exprimés (données non présentées). D'autres marqueurs de différenciation sont exprimés au niveau intracellulaire tels que le CD3ε, le TCR chaîne Vβ et Mac-3. Cette lignée exprime donc des marqueurs de la lignée myéloïde et lymphoïde (Figure 23).

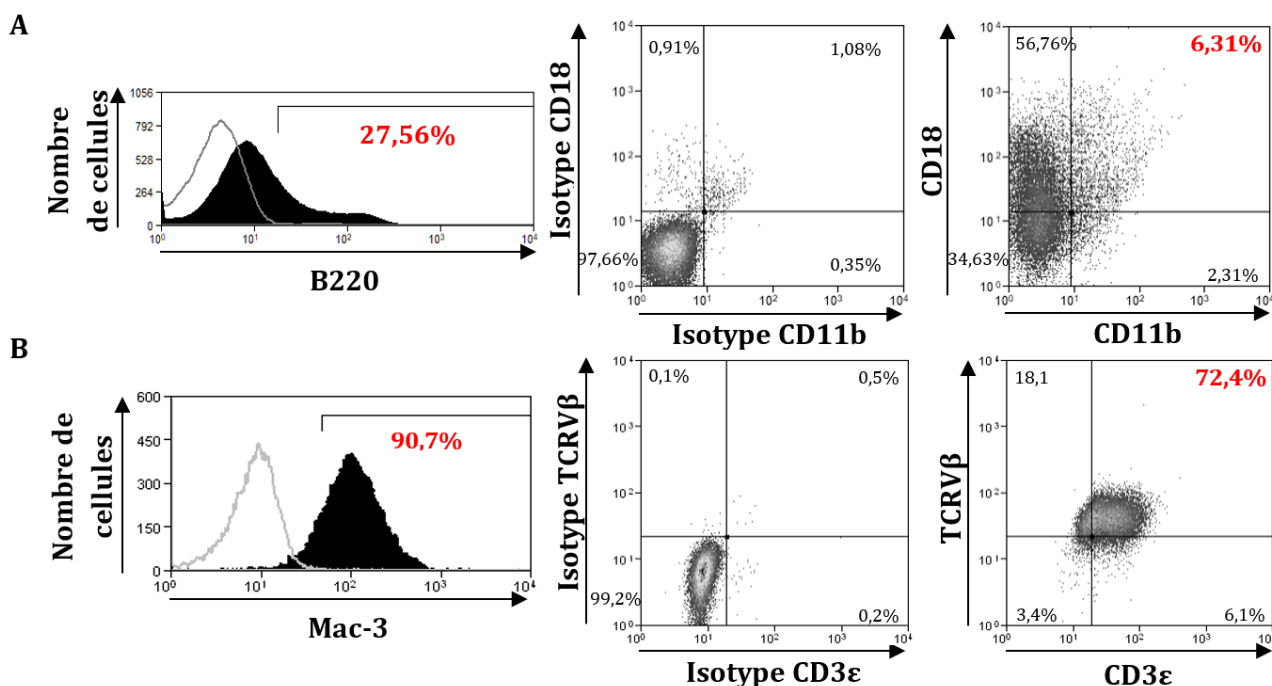


FIGURE 23 - MARQUEURS DE DIFFERENCIATION EXPRIMEES PAR LA LIGNEE C1498 *IN VITRO*. Résultats de cytométrie en flux représentatifs des marqueurs membranaires (A) et intracellulaires (B) exprimés par la lignée C1498. Les cellules ont été lavées puis marquées directement avec des anticorps dirigés contre le CD18, CD11b et B220 ou les isotypes contrôles associés. Pour les marqueurs intracellulaires (CD3ε, TCRVβ et Mac-3), une étape de fixation et de perméabilisation ont été préalablement réalisées. Sur les histogrammes, l'isotype contrôle est représenté par le tracé gris et le marquage avec l'anticorps spécifique en noir plein.

I. A. 2. EXPRESSION DE LA MYELOPEROXYDASE PAR LA LIGNEE

Afin de déterminer l'origine de cette lignée, nous avons effectué un marquage des cellules C1498 avec un anticorps spécifique de la myéloperoxydase. Chez la souris, cette enzyme est exprimée par les cellules myéloïdes (granulocytaires et monocytaires) mais n'est pas présente dans les lignées lymphoïdes. Les cellules C1498 ont toutes présenté un marquage fluorescent positif pour la myéloperoxydase, observable par microscopie (Figure 24). Ceci nous a indiqué une différenciation myéloïde de ces cellules leucémiques.

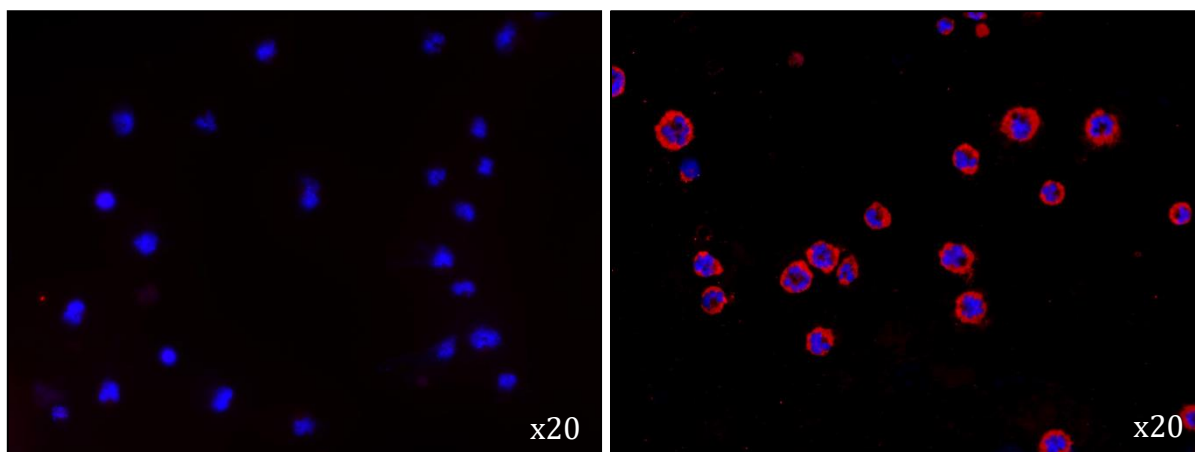


FIGURE 24 - EVALUATION DE L'EXPRESSION DE LA MYELOPEROXYDASE PAR LA LIGNEE LEUCEMIQUE C1498. A gauche est présenté le marquage des cellules avec l'isotype contrôle et à droite le marquage de la lignée C1498 avec l'anticorps ciblant la myéloperoxydase (fluorescence rouge). Les noyaux cellulaires sont visibles après une coloration des acides nucléiques avec le réactif de Hoechst. L'observation des lames a été réalisée sur un microscope à fluorescence à l'objectif 20 (grossissement final $\times 200$).

I. A. 3. CYTOMORPHOLOGIE ET ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA LIGNEE

Afin de préciser le type de lignée myéloïde, nous avons évalué l'expression de deux types d'estérases nous permettant ainsi de discerner une différenciation monocytaire ou granulocytaire de ces cellules. En effet, les cellules appartenant à la lignée granulocytaire présentent une activité enzymatique capable d'hydrolyser spécifiquement le naphthol AS-D-chloroacétate entraînant la formation d'un précipité rouge-rosé dans ces cellules. Tandis que les monocytes ou leurs précurseurs, eux, expriment une estérase capable de dégrader l' α -naphthyl butyrate dont la réaction enzymatique est visualisable sous forme de granulations rouges-brunes.³²⁵

La lignée C1498 a présenté une réactivité positive pour ces deux types d'estérases comme en atteste la présence de granulations brunes dans la plupart des cellules (Figure 25A) et de granulations rosées dans certaines d'entre-elles (Figure 25B). Ceci indique donc que la lignée est composée d'un mélange de cellules myéloïdes appartenant à la lignée monocytaire et granulocytaire.

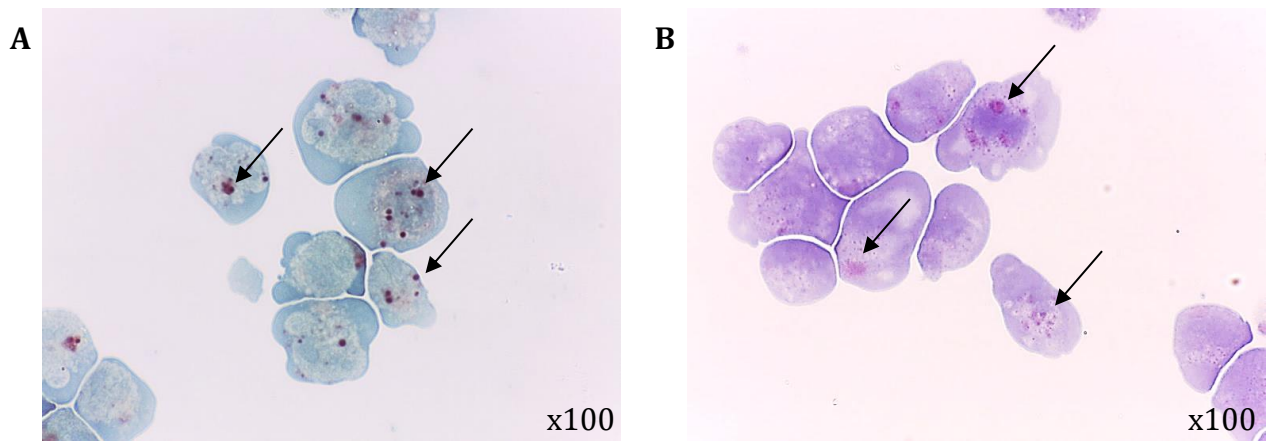


FIGURE 25 - LA LIGNEE C1498 EXPRIME LES DEUX TYPES D'ESTERASES. L'activité enzymatique des estérases a été évaluée par une réaction cytochimique des cellules après cytocentrifugation sur lame et fixation. (A) Une réaction enzymatique positive dégradant l' α -naphthyl butyrate est observable par la présence de granulations marrons. (B) L'estérase dégradant le naphthol AS-D chloroacétate est visualisable par la formation de granulations roses. Les flèches noires indiquent certaines granulations positives pour ces deux types d'estérases. L'observation des lames a été effectuée sur un microscope à lumière blanche à l'objectif 100 (grossissement final $\times 1000$).

Une coloration au May-Grünwald Giemsa nous a ensuite permis de mettre en évidence l'aspect cellulaire et le stade de maturation des cellules C1498. En effet, elle a révélé des cellules de grandes tailles avec un noyau volumineux qui présente souvent plusieurs nucléoles (indiqué par les flèches) et une chromatine généralement fine. Le cytoplasme de ces cellules est basophile avec un halo plus clair en périphérie du noyau et des vacuoles sont visibles dans plusieurs de ces cellules (Figure 26). Cet aspect cellulaire est représentatif de cellules myéloïdes immatures (myéloblastes et/ou monoblastes).^{326,327}

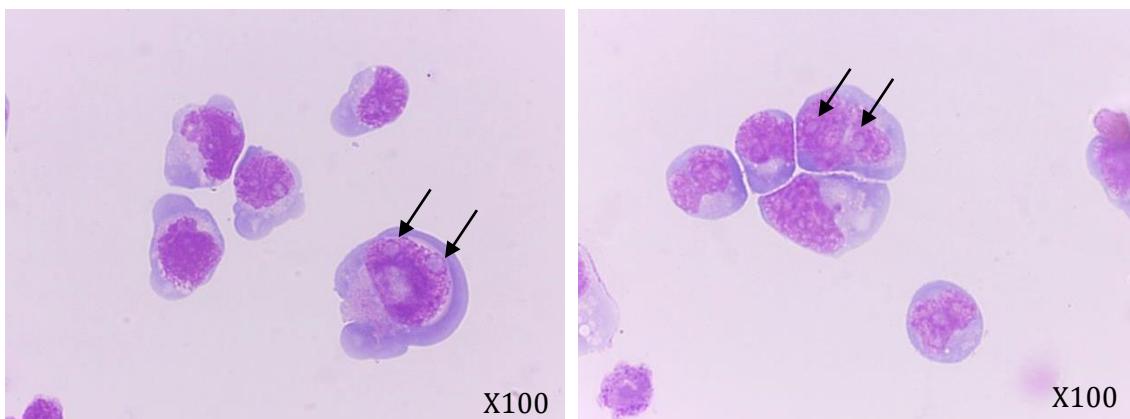


FIGURE 26 - COLORATION DE LA LIGNEE C1498 AU MAY-GRÜNWARD GIEMSA. Les cellules C1498 ont été déposées sur lame par cytocentrifugation puis colorées au MGG. Les flèches noires indiquent les nucléoles. Les images ont été prises avec un microscope optique à lumière blanche à l'objectif 100 (grossissement final $\times 1000$).

L'ensemble de ces résultats indique que la lignée C1498 est composée d'un mélange cellulaire de myéloblastes et de monoblastes. En effet, cette lignée exprime la myéloperoxydase attestant

de son origine myéloïde et présente une morphologie de blastes immatures. De plus, l'expression des deux types d'estérases (CAE et ANBE) dégradant le naphthol AS-D chloroacétate et l' α -naphthyl butyrate indique la présence de cellules engagées, respectivement, dans la lignée granulocytaire et monocytaire.

I. B. L'INJECTION DES CELLULES C1498 INDUIT LE DEVELOPPEMENT D'UNE LAM

Suite à la caractérisation de la lignée C1498 *in vitro*, nous avons étudié le développement de la leucémie induite par celle-ci *in vivo* dans les souris C57BL/6J. Ces souris congéniques CD45.1⁺ ont été injectées soit avec du PBS (contrôle), soit avec une suspension cellulaire contenant 10⁶ cellules C1498 (CD45.2⁺) par voie intraveineuse. L'ensemble des souris injectées avec la lignée C1498 succombe à la maladie entre 16 et 20 jours (moyenne de 18,5 jours) (Figure 27).

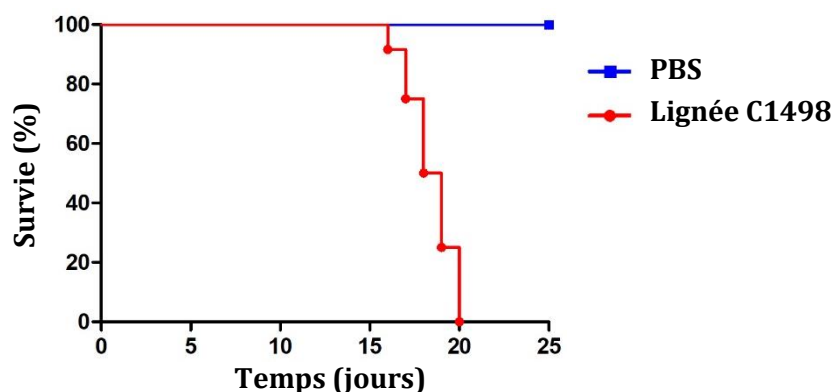


FIGURE 27 - L'INJECTION INTRAVEINEUSE DE LA LIGNEE C1498 ENTRAINE LE DECES DE LA TOTALITE DES SOURIS. Les souris congéniques C57BL/6J ont été injectées par voie intraveineuse avec 1 million de cellules leucémiques (lignée C1498) ou un volume équivalent de PBS (contrôle). La survie de ces souris a été suivie au cours du temps. Une analyse Logrank comparant la survie des 6 souris contrôles avec celle des 11 souris injectées avec la lignée a été réalisée ($p=0,0002$).

Nous nous sommes donc intéressés aux différents organes vitaux pouvant être envahis par les cellules leucémiques C1498 et pouvant impacter leur fonctionnement, voire entraîner la mort de ces souris.

I. B. 1. INFILTRATION DES ORGANES DES SOURIS INJECTEES AVEC LA LIGNEE

Pour cela, nous avons évalué l'infiltration des organes à l'aide du marqueur CD45.2 exprimé par la lignée C1498 tandis que les souris congéniques C57BL/6J utilisées pour cette étude présentent un fond génétique CD45.1. Ainsi, un envahissement important de différents organes tels que la moelle osseuse et la rate avec une infiltration moyenne de 30% et le foie ou les poumons avec une infiltration pouvant atteindre plus de 60% selon les souris a été observé. Tandis que le thymus et les reins semblent être dans une moindre mesure infiltrés par la lignée C1498 (Figure 28).

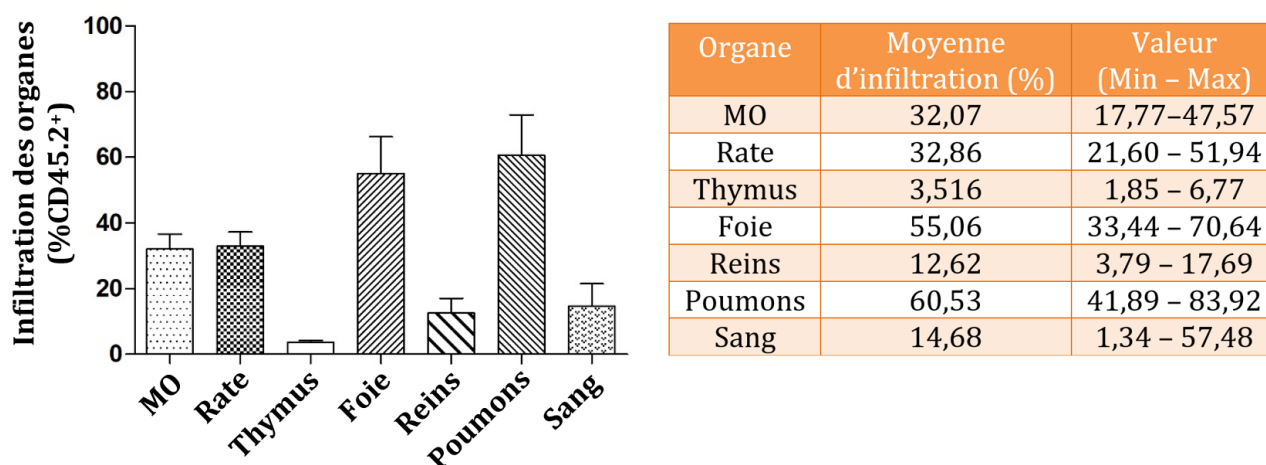


FIGURE 28 - INFILTRATION PAR LES CELLULES C1498 DES ORGANES DES SOURIS C57BL/6J. L'infiltration des différents organes par les cellules C1498 a été analysée grâce à l'expression du marqueur CD45.2. Les cellules ont été isolées à partir des organes, puis une lyse des globules rouges a été réalisée avant d'effectuer le marquage avec l'anticorps fluorescent dirigé contre la molécule CD45.2 et l'analyse par cytométrie en flux. Les moyennes des pourcentages d'infiltration des organes et les erreurs standards (SEM) sont représentées sous forme d'histogramme et d'un tableau référençant la moyenne d'infiltration de chaque organe avec la valeur minimale (Min) et la valeur maximale (Max) détectée chez 6 souris. MO : moelle osseuse.

I. B. 2. ETUDE PHENOTYPIQUE DES ORGANES HEMATOPOÏETIQUES ET DU SANG

a. Analyse des populations cellulaires de la moelle osseuse

La moelle osseuse ainsi que la rate sont les principaux sites hématopoïétiques chez la souris et sont touchés lors du développement leucémique. Nous avons observé une infiltration importante de la moelle osseuse, en moyenne de 30%, par les cellules C1498 (Figure 28).

Dans ce sens, nous avons pu mettre en évidence une diminution des différents stades de maturation des cellules hématopoïétiques de la lignée lymphocytaire B, granulocytaire et monocyttaire par immunomarquage et analyse par cytométrie en flux. En effet, les cellules CD19⁺B220⁺ regroupant les stades de maturation des lymphocytes B, allant du progéniteurs aux cellules matures, montrent une diminution par 5 de leurs proportions dans la moelle osseuse des souris leucémiques en comparaison des souris contrôles (Figure 29A).

La moelle osseuse des souris leucémiques présentent trois fois moins de cellules appartenant à la lignée monocyttaire CD115⁺ (marqueurs des monocytes résidents et inflammatoires) que celle des souris contrôles (Figure 29B).³²⁸

Enfin, la lignée granulocytaire est également impactée par le développement leucémique puisque nous avons observé une diminution par 4 des cellules CD11b⁺Ly6G⁺ dans la moelle osseuse des souris leucémiques par rapport à celle des souris contrôles (Figure 29C).

Le développement leucémique impacte donc les lignées lymphocytaires, monocytaires et granulocytaires de la moelle osseuse.

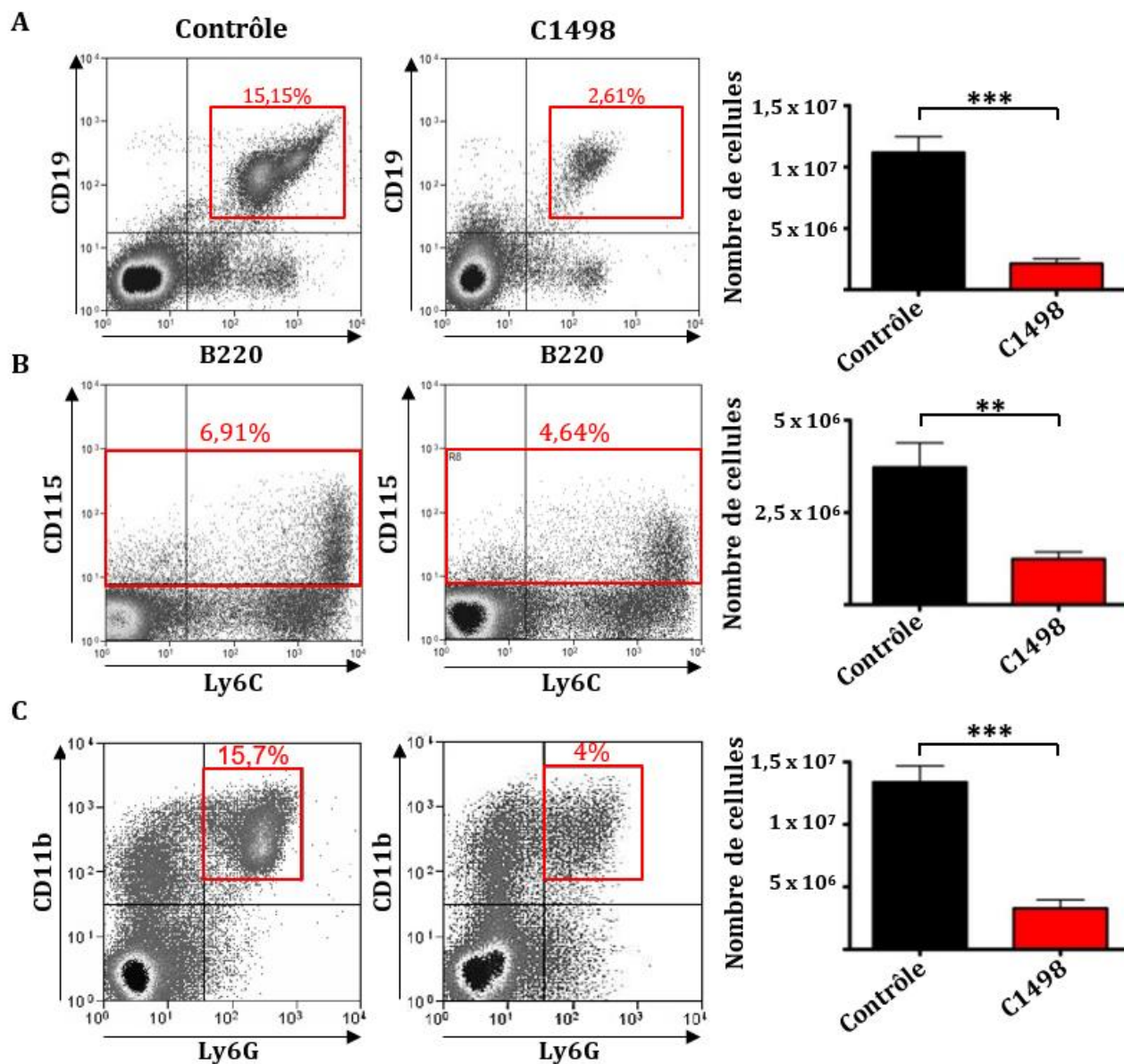


FIGURE 29 - POPULATIONS DE LA MOELLE OSSEUSE DES SOURIS CONTRÔLES ET LEUCÉMIQUES.

Une lyse des globules rouges a été réalisée sur la moelle osseuse isolée des souris contrôles (n=7) et leucémiques (n=7) avant d'effectuer un comptage cellulaire et l'immunomarquage permettant d'évaluer la fréquence des différentes populations myéloïdes et lymphoïdes. (A) La lignée lymphocytaire B a été évaluée après un marquage avec les anticorps dirigés contre le CD19 et B220. Les cellules doubles positives encadrées en rouge représentent la lignée lymphocytaire B (regroupant les stades de progéniteurs aux lymphocytes B matures). (B) La lignée monocyttaire a été détectée sur les critères CD3⁻ et CD115⁺ (population encadrée en rouge) et regroupe les monocytes du stade de progéniteurs aux cellules matures. (C) Enfin, la lignée granulocytaire a été sélectionnée sur son absence d'expression du CD3 et son expression des marqueurs CD11b et Ly6G (encadré en rouge). Pour chaque lignée, un histogramme présente l'estimation moyenne de ces populations dans la population globale de la moelle osseuse dénombrée au préalable. Un test t de Student non-apparié a été réalisé pour évaluer la significativité des différences observées entre les souris contrôles et leucémiques avec ** correspondant à une valeur $p < 0,01$ et *** à une valeur $p < 0,0001$.

b. Effets de la leucémie sur les population spléniques des souris

Le second organe hématopoïétique touché par l'infiltration des cellules C1498 est la rate. En effet, on observe chez les souris leucémiques une splénomégalie (Figure 30A) avec un poids moyen de $300 \pm 44,0$ mg comparé aux rates des souris contrôles pesant en moyenne $113,6 \pm 1,0$ mg. Cette splénomégalie est nettement visible au moment du prélèvement de l'organe.

Le dénombrement des splénocytes a montré une augmentation de la cellularité splénique dans les souris leucémiques ($191,4 \times 10^6 \pm 28,6$) par rapport aux rates des souris contrôles ($120,2 \times 10^6 \pm 18,2$). De plus, le phénotypage de ces splénocytes a montré une augmentation de différentes populations cellulaires telles que les lymphocytes B, les monocytes et les granulocytes contribuant à l'élargissement de l'organe (Figure 30B).

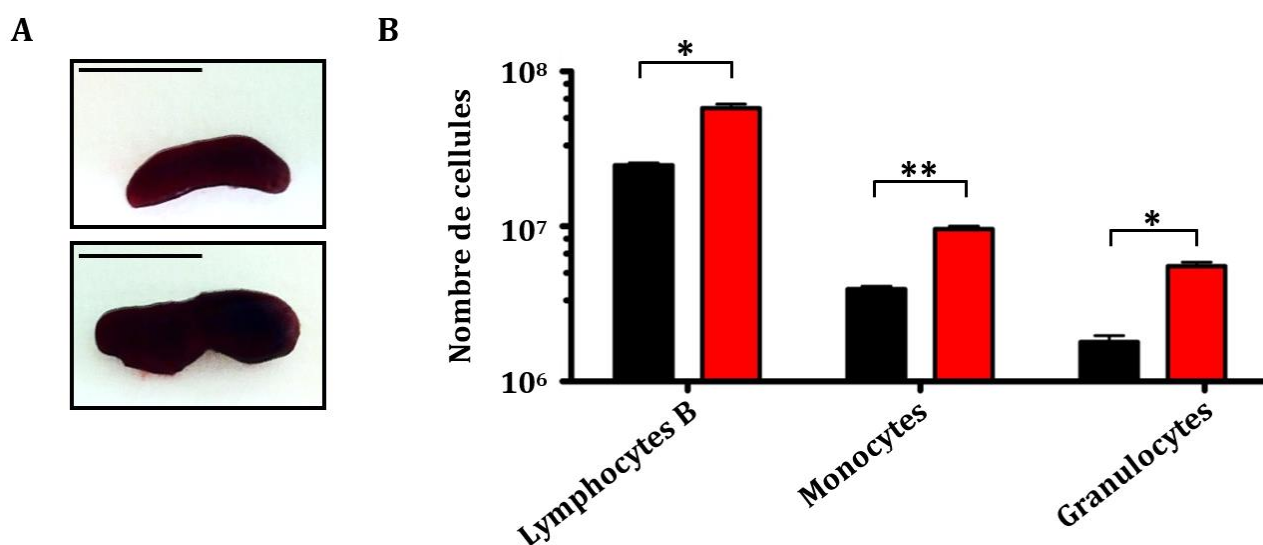


FIGURE 30 - LA LEUCEMIE ENTRAINE UNE SPLENOMEGALIE ET UNE AUGMENTATION DU NOMBRE DE PLUSIEURS POPULATIONS SPLENIQUES. (A) La rate d'une souris contrôle (haut) et d'une souris leucémique (bas) représentatives de l'ensemble des souris prélevées sont présentées. La barre d'échelle correspond à une dimension de 1 cm. (B) Une lyse des globules rouges a été réalisée avant une numération des splénocytes puis un immunomarquage des lymphocytes B (CD19⁺B220⁺), des monocytes (CD3-CD11b+Ly6C^{+/-}) et des granulocytes (CD3-CD11b+Ly6G⁺). Les histogrammes représentent la moyenne et les écart-types des quantifications des populations spléniques de 5 souris contrôles et de 8 souris leucémiques. Un test t de Student non-apparié a été réalisé pour évaluer la significativité des différences observées entre les souris contrôles et leucémiques avec * correspondant à une valeur $p < 0,05$ et ** pour une valeur p de 0,0033.

c. Impact de la leucémie sur la composition cellulaire sanguine

Lors du développement leucémique, un envahissement de la circulation sanguine est observé chez les patients atteints de LAM ainsi qu'une diminution des populations sanguines saines. C'est pourquoi, nous avons analysé la proportion des populations sanguines circulantes chez les souris leucémiques.

L'envahissement de la circulation sanguine par les cellules C1498 a été observée par cytométrie en flux à l'aide du marqueur CD45.2, avec une infiltration moyenne de 15% mais avec une variabilité importante entre les souris (1,34 à 57,48%) (Figure 28, p-108-).

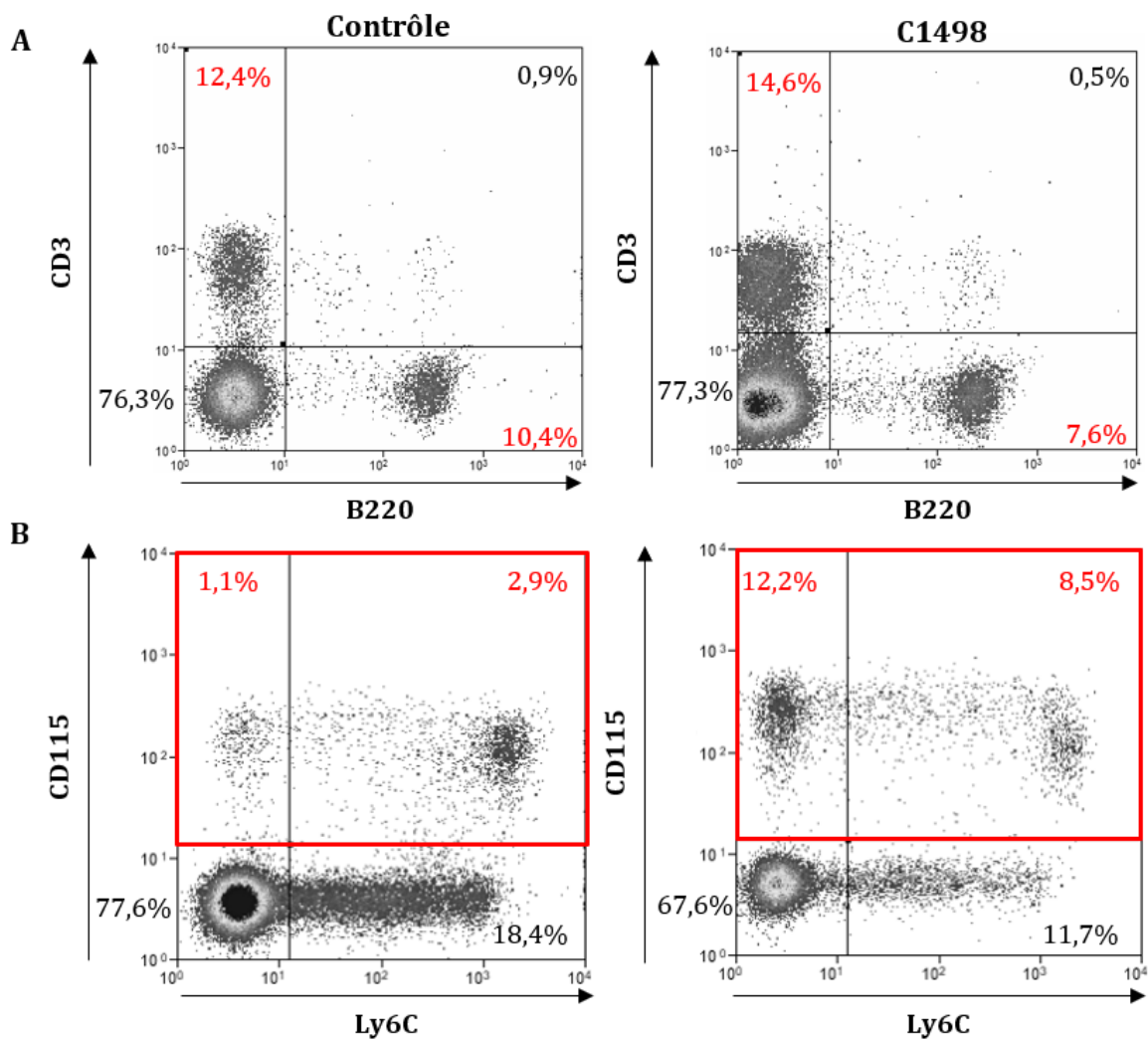


FIGURE 31 - POPULATIONS CELLULAIRES CIRCULANTES CHEZ LES SOURIS CONTRÔLES ET LEUCÉMIQUES. Les cellules mononucléées du sang ont été isolées sur gradient de Pancoll puis marquées avec les anticorps dirigés contre le CD3 et le B220 pour identifier les lymphocytes T et B par cytométrie en flux (A). De même les monocytes ont été identifiés *via* l'expression des marqueurs CD115 et Ly6C (B). Cette analyse a été réalisée en excluant les cellules leucémiques de la lignée C1498 CD45.2⁺.

Les lymphocytes T et B circulants, respectivement, CD3⁺ et B220⁺ ne semblent pas impactés par la leucémie puisque nous n'avons pas observé de variations des proportions entre les souris contrôles et leucémiques (Figure 31A). Cependant, nous avons observé une augmentation de la proportion des monocytes circulants dans les souris leucémiques. La leucémie induit donc une accumulation de monocytes dans le sang des souris, comme observé chez les patients atteints de LAM à composante monocyttaire (Figure 31B).⁹⁵

I. B. 3. MORPHOLOGIE ET CYTOCHIMIE DE LA MOELLE OSSEUSE DES SOURIS LEUCEMIQUES ET CONTROLES

Afin de déterminer l'infiltration médullaire ainsi que le type de leucémie induite par les cellules C1498, la MO des souris leucémiques a été prélevée avant que celles-ci ne succombent à la maladie parallèlement à celle des souris contrôles. Après avoir isolé et centrifugé les cellules sur lame, une coloration au MGG a été réalisée pour nous permettre d'apprécier l'aspect cellulaire de la moelle osseuse. Celle des souris saines présentent une grande variété cellulaire avec la présence des différentes lignées (myéloïde, lymphoïde et érythroïde) à différents stades de maturation (Figure 32A). La moelle osseuse des souris leucémiques conserve les différentes lignées cellulaires mais un envahissement par des cellules immatures (indiquées par les flèches noires) est observé correspondant à la morphologie de la lignée C1498 (Figure 32B).

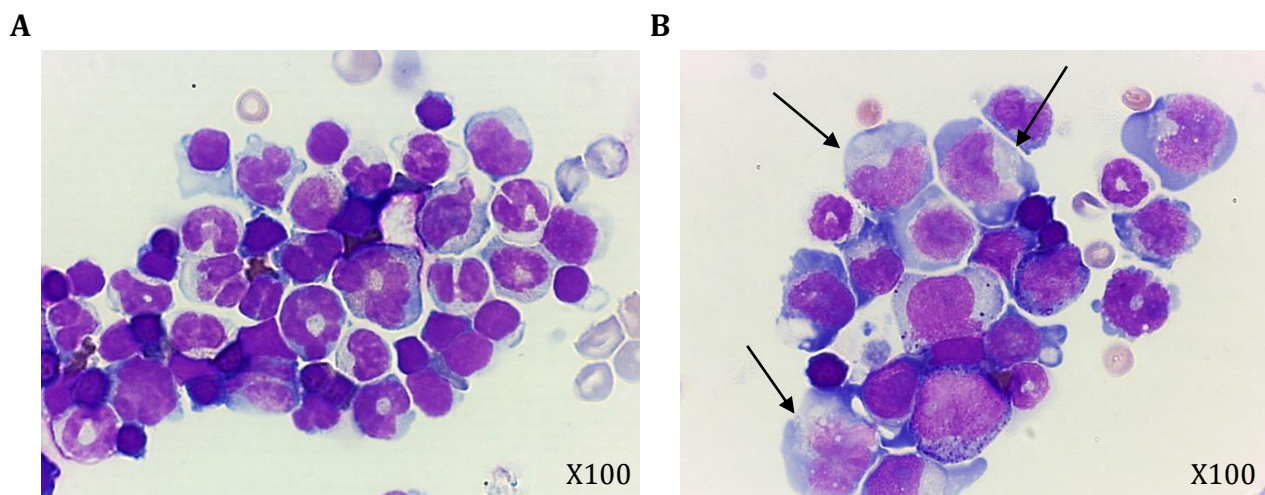


FIGURE 32 - CYTOMORPHOLOGIE DE LA MOELLE OSSEUSE DES SOURIS INJECTEES AVEC DU PBS OU AVEC LA LIGNEE C1498. A gauche est présentée une coloration MGG représentative de la moelle osseuse des souris contrôles. A droite, une moelle osseuse représentative des souris injectées avec la lignée C1498. Les flèches noires indiquent certaines cellules présentant la morphologie de la lignée C1498. Les cellules de moelle osseuse ont été déposées sur lame par cyto-centrifugation, colorées au MGG puis observées au microscope optique à l'objectif 100 (grossissement final $\times 1000$).

L'analyse cytochimique des estérases a également été réalisée sur la moelle osseuse des souris contrôles et infiltrées par les cellules C1498.

Dans la moelle osseuse des souris contrôles, on retrouve une faible proportion de cellules positives pour la réaction dégradant le naphthol AS-D-chloroacétate (Figure 33A). Pour ce qui est de la moelle osseuse infiltrée par les cellules leucémiques, plusieurs cellules volumineuses présentent de grosses granulations rouge-rosé témoignant de l'hydrolyse du naphthol AS-D chloroacétate (Figure 33B). Ces cellules appartiennent très certainement à la lignée leucémique C1498.

En ce qui concerne la réaction enzymatique dégradant l' α -naphthyl butyrate, on retrouve peu de cellules positives pour cette réaction dans la moelle osseuse contrôle tandis que de nombreuses cellules positives sont observées dans celle des souris injectées avec la lignée C1498 (Figure 33C et D).

Ces résultats confirment les caractéristiques enzymatiques de la lignée caractérisées *in vitro*, et indiquent qu'elles ne sont pas modifiées *in vivo*. Les cellules leucémiques ont bien conservées leur phénotype de myéloblastes et de monoblastes, suggérant une leucémie de type myélo-monocytaire.

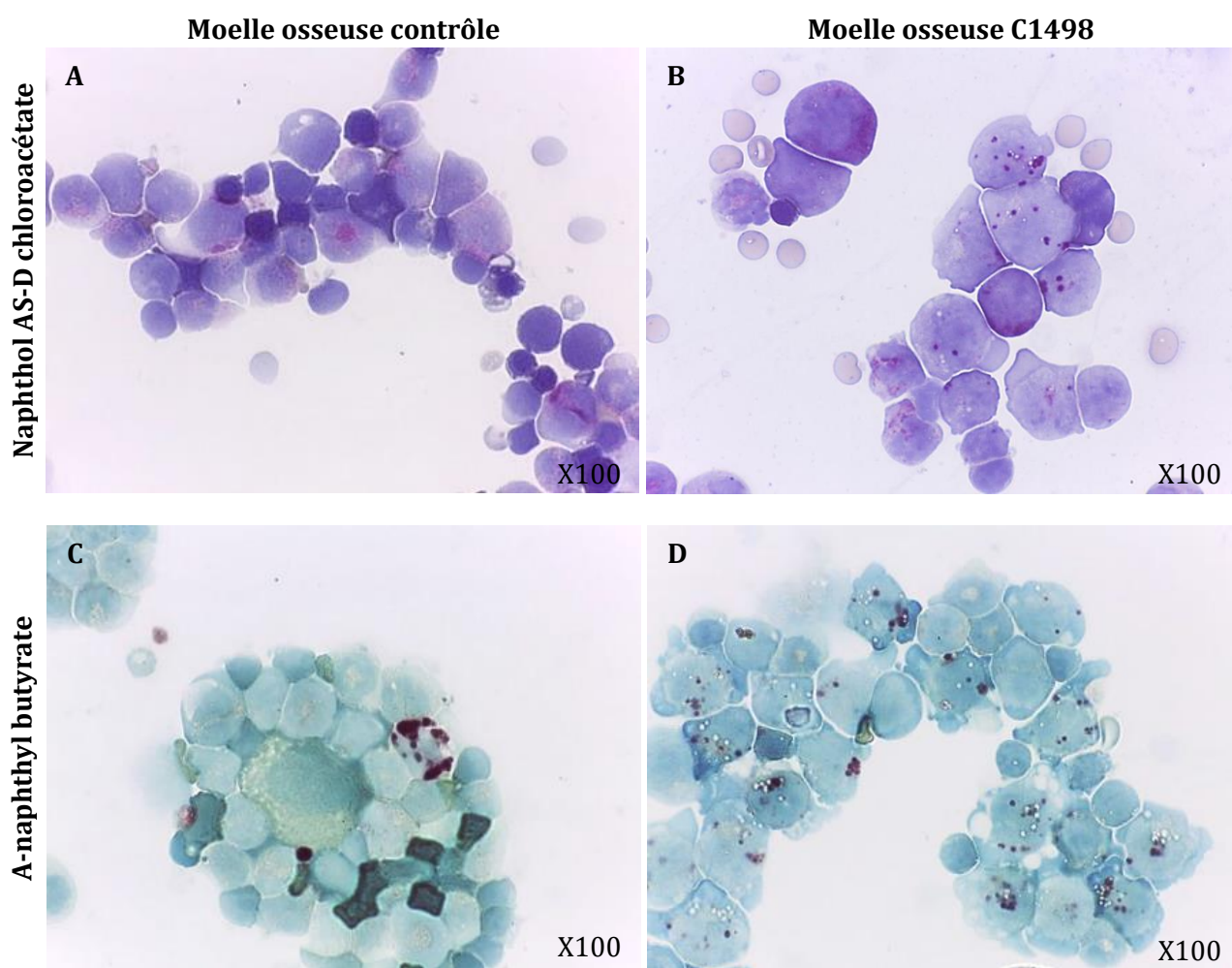


FIGURE 33 - PROFIL D'EXPRESSION DES ESTERASES DANS LA MOELLE OSSEUSE DES SOURIS SAINES ET INFILTREES PAR LES CELLULES C1498. Les cellules de moelle osseuse ont été isolées puis déposées sur lame par cytocentrifugation avant l'analyse cytochimique des estérases. Les marquages représentatifs des moelles osseuses contrôles sont présentées à gauche, et à droite se trouvent les marquages effectués sur les moelles osseuses de souris injectées avec la lignée C1498. On retrouve la réaction enzymatique du naphthol AS-D chloroacétate sur les images A et B et celle de l' α -naphthyl butyrate en C et D. Les lames ont été observées sur un microscope optique à l'objectif 100 (grossissement final $\times 1000$).

En résumé :

La lignée C1498 est composée d'un mélange de cellules myéloblastiques et monoblastiques qui, après injection par voie intraveineuse à des souris congéniques C57BL/6J, induit le développement d'une leucémie aiguë de type myélo-monocytaire.

Une infiltration des organes hématopoïétiques (rate et moelle osseuse) et des organes non-hématopoïétiques tels que les poumons et le foie par les cellules leucémiques C1498 est observée. De plus, des fréquences élevées de cellules C1498 circulantes et une monocytose sont également retrouvées dans le sang de ces souris leucémiques.

Une augmentation de volume du foie, des poumons et de la rate est détectable chez ces souris leucémiques. La moelle osseuse présente une diminution des populations granulocytaires, lymphocytaires B et monocytaires tandis que la rate de ces souris est caractérisée par une augmentation de ces différentes populations.

II. ISOLEMENT DE SOUS-CLONES LEUCEMIQUES HETEROGENES A PARTIR DE LA LIGNEE C1498

Nous nous sommes ensuite demandé si la lignée C1498, à l'image des patients atteints de LAM, n'était pas elle-même composée d'un ensemble de sous-clones.

Pour répondre à cette question, l'équipe a isolé 6 sous-clones leucémiques (dénommés B11, C5, E2, E7, F1 et G10) après dilution limite *in vitro* de la lignée C1498. Ces sous-clones ont été transfectés de manière stable avec un plasmide codant pour le gène de la *ZsGreen*, dont la traduction forme une protéine fluorescente facilitant ainsi la détection de ces cellules *in vivo*. Une comparaison génomique et phénotypique de ces sous-clones a été réalisée. Puis leurs potentiels leucémogènes et immunogènes ont été étudiés *in vivo* chez les souris.

II. A. CARACTERISATION GENOMIQUE DE LA LIGNEE ET DES SOUS-CLONES C1498

Une analyse par hybridation génomique comparative de l'ADN cellulaire de ces sous-clones ainsi que celui de la lignée C1498 a été réalisée. Des déséquilibres génomiques, c'est-à-dire la présence de délétions et d'amplifications au niveau du génome, ont été observés (Figure 34).

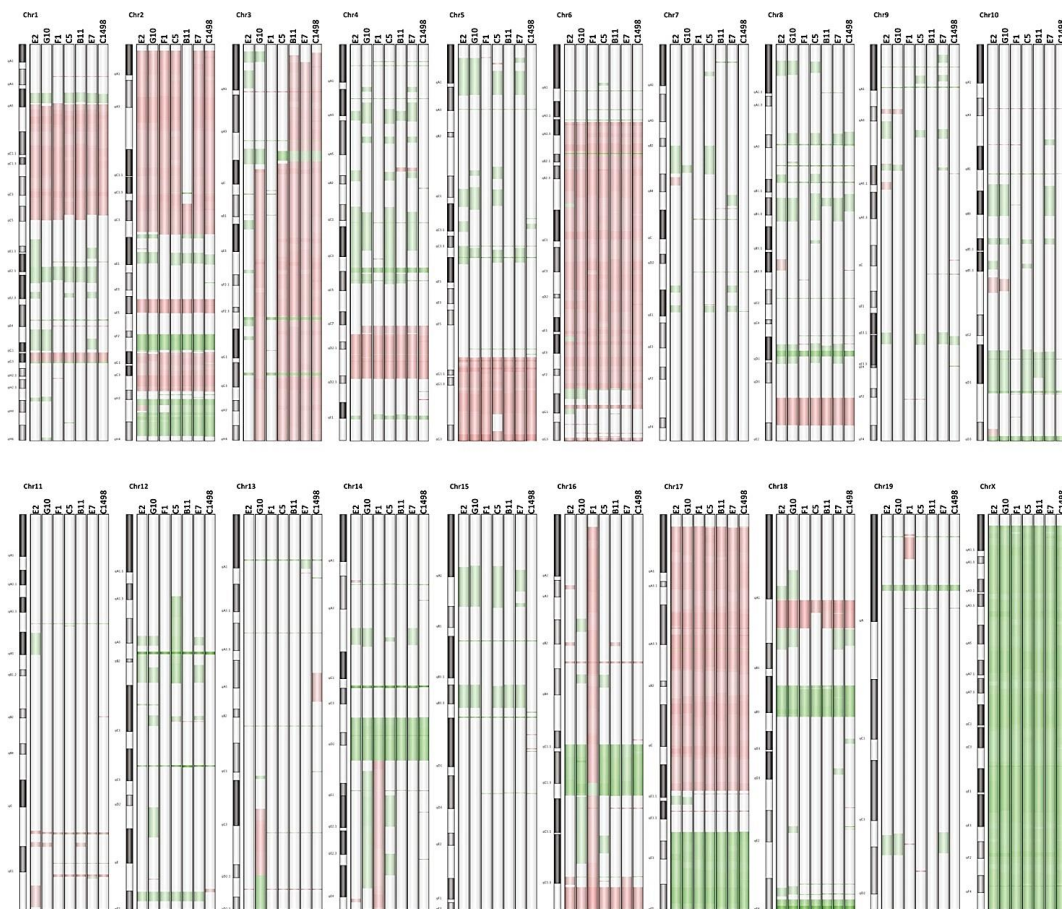


FIGURE 34 - PROFIL GENOMIQUE DE LA LIGNEE C1498 ET DES 6 SOUS-CLONES DERIVES DE CELLE-CI. Les ADN_g de la lignée C1498 et des 6 sous-clones isolées à partir de celle-ci (E2, G10, F1, C5, B11, E7).

B11, et E7) ont été extraits et analysés par la technique de CGH. Le profil génomique de cette lignée leucémique et des sous-clones est représenté pour chaque chromosome (Chr). Les parties génomiques représentées en rouge correspondent à des amplifications tandis que les parties vertes sont des délétions. L'intensité de la coloration est en corrélation avec le nombre de copies perdu ou gagné. L'expérience a été réalisée deux fois pour la lignée et les sous-clones C1498.

Une analyse plus précise a notamment révélé une délétion homozygote et hétérozygote au niveau du bras long du chromosome 12, plus précisément dans la région qC3 pour les sous-clones E2, F1, G10 et C5, B11, E7, respectivement (Figure 35).

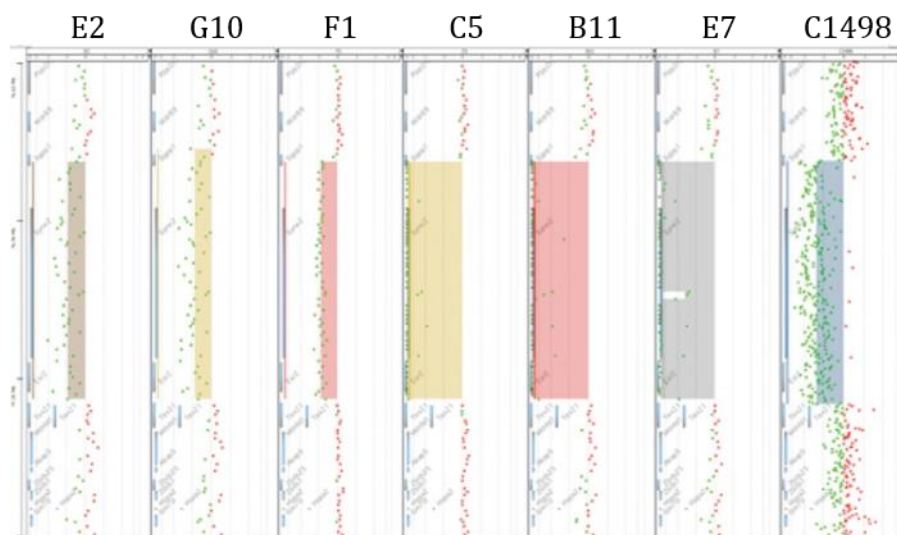


FIGURE 35 – PROFIL DÉTAILLÉ DE LA RÉGION QC3 DU CHROMOSOME 12 DE LA LIGNÉE C1498 ET DES SOUS-CLONES DÉRIVÉS DE CELLE-CI. Les surfaces plus larges correspondent à des délétions homozygotes (sous-clones C5, B11 et E7) tandis que les surfaces plus minces sont des délétions hétérozygotes (sous-clones E2, G10 et F1).

Cette analyse nous indique une hétérogénéité parmi les sous-clones avec des délétions ou des amplifications spécifiques à un ou plusieurs sous-clone(s).

II. B. CYTOMORPHOLOGIE ET CYTOCHIMIE DES SOUS-CLONES LEUCEMIQUES

Le phénotype de ces 6 sous-clones a été confirmé en réalisant une coloration au MGG et la cytochimie des estérases (CAE et ANBE). Ces analyses ont révélé un marquage positif pour les deux types de réactions enzymatiques (spécifique des lignées granulocytaire ou monocytaire) confirmant, comme pour la lignée C1498, un mélange de myéloblastes et de monoblastes. Prenant en compte la clonalité de ces cellules, ces résultats nous indiquent la présence de progéniteurs communs granulocytaire-monocytaire (GMP). Les marquages effectués sur les cellules des sous-clones E2 et C5 sont représentatifs des résultats obtenus pour l'ensemble des sous-clones (Figure 36). Ces sous-clones présentent donc un profil génomique différent mais un phénotype identique.

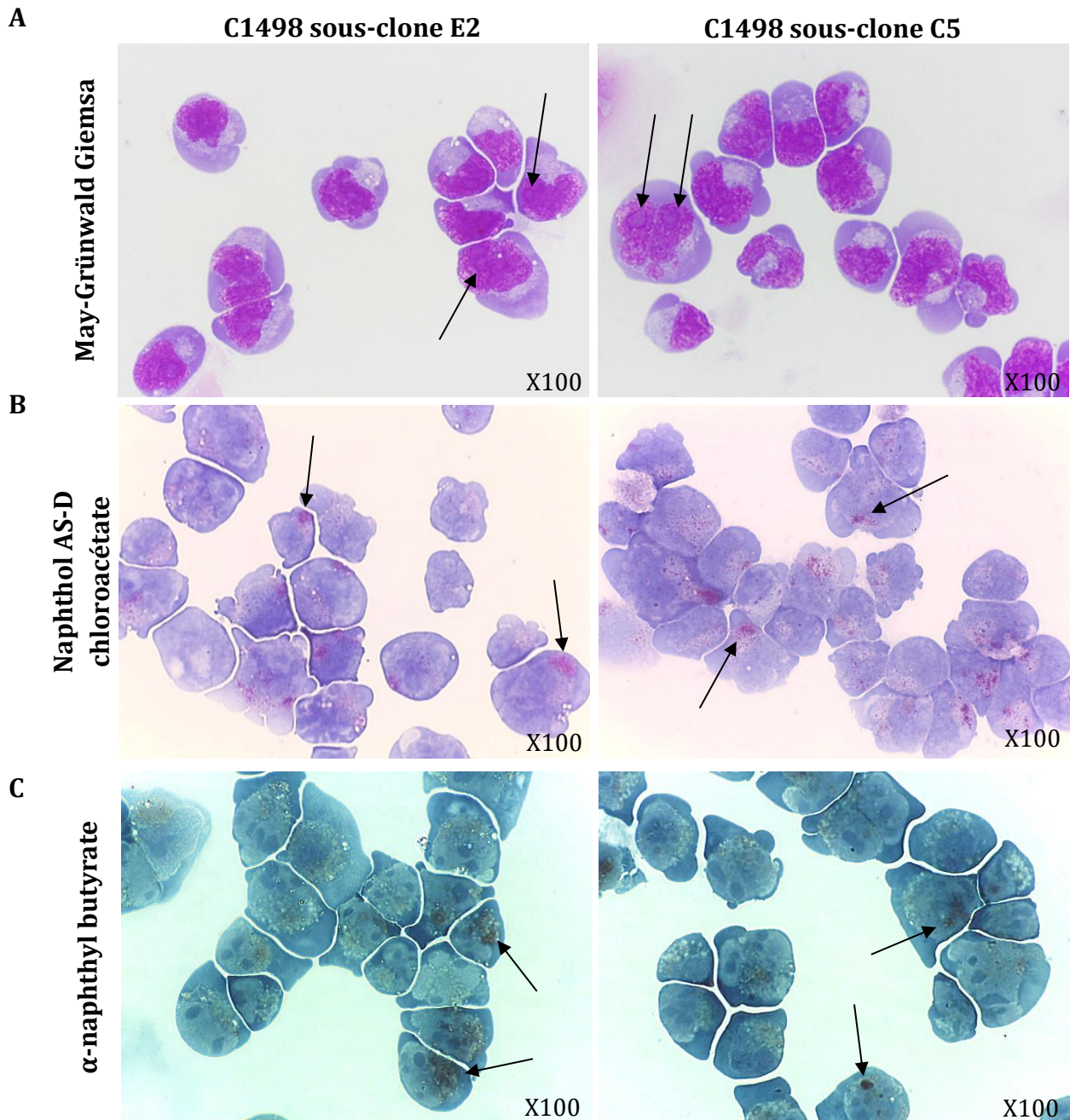


FIGURE 36 - CYTOMORPHOLOGIE ET CYTOCHIMIE DE 2 SOUS-CLONES ISOLÉS À PARTIR DE LA LIGNEE C1498. Résultats représentatifs du marquage MGG et de la cytochimie des estérases pour les sous-clones E2 (gauche) et C5 (droite). (A) Les cellules ont été cytocentrifugées et colorées au MGG. Les nucléoles sont indiqués par les flèches. (B) Une analyse cytochimique des estérases a été réalisée détectant la capacité d'hydrolyse de l'AS-D chloroacétate et (C) de l'alpha naphthyl butyrate par les cellules. Les flèches indiquent des réactions positives pour les deux types d'estérases. Les lames ont été observées au microscope optique à l'objectif 100 (grossissement final $\times 1000$).

II. C. LEUCEMOGENICITE VARIABLE SELON LES SOUS-CLONES

II. C. 1. DEVELOPPEMENT LEUCEMIQUE DANS DES SOURIS IMMUNOCOMPÉTENTES

Une injection de chaque sous-clone par voie intrapéritonéale a été réalisée dans des souris immunocompétentes C57BL/6J afin d'évaluer leur potentiel leucémogène. Les sous-clones E2,

F1 et G10 ont induit la mort de la totalité des souris entre 21 et 36 jours post-injection des sous-clones tandis que les clones B11, C5 et E7 entraînent, respectivement, la mort de 60, 48 et 30% des souris injectées (Figure 37A et 37B).

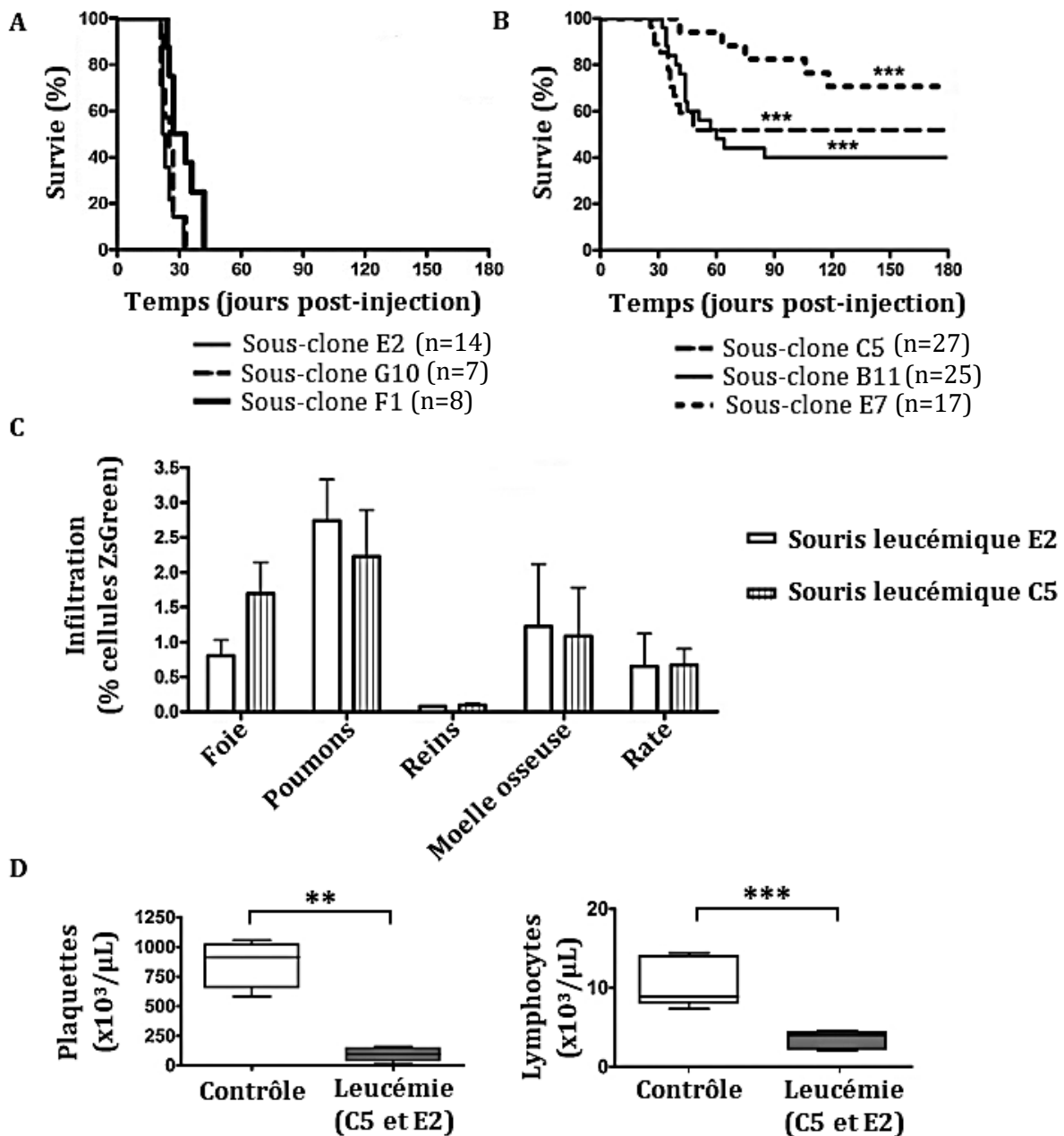


FIGURE 37 - INJECTION INTRAPERITONEALE DES DIFFERENTS SOUS-CLONES N'INDUIT PAS LE MEME TAUX DE MORTALITE CHEZ LES SOURIS C57BL/6J. L'injection des 6 sous-clones par voie intrapéritonéale à des souris immunocompétentes C57BL/6J a entraîné le développement leucémique chez certaines d'entre-elles. La survie de ces souris a été suivie après l'injection des sous-clones E2, F1 ou G10 (A) et après l'injection des sous-clones B11, C5 ou E7 (B). Une analyse statistique (Logrank) comparant la survie des souris injectées avec le sous-clone B11, C5 ou E7 au groupe de souris ayant reçu le sous-clone E2 a été réalisée et a montré une différence significative (***, $p < 0,0001$). (C) La présence des cellules leucémiques a été évaluée par cytométrie en flux dans les organes des souris succombant à la leucémie induite par les sous-clone C5 ou E2 *via* l'expression de la protéine ZsGreen. (D) Le nombre de lymphocytes et de plaquettes circulants a été déterminée grâce à un hémocytomètre chez 13 souris injectées avec ces deux sous-clones (C5 ou E2) ou chez des souris du même âge injectées avec du PBS

(contrôles). Un test de Mann-Whitney a permis de mettre en évidence une différence significative entre les souris contrôles et leucémiques (**, $p=0,0023$ et ***, $p=0,0005$).

Les souris survivantes ont été suivies durant 6 mois et celles-ci n'ont pas présenté de signes de la leucémie ou de toute autre pathologie. Au contraire, les souris ayant succombé à l'injection des sous-clones ont développé une leucémie qui fut confirmée par la présence de cellules leucémiques dans plusieurs organes (MO, rate, reins, poumons et foie) (Figure 37C), accompagnée d'une thrombopénie et d'une lymphopénie (Figure 37D).

II. C. 2. DEVELOPPEMENT LEUCEMIQUE DANS DES SOURIS IMMUNO- DEFICIENTES

Le développement leucémique a ensuite été testé *via* l'injection de ces sous-clones par voie intrapéritonéale dans des souris immunodéficientes NOD-SCID.

Contrairement aux résultats obtenus dans les souris syngéniques C57BL/6J, les sous-clones B11, C5 et E7 ont induit le développement d'une leucémie avec une mortalité chez 100% des souris NOD-SCID entre 19 et 56 jours post-injection des cellules leucémiques. De même, les sous-clones E2, F1 et G10 ont entraîné la mort de la totalité des souris, mais ceci plus rapidement que les trois précédents sous-clones (entre 18 et 28 jours post-injection des cellules leucémiques) (Figure 38A). Les organes de ces souris ont été analysés afin d'évaluer le pourcentage de cellules leucémiques les infiltrant. Aucune différence notable n'a été observée entre ceux des souris injectées avec les sous-clones E2, F1, G10 ou les sous-clones B11, C5 et E7 (Figure 38B).

Ces résultats indiquent donc que l'ensemble des sous-clones entraîne le développement d'une leucémie et présentent un potentiel leucémogène, dont les sous-clones B11, C5 et E7 entraînent un développement leucémique plus lent *in vivo*. De plus, ces trois derniers sous-clones induisent une mortalité de 100% uniquement dans les souris immunodéficientes. Cela suggère un contrôle possible par le système immunitaire du développement de la leucémie induite par ces sous-clones dans les souris immunocompétentes C57BL/6J.

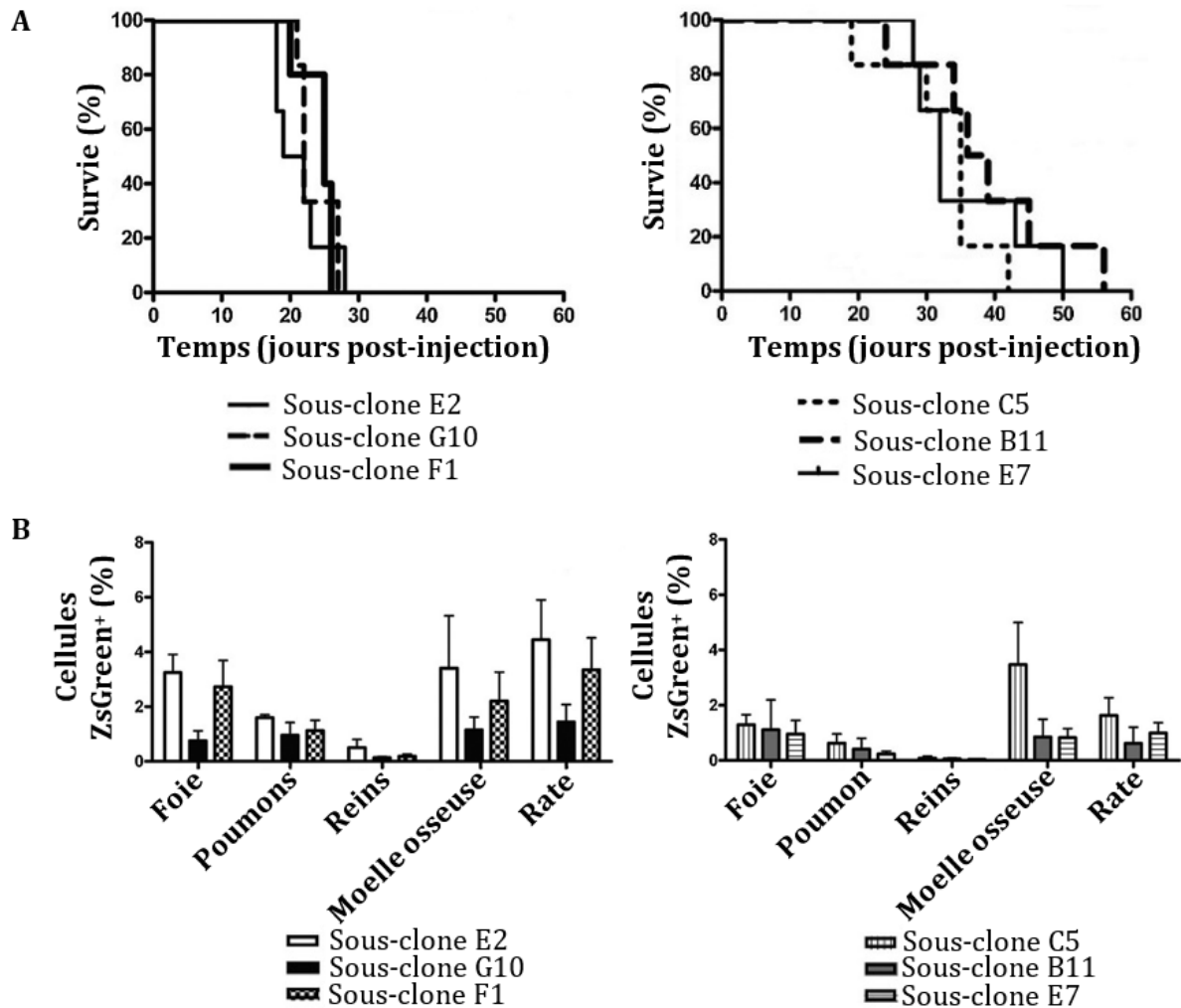


FIGURE 38 – VARIATION DE LA SURVIE DES SOURIS IMMUNODEFICIENTES NOD-SCID SELON LE SOUS-CLONE INJECTE MAIS N'INFLUENÇANT PAS L'INFILTRATION LEUCEMIQUE DES ORGANES. (A) La survie des souris immuno-déficientes NOD-SCID injectées avec les différents sous-clones a été suivie. Les différents sous-clones ont été injectés par voie intrapéritonéale à 6 souris. Une analyse statistique (Logrank) comparant la survie des souris injectées avec le sous-clone E2 avec celles ayant été injectées avec les sous-clones B11, C5 ou E7 ($p=0,001$, $p=0,0034$ et $p=0,0008$, respectivement) a été réalisée. (B) L'infiltration des organes de ces souris par les cellules leucémiques a été déterminée par cytométrie en flux en détectant l'expression de la ZsGreen.

II. C. 3. REPOSE CYTOTOXIQUE SPECIFIQUE DE LA LEUCEMIE ET IMMUNISATION DES SOURIS C57BL/6J

Afin de mieux comprendre le rôle du système immunitaire dans la survie de ces souris, nous avons quantifié les lymphocytes T spléniques chez les souris succombant ou survivant à la leucémie induite suite à l'injection du sous-clone C5.

Ainsi, une analyse par cytométrie en flux nous a permis de constater une forte diminution des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ induite par le développement de la leucémie. Cette déplétion est environ 2 fois moins importante dans les souris qui survivent à la leucémie (Figure 39A).

L'activité cytotoxique spécifique des lymphocytes T des souris survivantes à la leucémie induite par le sous-clone C5 a été mise en évidence après stimulation *in vitro*. Nous avons observé une réponse cytotoxique spécifique du sous-clone C5 (résultat non présenté) mais également dirigée contre la lignée totale C1498. De plus, aucune réactivité n'a été observée contre une autre lignée cellulaire de lymphome EL4 (Figure 39B).

Nous avons ensuite voulu savoir si les souris survivantes à la première leucémie étaient capables de survivre à une seconde injection du même sous-clone (C5) ou de faire face à la leucémie induite par un sous-clone différent (E2). Cette expérience a montré que les souris survivantes étaient protégées contre la leucémie induite par l'injection du même sous-clone ou d'un sous-clone plus agressif E2 (Figure 39C).

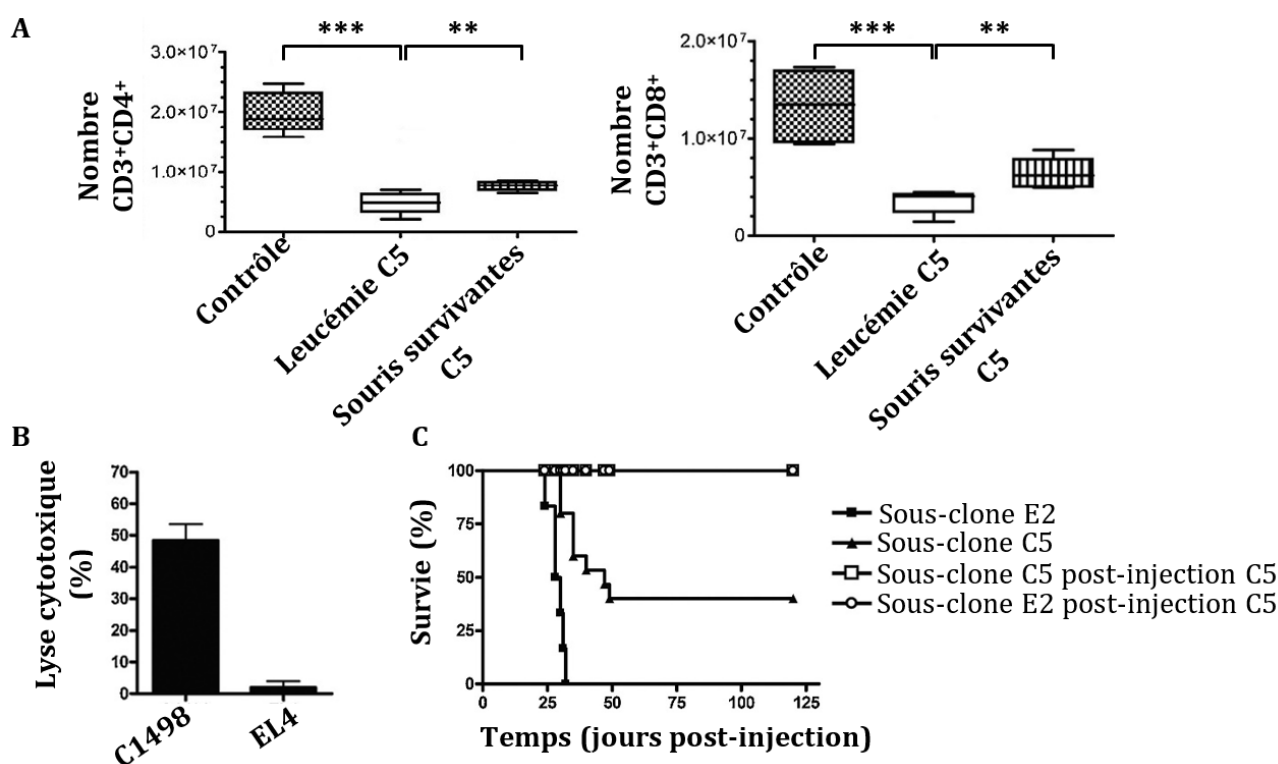


FIGURE 39 - INDUCTION D'UNE REPOSE LYMPHOCYTAIRE T DANS LES SOURIS LEUCEMIQUES INJECTEES AVEC LE SOUS-CLONE C5 CAPABLE D'INHIBER LA LEUCEMIE. (A) Une quantification des lymphocytes T CD3+ (CD4+ et CD8+) de la rate des souris contrôles (injection PBS) (n=6), leucémiques (n=7) et survivantes à l'injection du sous-clone C5 (n=6) a été réalisée par immunomarquage et analysé par cytométrie en flux. Un test t de Student a évalué une différence entre le nombre de lymphocytes T des souris contrôles et leucémiques avec une valeur $p < 0,0001$ symbolisée par *** pour les lymphocytes T totaux, $p = 0,0056$ (**) pour les T CD4+ et $p = 0,0037$ (**) pour les T CD8+. (B) La réponse cytotoxique des lymphocytes T spléniques isolés de 6 souris survivantes à l'injection du sous-clone C5 a été évaluée après amplification *in vitro* et mises en culture avec la lignée C1498 ou EL4 marquées au CFSE au ratio 5 : 1 pendant 4h. (C) La survie des souris injectées par voie intrapéritonéale avec le sous-clone E2 ou C5 ainsi que les souris survivantes au premier challenge avec l'un ou l'autre de ces deux sous-clones et ayant été injectées une seconde fois avec le sous-clone C5 a été suivie.

En résumé :

Six sous-clones ont été isolés à partir de la lignée leucémique murine C1498 et présentent une hétérogénéité clonale. Celle-ci existe d'un point de vue génomique puisque l'analyse par CGH a montré des profils différents selon les sous-clones (dénommés B11, C5, E2, E7, F1 et G10).

De plus, les sous-clones B11, C5 et E7 induisent une cinétique de développement de la leucémie plus lente que les clones E2, F1 et G10 dans des souris immunodéficientes (NOD-SCID). Les sous-clones B11, C5 et E7 induisent une survie partielle des souris immunocompétentes C57BL/6J contrairement aux sous-clones E2, F1 et G10.

Cela suggère un rôle de la réponse immunitaire dans le contrôle du développement de la leucémie induite par ces sous-clones. En effet, les souris leucémiques ayant succombées à la leucémie présentent une diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ qui apparaît moins importante dans les souris survivantes à l'injection du sous-clone C5.

De plus, ces souris survivantes développent une réponse lymphocytaire T cytotoxique spécifique du sous-clone C5, et également capable d'éliminer les cellules C1498. Les souris survivantes à l'injection du sous-clone C5 sont ainsi immunisées contre le développement leucémique déclenché par l'injection du même sous-clone ou d'un sous-clone différent (E2).

III. OPTIMISATION D'UN MODELE DE MRD LEUCEMIQUE APRES INJECTION INTRA VEINEUSE DES CELLULES LEUCEMIQUES ET SUIVI PAR CYTOMETRIE EN FLUX ET RT-PCR DES CELLULES RESIDUELLES

III. A. SENSIBILITE DE LA LIGNEE C1498 ET DES DIFFERENTS SOUS-CLONES A LA CYTARABINE

Afin de développer le modèle de maladie résiduelle mesurable, nous avons au préalable évalué la sensibilité de la lignée leucémique et des 6 sous-clones à la cytarabine. Ce traitement est utilisé couramment chez les patients atteints de LAM lors du traitement d'induction en association avec une anthracycline. Les anthracyclines sont des chimiothérapies qui induisent une nécrose tissulaire en cas d'extravasation du traitement.³²⁹ Pour cette raison, nous avons uniquement traité les souris leucémiques avec la cytarabine.

Les différents sous-clones et la lignée leucémique ont été mis en culture *in vitro* en présence de plusieurs concentrations de chimiothérapie durant 72h. La concentration de chimiothérapie induisant la mort de 50% des cellules (IC50) a ensuite été déterminée.

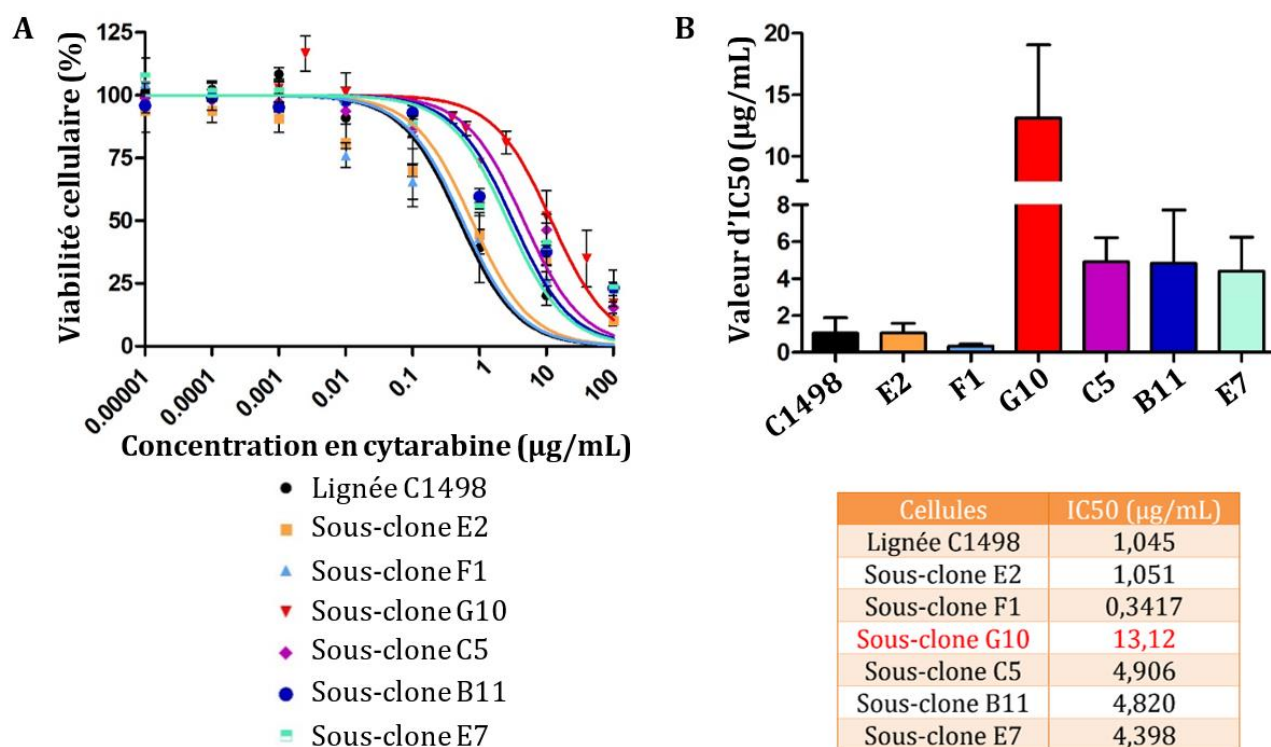


FIGURE 40 - ANALYSE DE LA SENSIBILITE DE LA LIGNEE C1498 ET DES SOUS-CLONES A LA CYTARABINE MONTRANT UNE RESISTANCE PLUS IMPORTANTE DU SOUS-CLONE G10. Les cellules ont été mises en culture avec des concentrations croissantes de chimiothérapie (cytarabine) pendant 72h. (A) Une quantification des cellules vivantes en fonction de la concentration en cytarabine a été réalisée et la concentration induisant la mort de 50% des cellules (IC50) a été calculée. (B) Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs d'IC50 calculées sur 3 expériences indépendantes réalisées en triplicats pour la lignée C1498 et pour chaque sous-clone.

Nous avons observé une sensibilité moindre du sous-clone G10 à la cytarabine avec une moyenne d'IC50 de 13,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les sous-clones B11, C5 et E7 présentent un IC50 compris entre 4 et 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et la lignée C1498 ainsi que les sous-clones E2 et F1 sont les plus sensibles à la cytarabine avec un IC50 compris entre 0,1 et 1,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 40).

Ainsi, nous avons pris la décision de ne pas utiliser le sous-clone G10 pour la mise au point de notre modèle murin de MRD leucémique, puisque celui-ci s'est révélé le plus résistant à la chimiothérapie *in vitro*.

III. B. EXPRESSION STABLE DE LA *ZsGreen* PAR LES DIFFERENTS SOUS-CLONES C1498 SENSIBLES A LA CYTARABINE

Ces sous-clones sensibles au traitement par chimiothérapie *in vitro* expriment de manière stable la protéine fluorescente *ZsGreen* permettant leur détection par cytométrie en flux.

Nous avons évalué l'expression de ce gène en vue d'une utilisation lors de la détection des cellules leucémiques *in vivo* par RT-qPCR. L'expression de ce gène *ZsGreen* est présentée en nombre de copies pour 10^4 copies du gène *Abl1*. Cette analyse révèle une expression dépassant les 20000 copies *ZsGreen*/ 10^4 copies *Abl1* pour les sous-clones E2 et C5. Les sous-clones F1 et E7 expriment ce gène de manière intermédiaire avec une valeur moyenne approchant les 15000 copies *ZsGreen*/ 10^4 copies *Abl1*. Enfin le sous-clone B11 exprime plus faiblement la *ZsGreen* avec une expression moyenne inférieure à 10000 copies *ZsGreen*/ 10^4 copies *Abl1* (Figure 41).

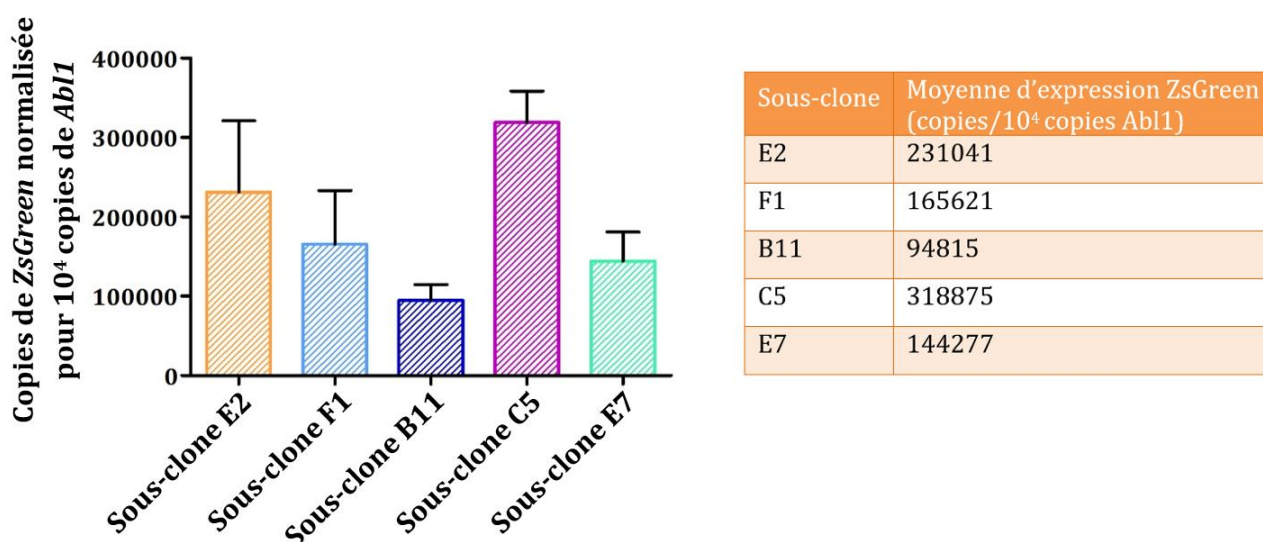


FIGURE 41 - EXPRESSION DU GENE *ZsGreen* PAR LES DIFFERENTS SOUS-CLONES LEUCEMIQUES. L'expression du gène *ZsGreen* a été analysée par RT-qPCR et celle-ci est présentée en nombre de copies du gène normalisée pour 10^4 copies du gène *Abl1*. Cette analyse a été réalisée sur les 5 sous-clones leucémiques en parallèle de la réalisation d'une gamme plasmidique codant le gène *Abl1* pour permettre

la normalisation. Les histogrammes représentent la moyenne (valeur figurant dans le tableau adjacent) et les écarts-types (SEM) de 3 expériences indépendantes.

III. C. EXPRESSION STABLE DE WT1 PAR LES DIFFERENTS SOUS-CLONES C1498 SENSIBLES A LA CYTARABINE

Une expression faible de *Wt1* a été détectée dans les 5 sous-clones B11, C5, E2, E7 et F1. Ils ont donc été transfectés par électroporation avec le plasmide pVtro1.1.WT1 permettant l'expression du gène *Wt1* ainsi qu'une résistance à la néomycine. Les sous-clones exprimant *Wt1* ont été sélectionnés en milieu contenant de la néomycine puis isolés par dilution limite. Ceux exprimant le mieux le gène *Wt1* ont été conservés et dénommés ainsi : nom du sous-clone/WT1 (ex : B11/WT1) pour une meilleure compréhension.

La stabilité d'expression du gène *Wt1* des différents sous-clones a été confirmée par RT-qPCR au cours des deux mois qui ont suivi l'électroporation. De même que l'expression du gène *ZsGreen*, celle de *Wt1* est exprimée en nombre de copies normalisé pour 10^4 copies du gène *Abl1*. Cette analyse a révélé une expression proche des 40000 copies du gène *Wt1* pour 10^4 copies *Abl1* des sous-clones E2/WT1 et F1/WT1 tandis que les 3 autres sous-clones expriment plus faiblement ce gène. En effet, le sous-clone B11/WT1 expriment en moyenne 4000 copies de *Wt1*/ 10^4 copies *Abl1* (Figure 42).

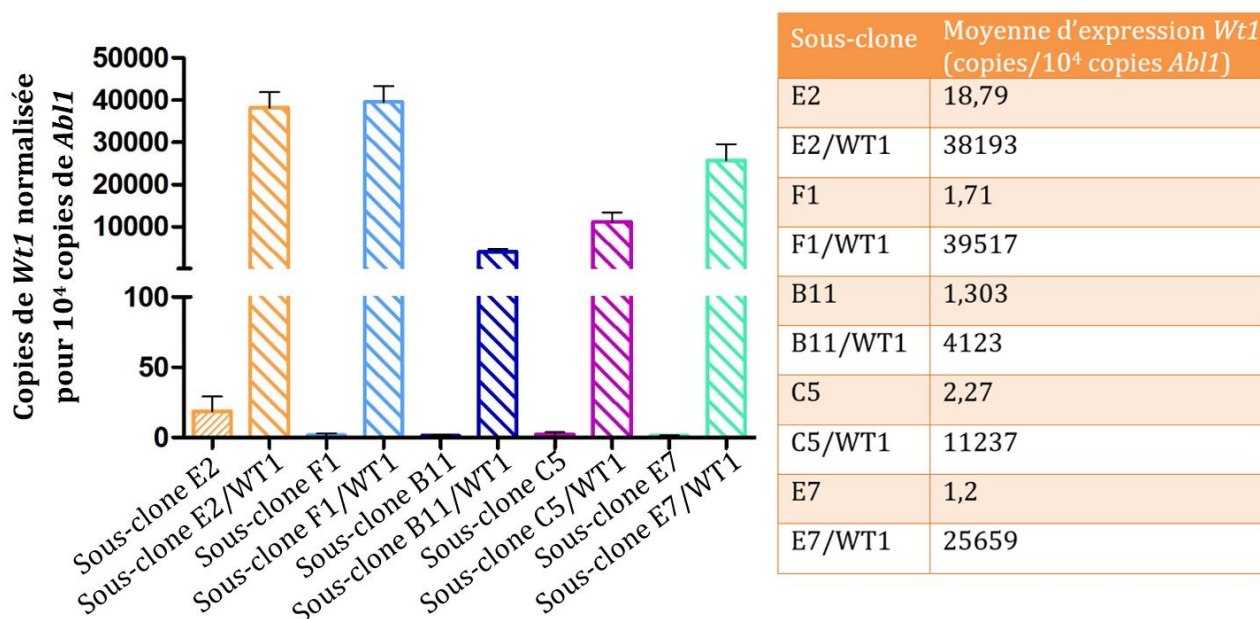


FIGURE 42 - EXPRESSION DU GENE WT1 PAR LES SOUS-CLONES LEUCEMIQUES TRANSFECTES OU NON AVEC LE PLASMIDE PVITRO1.1.WT1. L'expression du gène *Wt1* a été analysée par RT-qPCR et exprimée en nombre de copies du gène normalisée pour 10^4 copies du gène *Abl1*. Cette analyse d'expression a été réalisée sur les sous-clones transfectés ou non avec le plasmide pVtro1.1.WT1 en parallèle de la réalisation d'une gamme plasmidique codant le gène *Abl1* pour permettre la normalisation. Les histogrammes représentent la moyenne (valeur figurant dans le tableau adjacent) et les écarts-types de 3 à 12 expériences indépendantes selon les sous-clones.

L'expression du gène *Wt1* par ces différents sous-clones a été vérifiée au moment des décongelations cellulaires et avant chaque injection aux souris C57BL/6J. De plus, l'expression du gène *ZsGreen* a été vérifiée dans les sous-clones transfectés avec le plasmide pVITRO1.1.WT1 et est similaire aux sous-clones non transfectés (données non présentées).

Nous avons également confirmé l'expression de WT1 au niveau protéique par western-blot. Comme observé au niveau de l'expression du gène *Wt1* dans les sous-clones non transfectés, l'expression de WT1 dans ces sous-clones est très faible. La surexpression de la protéine WT1 est retrouvée dans l'ensemble des sous-clones transfectés stablement avec le plasmide pVITRO1.1.WT1. Nous avons observé la présence de deux bandes rapprochées correspondant aux isoformes majoritaires de WT1 de 52 et 54 kilodaltons (kDa). De plus, l'isoforme de 54 kDa semble plus exprimée que celle de 52 kDa dans tous les sous-clones transfectés stablement. Enfin, une bande supplémentaire approchant la taille moléculaire de 40 kDa est observable pour le sous-clone E7/WT1 et peut correspondre à l'isoforme AWT1 produite à partir d'un site d'initiation de la traduction alternatif et dont la protéine fait approximativement 36 kDa (Figure 43).¹⁶²

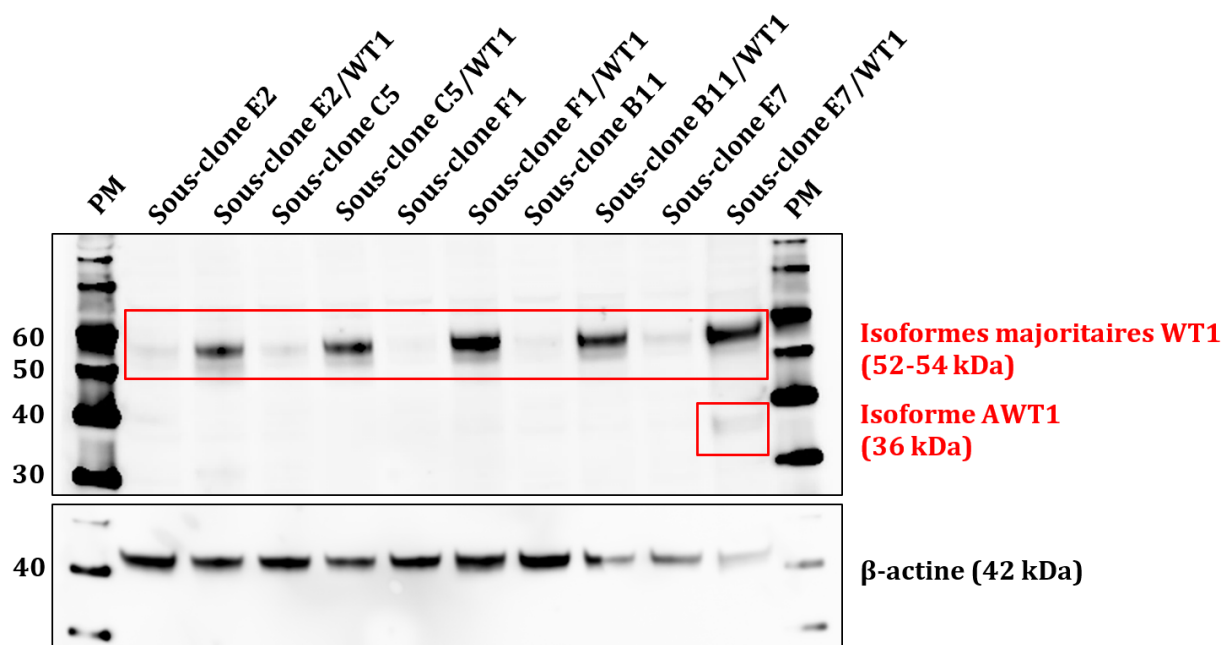


FIGURE 43 - EXPRESSION DE LA PROTEINE WT1 DANS LES DIFFERENTS SOUS-CLONES TRANSFECTES OU NON AVEC LE PLASMIDE PVITRO1.1.WT1. Une extraction des protéines totales a été réalisée à partir des différents sous-clones en culture. Une migration des protéines sur gel de polyacrylamide a été réalisée puis un marquage avec un anticorps primaire anti-WT1 et secondaire couplé à une peroxydase. Puis la réaction enzymatique a été révélée par chimioluminescence. Afin de s'assurer d'une extraction protéique homogène pour tous les sous-clones, la β -actine a également été détectée. PM : marqueur de poids moléculaire avec les tailles en kilodaltons annotées à gauche des gels. Les encadrés rouges présentent les bandes correspondant aux isoformes de WT1 et AWT1 pour le sous-clone E7/WT1.

Le plasmide pVitro1.1.WT1 permet l'expression de la protéine WT1 avec dans sa partie C-terminale la présence d'une séquence étiquette Myc-Tag pouvant être ciblée par des anticorps spécifiques.

Après immunomarquage fluorescent des sous-clones transfectés stablement ou non avec le plasmide, on observe une expression de la protéine WT1 visualisable uniquement dans les sous-clones transfectés par la fluorescence rouge. Celle-ci se co-localise avec la coloration de Hoechst des acides nucléiques confirmant sa localisation nucléaire en adéquation avec son rôle de facteur de transcription. De plus, on observe une localisation au niveau du cytoplasme dans certaines de ces cellules (Figure 44).

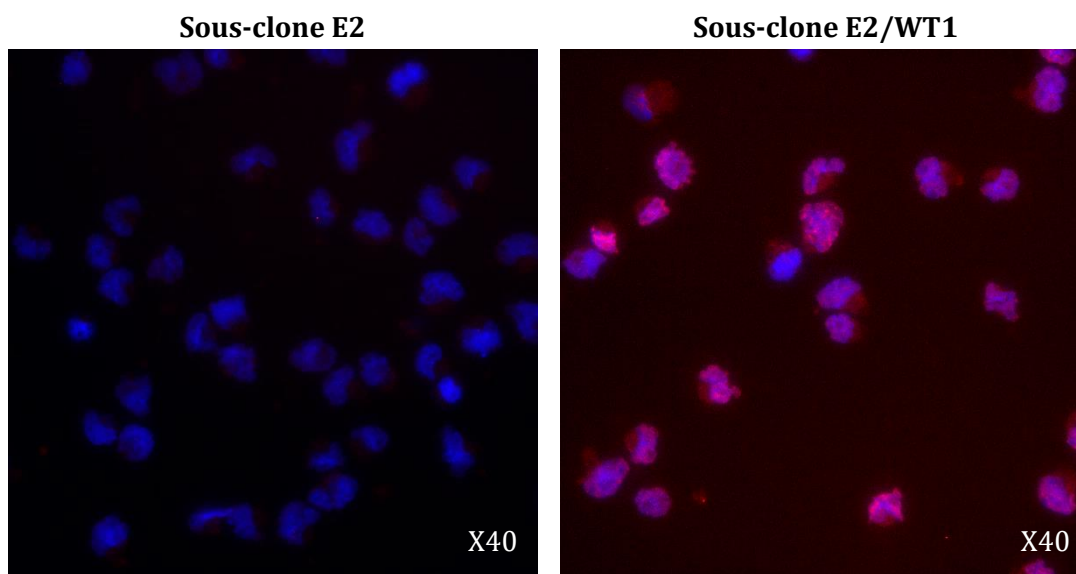
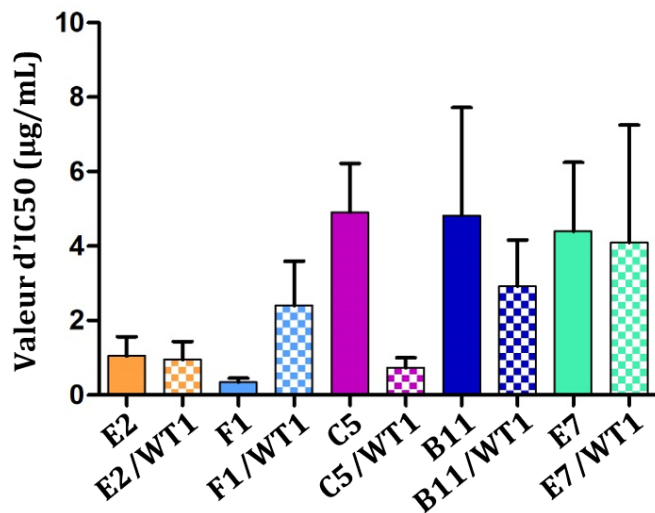


FIGURE 44- LOCALISATION NUCLEAIRE ET CYTOPLASMIQUE DE LA PROTEINE WT1 DANS LES SOUS-CLONES LEUCEMIQUES : EXEMPLE DU SOUS-CLONE E2 ET E2/WT1. Un immunomarquage fluorescent de la protéine WT1 surexprimée (fluorescence rouge) des différents sous-clones transfectés stablement ou non avec le plasmide pVitro1.1.WT1 a été réalisé avec un anticorps anti-Myc Tag. Les noyaux cellulaires sont visibles après coloration avec le réactif de Hoechst des acides nucléiques. L'observation des lames a été réalisée sur un microscope à fluorescence à l'objectif 40 (grossissement final $\times 400$).

Une vérification de la sensibilité à la cytarabine des sous-clones exprimant stablement le gène *Wt1* a été effectuée. Cette analyse a révélé une différence significative ($p=0,0357$) entre la sensibilité du sous-clone C5 et celle de C5/WT1. Le sous-clone exprimant stablement le gène *Wt1* étant plus sensible à la cytarabine. La transfection stable du gène *Wt1* des autres sous-clones n'a pas modifié leur sensibilité à la chimiothérapie (Figure 45).



Sous-clone	IC50 (µg/mL)
E2	1,051
E2/WT1	0,9561
F1	0,3417
F1/WT1	2,406
C5	4,906
C5/WT1	0,7365
B11	4,820
B11/WT1	2,919
E7	4,398
E7/WT1	4,096

FIGURE 45- COMPARAISON DE LA SENSIBILITE DES SOUS-CLONES SUREXPRIMANT OU NON LE GENE *WT1*. La sensibilité des sous-clones exprimant stablement le gène *Wt1* vis-à-vis du traitement par chimiothérapie (cytarabine) a été évaluée par la technique MTT en suivant le protocole décrit précédemment. L'histogramme présente les valeurs moyennes d'IC50 ainsi que les écart-types obtenus à partir de 3 expériences indépendantes et sont exprimés en concentration de cytarabine en µg/mL. Un test t de Student a été réalisé et montre une différence significative uniquement entre le sous-clone C5 et C5/WT1 avec une valeur p de 0,0357.

III. D. OPTIMISATION DE L'INDUCTION ET DU SUIVI DE LA LEUCEMIE SUITE A L'INJECTION D'UN SOUS-CLONE LEUCEMIQUE

Dans un premier temps, nous avons évalué la cinétique de développement de la leucémie dans des souris C57BL/6J après l'injection par voie intraveineuse d'un seul sous-clone leucémique E2/WT1 en testant trois quantités cellulaires (10^4 , 10^5 et 10^6 cellules par souris). Le sous-clone E2/WT1 a été choisi car il est l'un des sous-clones exprimant le plus fortement le gène *Wt1* et est le plus sensible à la cytarabine.

En moyenne, la leucémie se développe en 20 jours lors de l'injection d'un million de cellules, 30 jours pour 100000 cellules et 63 jours après l'injection de 10000 cellules leucémiques (Figure 46).

Pour la plus faible quantité de cellules injectées, on observe un écart important dans la cinétique leucémique, les premières souris décédant à partir de 42 jours et les dernières après 100 jours. Nous avons donc décidé de ne pas sélectionner cette quantité cellulaire pour notre modèle. De même, le développement leucémique s'est avéré trop rapide lors de l'injection d'un million de cellules ne laissant pas suffisamment de temps pour moduler la cinétique d'injection de la chimiothérapie. Nous avons donc opté pour une injection de 10^5 cellules pour mettre en place ce modèle de LAM et de MRD leucémique.

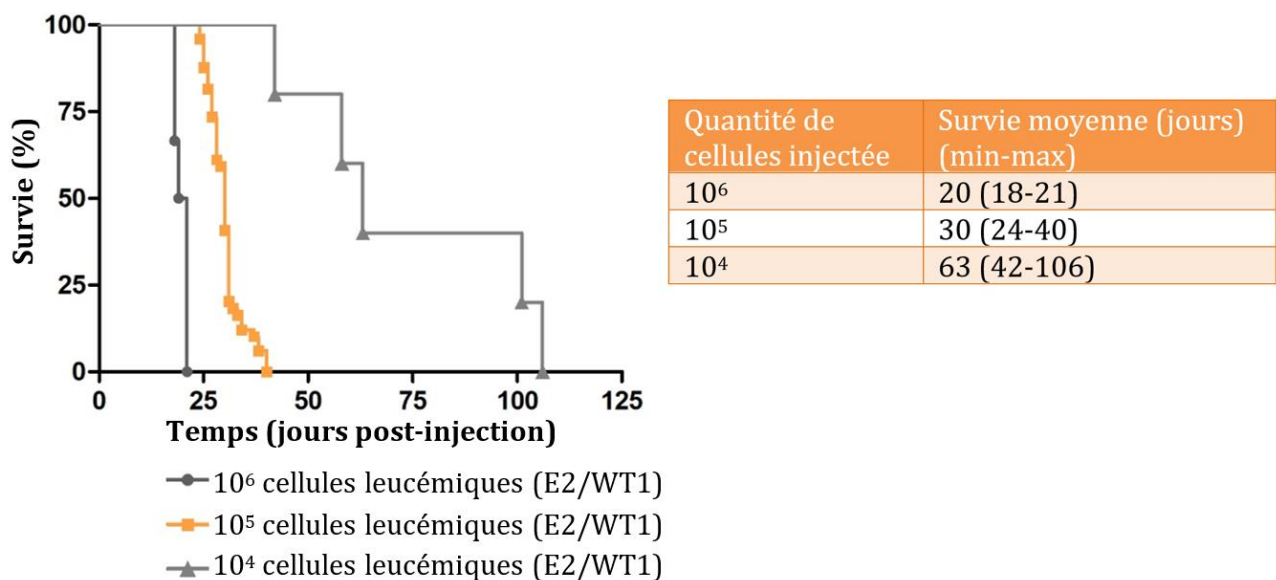


FIGURE 46 - CINETIQUE DE DEVELOPPEMENT LEUCEMIQUE VARIANT EN FONCTION DE LA QUANTITE DE CELLULES LEUCEMIQUES INJECTEES. Les souris C57BL/6J ont été injectées par voie intraveineuse avec 3 quantités différentes du sous-clone E2/WT1 (10⁴, 10⁵ et 10⁶) et un suivi du développement leucémique a été réalisé. Le tableau adjacent présente la survie moyenne pour chaque quantité cellulaire injectée ainsi que les valeurs minimales (min) et maximales (max) de survie observée. La quantité de 10⁶ et 10⁴ cellules leucémiques a été injectée chez 6 souris, pour la quantité intermédiaire (10⁵), ce suivi a été réalisé sur 48 souris au total. Une analyse statistique (Logrank) comparant la survie des souris selon la quantité injectée a été réalisée (p<0,0001).

La proportion de cellules ZsGreen⁺ infiltrant les organes vitaux des souris leucémiques a été évaluée par cytométrie en flux. On observe un envahissement important de la moelle osseuse par les cellule leucémiques avec en moyenne 21,6% de cellules ZsGreen⁺ mais avec une grande variabilité inter-individus puisque l’infiltration minimale est de 3% et la valeur maximale dépasse les 37%. Les poumons et le foie sont aussi infiltrés à hauteur de 10 à 15%. La rate, le thymus et les ganglions sont plus faiblement touchés avec une infiltration de l’ordre des 5%. Enfin, les reins sont très faiblement infiltrés (Figure 47A).

La surexpression du gène *Wt1* par le sous-clone E2/WT1 injecté nous a également permis d’évaluer son infiltration dans la moelle osseuse et le sang des souris leucémiques. Cette technique de détection par RT-qPCR étant plus sensible que la détection de la protéine ZsGreen fluorescente par cytométrie en flux. Pour mettre au point cette qPCR, nous avons évalué le seuil de détection du gène *Wt1* exprimé par les cellules leucémiques lorsqu’elles sont mélangées à des cellules médullaires de souris normales. Pour cela, nous avons réalisé une gamme de dilution du sous-clone E2/WT1 dans des quantités précises de cellules de moelle osseuse. L’amplification a été possible jusqu’à 1 cellules leucémiques parmi 40000 cellules de moelle osseuse (seuil de détection évalué à 0,0025%). Des quantités plus faibles de cellules

leucémiques n'ont pu être amplifiées par qPCR et se situant en dessous de l'expression basale de *Wt1* par les cellules de la moelle osseuse normale (symbolisée par la ligne rouge, Figure 47B).

On observe une faible expression du gène *Wt1* au niveau sanguin et médullaire avec une expression moyenne respective de 442,2 et 9,975 copies de *Wt1* normalisé pour 10^4 copies *Abl1* dans le sang et la moelle osseuse des souris contrôles. Le sang des souris leucémiques présente une expression de ce gène environ 27 fois plus importante que les souris contrôles avec une valeur moyenne de 11945 copies *Wt1*/ 10^4 copies *Abl1*. L'écart est encore plus important pour la moelle osseuse où l'expression moyenne est de 39815 copies *Wt1*/ 10^4 copies *Abl1*, presque 4000 fois plus exprimé que dans les souris contrôles (Figure 47C).

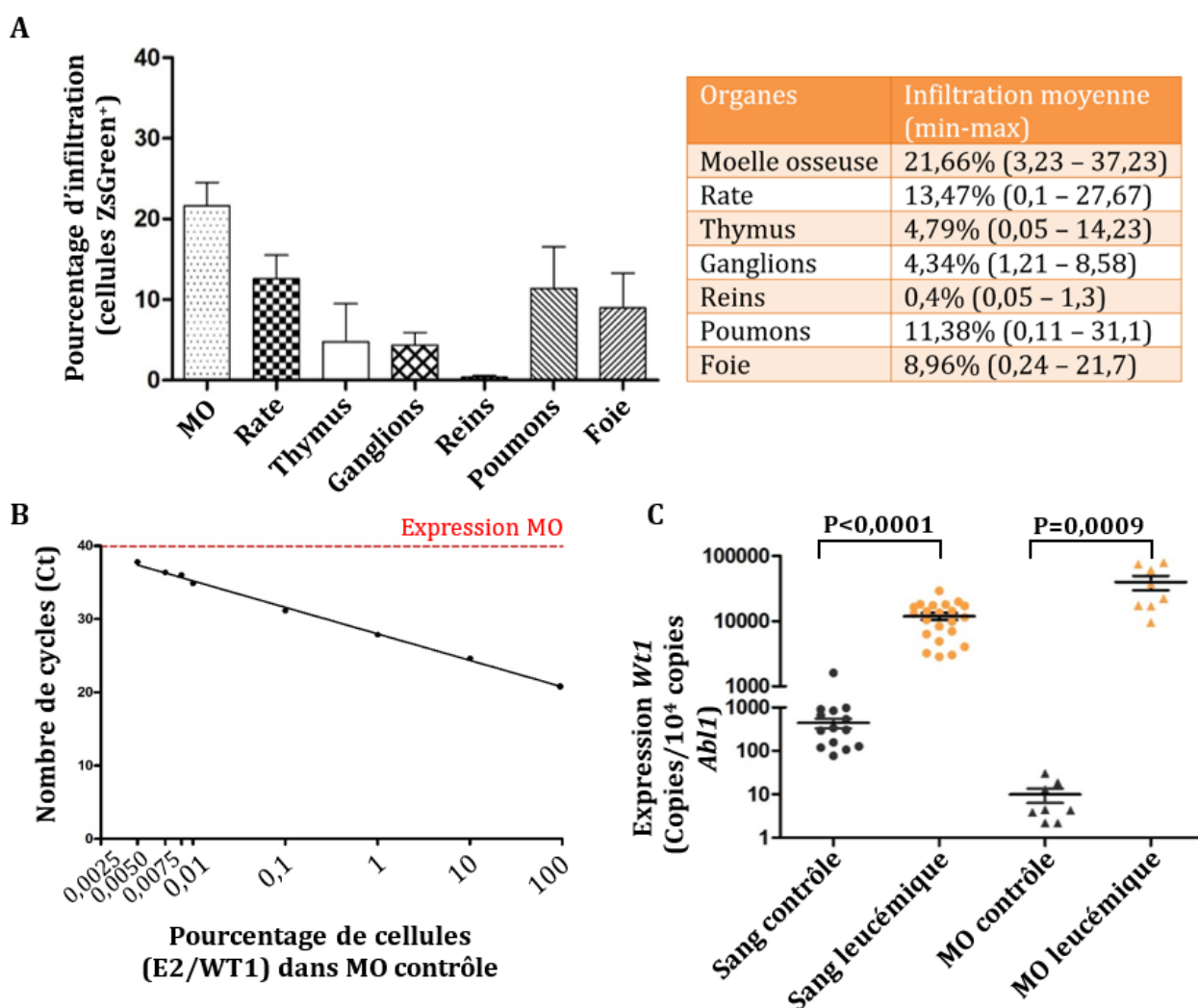


FIGURE 47 - INFILTRATION DES ORGANES ET DU SANG DES SOURIS PAR LE SOUS-CLONE LEUCEMIQUE E2/WT1. (A) Les organes ont été prélevés dès l'apparition des signes de la leucémie chez les souris C57BL/6J puis une lyse des hématies a été réalisée avant d'évaluer le pourcentage de cellules ZsGreen⁺ présentes dans ces organes par cytométrie en flux. L'analyse a été effectuée sur 3 à 14 souris selon les organes. Les histogrammes et le tableau présentent la moyenne d'infiltration des cellules leucémiques et les écart-types ainsi que les valeurs maximales (max) et minimales (min). (B) Une gamme étalon composée de dilutions du sous-clone E2/WT1 dans des cellules de moelle osseuse

normale a été effectuée. Une extraction des ARN totaux et une transcription inverse a été réalisée avant d'évaluer l'amplification du gène *Wt1* par qPCR. Le graphe présente les valeurs de Ct obtenues en fonction du pourcentage de cellules E2/WT1 diluées dans des cellules de MO contrôles (100% correspondant à l'expression des cellules E2/WT1). L'expression basale de la MO contrôle est indiquée par la ligne rouge. (C) L'expression du gène *Wt1* dans le sang et la moelle osseuse des souris leucémiques et contrôles a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée pour 10^4 copies du gène *Abl1*. Une analyse statistique de Mann-Whitney a été réalisée pour comparer les échantillons contrôles et leucémiques et les valeurs p sont indiquées directement sur le graphique. MO : moelle osseuse.

Une cinétique nous a permis d'observer l'infiltration des cellules leucémiques dans la moelle osseuse à partir de 18 jours post-injection par cytométrie en flux. Afin de mettre en place le traitement par chimiothérapie au moment le plus opportun, nous avons souhaité connaître également la cinétique d'apparition des cellules leucémiques dans le sang de ces souris. Pour cela, des prélèvements sanguins ont été réalisés à différents temps de la maladie. Aucune cellule ZsGreen⁺ n'a pu être détectée par cytométrie en flux et une analyse par RT-qPCR de l'expression du gène *Wt1* a été effectuée. Cette technique d'analyse plus sensible ne nous a pas permis de détecter les cellules E2/WT1 avant le stade final du développement leucémique (entre 25 et 31 jours). En effet, l'expression de *Wt1* dans le sang des souris prélevées après 8, 11 et 18 jours de développement leucémique n'est pas différente de l'expression retrouvée dans les souris avant l'injection des cellules leucémiques (point 0 de la cinétique) (Figure 48).

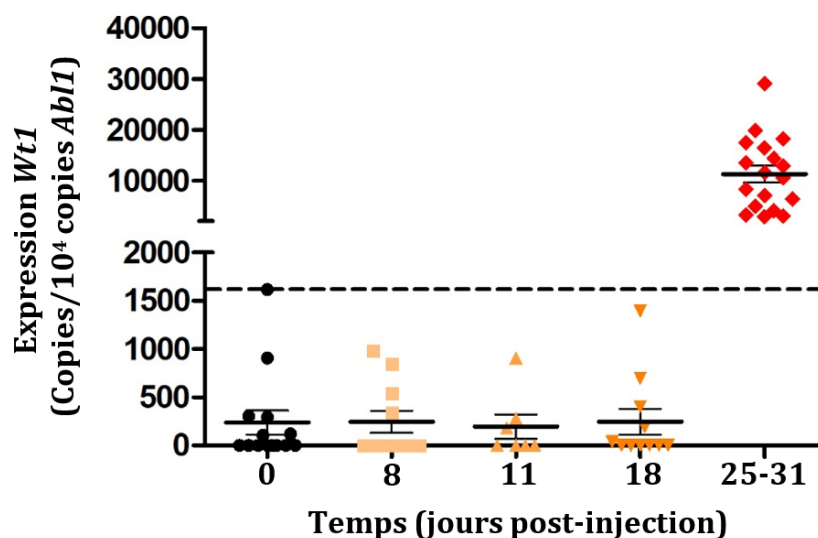


FIGURE 48 - CINÉTIQUE D'INFILTRATION LEUCÉMIQUE DANS LA CIRCULATION SANGUINE DES SOURIS C57BL/6J. Le sang des souris a été prélevé en sub-mandibulaire à plusieurs temps du développement leucémique. Le prélèvement sanguin au jour 0 a été réalisé juste avant l'injection des cellules leucémiques E2/WT1. Le dernier prélèvement indiqué « 25-31 » a été réalisé en intracardiaque au moment du sacrifice des souris montrant les premiers signes de la leucémie. La ligne discontinue correspond à l'expression du gène *Wt1* la plus élevée chez les souris contrôles (ou temps 0) et donc indique le seuil de détection. L'expression du gène *Wt1* est normalisée pour 10^4 copies du gène *Abl1* et cette analyse a été réalisée sur 7 à 22 souris selon le point de cinétique du prélèvement.

III. E. TEST DE DIFFERENTS CINETIQUES ET DOSES D'INJECTION DE CHIMIOTHERAPIE APRES L'INJECTION D'UN CLONE UNIQUE (E2/WT1)

Le sous-clone leucémique E2/WT1 étant le plus sensible à la cytarabine, nous avons testé différentes cinétiques et doses d'injection de ce traitement sur les souris préalablement injectées avec ce sous-clone. Le tableau qui suit résume les doses, le nombre et les cinétiques d'injection testées (Tableau 9).

Une prolongation de survie a été observée chez 3 souris sur 27 uniquement dans le cas où elles ont reçu 3 injections de cytarabine, 10 jours après l'injection de 10^5 cellules leucémiques (E2/WT1) à la dose de 200 mg/kg/jour/souris (Figure 49A).

Doses de cytarabine (mg/kg/souris/jour)	Début du traitement (jours post-injection des cellules leucémiques)	Nombre d'injections	Rémission ou échec
200	7	3	Echec (0/6)
	10		Rémission (3/27)
	12		Echec (0/6)
	14		Echec (0/6)
	18		Echec (0/6)
100	7	3	Echec (0/6)
			Echec (0/6)
	10	5	Echec (0/6)
		8	Echec (0/6)

TABLEAU 10 - DOSES, CINETIQUE ET NOMBRE D'INJECTION DE CHIMIOTHERAPIE EVALUEES POUR INDUIRE LA MRD LEUCEMIQUE. Ce tableau référence l'ensemble des doses utilisées, c'est-à-dire 100 ou 200mg/kg/jour/souris ainsi que le nombre d'injections réalisées (3 ou 5 injections successives ; 4 injections durant 2 semaines (soit 8)) débutant à 7, 10, 12, 14 ou 18 jours après l'injection du sous-clone leucémique E2/WT1. Pour chaque procédure testée, il est indiqué si une rémission a été obtenue ainsi que la proportion de souris en rémission par rapport au nombre total de souris injectées.

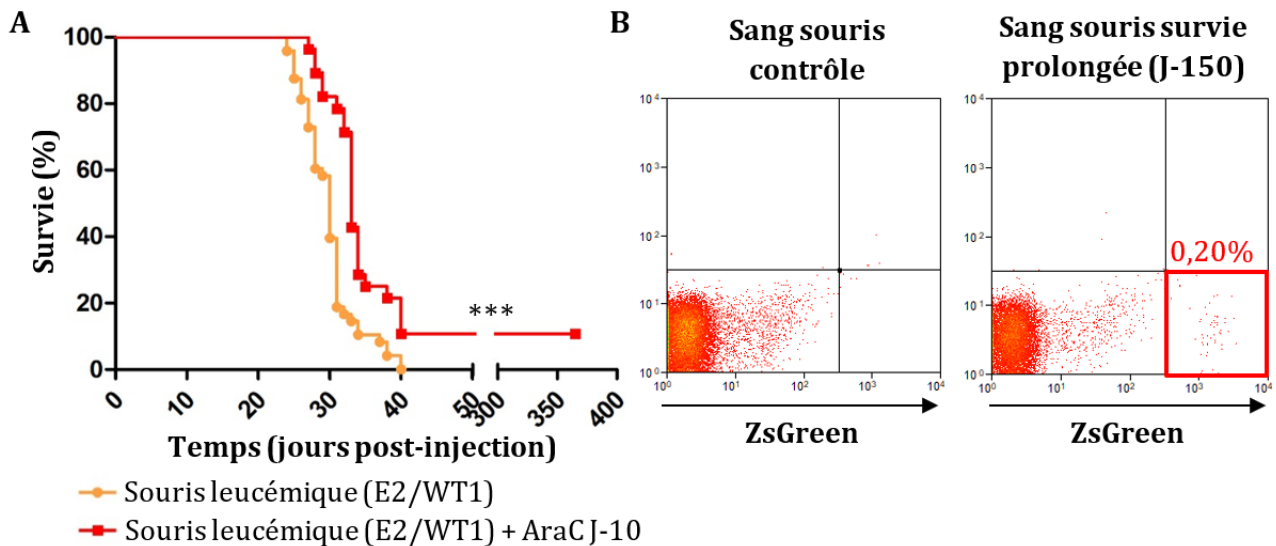


FIGURE 49 - PROLONGATION DE LA SURVIE DE CERTAINES SOURIS LEUCÉMIQUES TRAITÉES PAR CHIMIOTHÉRAPIE ET DÉTECTION PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DE CELLULES RÉSIDUELLES DANS LE SANG DE CES SOURIS. (A) La survie des souris leucémiques injectées avec 10^5 cellules (sous-clone E2/WT1) ($n=47$), ainsi que celle des souris ayant reçu un traitement à la cytarabine 10 jours après l'injection des cellules leucémiques (AraC J-10) ($n=27$) a été suivie. (B) 150 jours après l'injection des cellules leucémiques, le sang des souris survivantes à la leucémie a été prélevé puis les globules rouges ont été lysés avant l'analyse d'expression de la protéine fluorescente ZsGreen par cytométrie en flux dont le résultat d'une des trois souris est présenté. Un test statistique (Logrank) a été réalisé afin de montrer la significativité de la prolongation de survie des souris traitées par chimiothérapie (***, $p<0,0001$).

150 jours après l'injection des cellules leucémiques, le sang de ces souris a été prélevé et analysé par cytométrie en flux afin de mettre en évidence la persistance de cellules leucémiques ZsGreen⁺, ce qui fut le cas pour 2 souris sur 3 (Figure 49B). Cependant, ces cellules n'ont plus été détectées par cytométrie en flux lors des prélèvements qui ont suivi (180 jours post-injection des cellules leucémiques).

La survie de ces souris a été suivie pendant plus d'un an après l'injection leucémique sans constat de rechute. Un prélèvement des organes de ces souris survivantes a été réalisé et les analyses d'expression de la ZsGreen par cytométrie en flux (même seuil de détection que la cytométrie en flux pour l'expression du gène *ZsGreen*) et du gène *Wt1* par RT-qPCR n'ont pas permis de mettre en évidence de cellules leucémiques persistantes.

En résumé :

Les différents sous-clones issus de la lignée leucémique C1498 présentent pour la plupart une sensibilité à la cytarabine comparable, à l'exception du sous-clone G10 qui est plus résistant à ce traitement. C'est la raison pour laquelle, ce sous-clone n'a pas été utilisé par la suite pour la mise en place du modèle de MRD leucémique.

Une transfection des 5 autres sous-clones avec le plasmide pVitro1.1.WT1 a permis l'expression stable de *Wt1* confirmée par RT-qPCR, western-blot et immunomarquage fluorescent.

Le sous-clone E2/WT1 a été sélectionné pour initier la mise en place du modèle de MRD car il présentait une des meilleures expressions de *Wt1* et était le plus sensible à la cytarabine. Plusieurs quantités de cellules leucémiques ont été injectées aux souris C57BL/6J et nous avons sélectionné la cinétique de développement leucémique induite par l'injection de 100000 cellules par voie intraveineuse nous permettant de mettre au point la stratégie thérapeutique. La surexpression du gène *Wt1* nous a permis une détection par RT-qPCR dans la moelle osseuse et le sang des cellules leucémiques de manière plus sensible que la détection de la ZsGreen par cytométrie en flux. Une gamme étalon de dilution nous a permis d'évaluer ce seuil de détection à $2,5 \times 10^{-5}$ (0,0025%).

Plusieurs stratégies d'administration de la cytarabine ont été testées suite à l'injection de 100000 cellules leucémiques (sous-clone E2/WT1). Seule l'injection, 10 jours après celle des cellules leucémiques, à la dose de 200 mg/kg/jour durant 3 jours a permis la survie d'un faible pourcentage de souris (11,1%). De plus, nous avons pu détecter la persistance d'une faible fréquence de cellules ZsGreen⁺ par cytométrie en flux dans le sang des souris survivantes jusque 150 jours post-injection.

IV. DEVELOPPEMENT DU MODELE DE MALADIE RESIDUELLE MESURABLE APRES L'INJECTION D'UN MELANGE DE PLUSIEURS SOUS-CLONES LEUCEMIQUES

Les résultats avec un seul sous-clone n'étant pas complètement satisfaisants (faible pourcentage de souris survivantes), nous avons opté pour une nouvelle stratégie afin de se rapprocher au plus près de la leucémie observée chez les patients. Pour cela, nous avons privilégié l'injection d'un mélange de plusieurs sous-clones aux souris C57BL/6J en vue d'induire une certaine hétérogénéité clonale. Plusieurs combinaisons ont été réalisées et évaluées.

IV. A. MELANGE DE 2 OU 5 SOUS-CLONES LEUCEMIQUES EXPRIMANT OU NON *Wt1*

Tout d'abord, nous avons évalué la survie de souris injectées avec un mélange en quantité égale des deux sous-clones les plus sensibles à la cytarabine, c'est-à-dire le sous-clone E2 et le sous-clone F1 exprimant ou non la protéine WT1 (Figure 45, p-128-). Ainsi, des souris ont été injectées par voie intraveineuse avec 100 000 cellules leucémiques (50000 cellules du sous-clone E2 et 50000 du sous-clone F1 ± WT1). Deux des quatre groupes de souris ont été traités par voie intrapéritonéale avec 3 injections de cytarabine débutant 10 jours après l'injection des cellules leucémiques à la dose de 200 mg/kg/souris/jours, protocole induisant une survie prolongée de 11,1% des souris injectées avec le sous-clone E2/WT1 (Figure 49, p-133-). Les souris ayant reçu le traitement par chimiothérapie ont présenté une survie prolongée (moyenne de survie de 41 jours). Nous avons également étudié le développement leucémique induit suite à l'injection d'un mélange de l'ensemble des 5 sous-clones en quantité équivalente. La cinétique de survie des souris leucémiques était plus lente que pour les autres sous-clones avec une survie moyenne de 38 jours. Le traitement par chimiothérapie, en suivant le même protocole que pour le mélange des 2 sous-clones (E2 et F1 ± WT1), a entraîné une prolongation de la survie de ces souris avec une moyenne de 45 jours (décès des souris entre 38 et 56 jours). (Tableau 10)

Sous-clones	Dose de cytarabine (mg/kg/jour/souris)	Début du traitement (jours post-injection des cellules leucémiques)	Nombre d'injections	Cinétique de la LAM (jours)	Rémission ou échec
E2 + F1	Sans chimiothérapie			31	Echec (0/6)
(± WT1)	200	10	3		Echec (0/6)
5 clones	Sans chimiothérapie			37	Echec (0/6)
(± WT1)	200	10	3		Echec (0/6)

TABLEAU 11 - EVALUATION DE LA SURVIE DES SOURIS RECEVANT UN MELANGE DE 2 OU 5 SOUS-CLONES LEUCEMIQUES ET TRAITEES OU NON PAR CHIMIOOTHERAPIE. Les souris ont reçu une injection intraveineuse de 100 000 cellules leucémiques (mélange de 50 000 cellules du sous-clone E2 et 50 000 cellules du sous-clone F1 ou un mélange en quantité égale des 5 sous-clones exprimant ou non WT1 (±WT1)) suivi ou non d'un traitement par chimiothérapie à la dose de 200 mg/kg/souris/jour durant 3 jours consécutifs et débutant 10 jours après l'injection des cellules leucémiques.

IV. B. MELANGE DE 3 SOUS-CLONES LEUCEMIQUES

Un mélange des 3 sous-clones leucémiques en quantité égale et exprimant ou non WT1 (dont les résultats obtenus avec l'expression de WT1 figurent en paragraphe V. p-140-) a également été injecté aux souris C57BL/6J par voie intraveineuse. Pour chaque expérience réalisée, l'un des deux groupes de souris a reçu le traitement à la cytarabine par voie intrapéritonéale à raison de 1 injection par jour pendant 3 jours successifs à la dose de 200 mg/kg/jour/souris et débutant 10 jours après l'injection des cellules leucémiques.

La cinétique de développement de la leucémie était en moyenne de 32 jours avec un étalement des décès entre 28 et 38 jours post-injection des cellules leucémiques. Le traitement par chimiothérapie a entraîné une prolongation de la survie chez 45,5% des souris (15 souris sur 33) et dont 13 d'entre-elles (39,4%) n'ont pas présenté de rechute dans les 150 jours suivant l'injection des cellules leucémiques (Figure 50A).

Nous avons évalué l'infiltration des souris leucémiques dans les différents organes par cytométrie en flux. La moelle osseuse, la rate, les poumons sont envahis par les cellules leucémiques et le foie apparaît comme l'organe le plus fortement infiltré avec une moyenne de 44,5% (Figure 50B).

42 jours après la mort des souris leucémiques, le sang des souris survivantes a été prélevé afin d'évaluer la présence de cellules leucémiques ZsGreen⁺ persistantes après le traitement par chimiothérapie. L'analyse, effectuée par cytométrie en flux, a révélé une faible quantité de

cellules ZsGreen⁺ dans la circulation sanguine de ces souris comprise entre 0,1 et 1,58 % (Figure 50D).

Nous avons alors prélevé le sang de ces souris durant plusieurs semaines afin de suivre l'évolution de cette infiltration. Au cours de ce suivi, certaines des souris survivantes ont présenté une augmentation de la proportion dépassant les 4 % de cellules leucémiques circulantes et ont rechuté (*, Figure 50C). 75 jours post-mortem des souris leucémiques (soit 107 jours après l'injection leucémique), plus aucune cellule ZsGreen⁺ n'a pu être détectée dans le sang des souris survivantes par cytométrie en flux (Figure 50C).

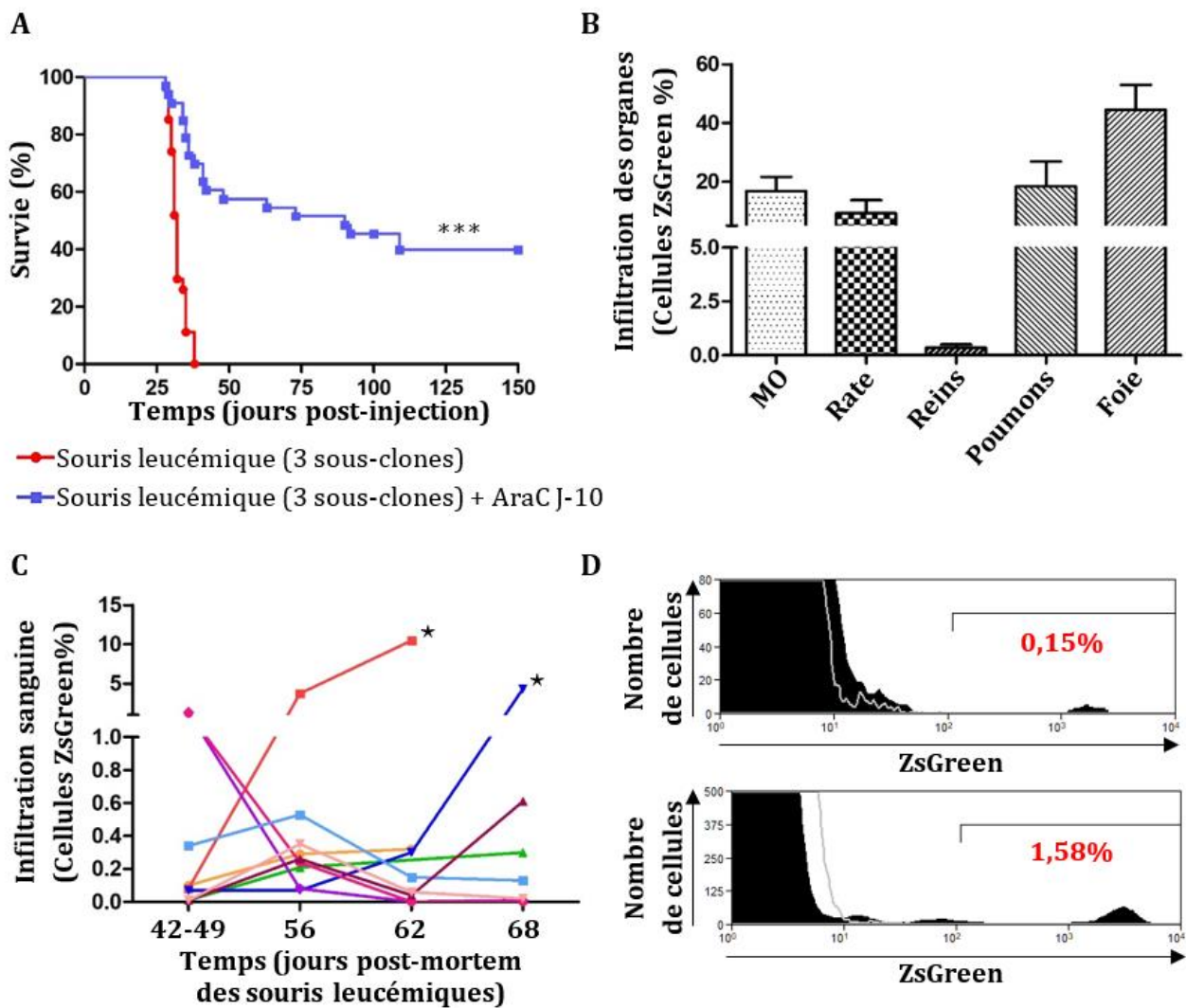


FIGURE 50 - INDUCTION ET DETECTION DE LA MRD INDUITE PAR L'INJECTION D'UN MELANGE DE 3 SOUS-CLONES LEUCEMIQUES. (A) La survie des souris injectées avec 100 000 cellules (mélange des 3 sous-clones B11, C5 et E7 en quantité égale) et traitées ou non par chimiothérapie (1 injection par jour durant 3 jours successifs à une dose de 200 mg/kg/souris/jour débutant 10 jours post-injection des cellules leucémiques, AraC J-10) a été étudiée. Une analyse statistique (Logrank) comparant les souris leucémiques (n=26) et les souris traitées (n=33) a montré une différence de survie significative de valeur $p < 0,0001$ (***). (B) L'infiltration des organes des souris leucémiques a été évaluée par l'analyse de l'expression de la ZsGreen par cytométrie en flux. (C) L'expression de la ZsGreen par cytométrie en flux a été suivie dans le sang des souris survivantes à la leucémie et est présenté en pourcentage d'infiltration après une lyse des hématies en fonction du temps. L'indication de temps est exprimée en jours post-mortem des souris leucémiques (calculé par rapport à la survie moyenne de 32 jours). Les souris qui sont décédées au cours du suivi ont été marquées du symbole suivant (*). (D) Exemple de deux histogrammes obtenus lors du suivi dans le sang des cellules leucémiques ZsGreen⁺ chez deux souris survivantes. La courbe grise représente la fluorescence du sang d'une souris contrôle et en noir celle d'une souris survivante.

Du fait de la mort de deux souris lors de la cinétique de suivi de l'infiltration leucémique sanguine à 67 et 74 jours post-mortem des souris leucémiques (ou 99 et 106 jours post-injection des cellules leucémiques, respectivement), nous avons attendu encore plusieurs semaines pour observer la survenue de nouvelles rechutes, ce qui ne fut pas le cas. 150 jours après la mort des souris leucémiques, nous avons sacrifié les 13 souris survivantes et prélevé la moelle osseuse de celles-ci afin d'évaluer la persistance leucémique par une analyse de l'expression de la *ZsGreen* par RT-qPCR.

Avant de réaliser l'analyse d'expression de la *ZsGreen* dans la moelle osseuse de ces souris, nous avons réalisé une gamme étalon afin de déterminer le seuil de détection du gène de la *ZsGreen* exprimé par le mélange des 3 sous-clones leucémiques (3/ZsGreen) quand elles sont mélangées à des cellules saines de moelle osseuse murine. Nous avons évalué cette limite de détection à 0,01% (10^{-4}), correspondant à la détection de 1 cellule sur 10000. Les points de dilutions inférieurs n'ont pas été amplifiés lors de l'analyse qPCR et la limite en rouge correspond à l'expression de la moelle osseuse (amplification d'un point sur les trois de l'expérience) (Figure 51A).

L'expression du gène de la *ZsGreen* du mélange leucémique injecté aux souris a été quantifié par RT-qPCR avant chaque expérience afin d'estimer son évolution pendant la LAM et la MRD. L'expression moyenne des 3 expériences indépendantes effectuées a été de 216798 copies *ZsGreen* pour 10^4 copies du gène *Abl1*.

Cette expression a été analysée dans la moelle osseuse des souris leucémiques et était comprise entre 14634,7 et 293195,1 copies *ZsGreen* pour 10^4 copies du gène *Abl1* (Figure 51B), indiquant sa stabilité d'expression *in vivo*.

L'expression normalisée de la *ZsGreen* dans la moelle osseuse des souris survivantes, 182 jours post-injection des cellules leucémiques, s'est avérée beaucoup plus faible et comprise entre 0,1 et 190,9 copies *ZsGreen*/10⁴ copies *Abl1* (Figure 51B). Néanmoins, nous n'avons pas observé d'amplification dans les échantillons de 3 souris sur 13. L'ensemble des produits d'amplification (10 au total) ont été purifiés sur colonne et envoyés au séquençage pour confirmer la séquence de la *ZsGreen*. Cette analyse a révélé la présence de la *ZsGreen* pour 40% des échantillons (4/10) soit lorsque le nombre de copies de *ZsGreen* était compris entre 1,2 et 190,9 copies pour 10⁴ copies *Abl1*, les autres amplifications étant non-spécifiques. Une MRD leucémique à long terme a donc pu être mise en évidence chez 4/13 des souris survivantes.

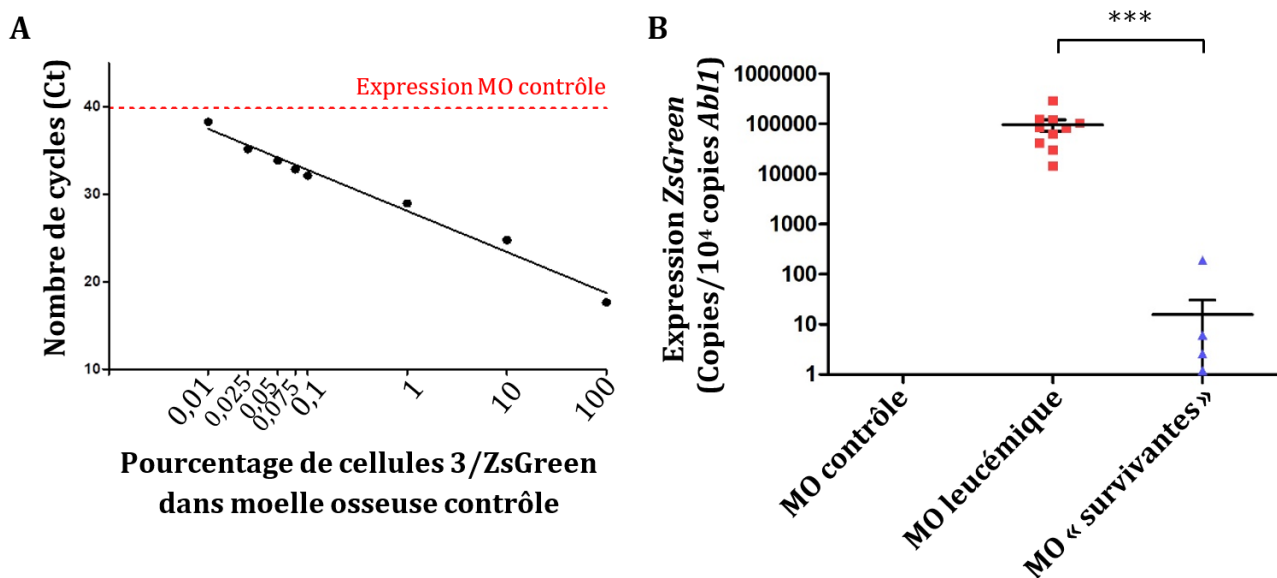


FIGURE 51 - DETECTION DE L'EXPRESSION DU GENE ZSGREEN DANS LA MOELLE OSSEUSE DES SOURIS LEUCEMIQUES ET AYANT SURVECU A LA MALADIE APRES TRAITEMENT. (A) Une gamme étalon composée de dilutions du mélange des sous-clones B11, C5 et E7 (3/ZsGreen) dans des cellules de moelle osseuse normale a été effectuée. Une extraction des ARN totaux et une transcription inverse a été réalisée avant d'évaluer l'amplification du gène *ZsGreen* par qPCR. Le graphe présente les valeurs de Ct obtenues en fonction du pourcentage de cellules 3/ZsGreen diluées dans des cellules de MO contrôles (100% correspondant à l'expression des cellules 3/ZsGreen). L'expression basale de la MO contrôle est indiquée par la ligne rouge. (B) La moelle osseuse de souris saines (MO contrôle) a été prélevée en même temps que celles des souris leucémiques. Celle des souris ayant survécu (MO « survivantes ») a été prélevée 182 jours après l'injection leucémique. Les cellules de la moelle osseuse ont été isolées et une lyse des hématies a été réalisée avant d'effectuer une analyse par RT-qPCR de l'expression de la *ZsGreen*. Cette expression a été normalisée par rapport à 10⁴ copies du gène *Abl1*. Les expressions du gène *ZsGreen* chez les différentes souris sont représentées sous forme d'un nuage de point, les barres horizontales indiquent la valeur moyenne et les barres d'erreurs verticales les écarts-types. Un test t de Student a été réalisé pour comparer l'expression des souris leucémiques et des souris survivantes et a montré une différence significative de valeur p=0,0002 (***).

En résumé :

L'injection d'un mélange de 3 sous-clones (composé d'une quantité équivalente des sous-clones B11, C5 et E7) suivi du traitement par chimiothérapie (3 injections à 200 mg/kg/souris/jour durant 3 jours débutant 10 jours post-injection du mélange des 3 sous-clones) a entraîné une survie prolongée de 42,4% des souris C57BL/6J injectées (15/33). Une persistance leucémique a été mise en évidence par cytométrie en flux en détectant l'expression de la protéine ZsGreen dans le sang des souris survivantes jusqu'à 100 jours post-injection des cellules leucémiques. Cette MRD leucémique a été confirmée à plus long terme par la détection par RT-qPCR de l'expression de la *ZsGreen* dans la moelle osseuse de 4 souris survivantes sur 13.

V. MISE AU POINT DU MODELE DE MALADIE RESIDUELLE MESURABLE APRES L'INJECTION D'UN MELANGE DE 3 CLONES SUREXPRESSANT LE GENE WT1

Après avoir obtenu ce modèle de maladie résiduelle mesurable suite à l'injection du mélange des 3 clones suivants: B11, C5 et E7, nous avons introduit la surexpression du gène *Wt1*.

L'injection des 3 sous-clones exprimant *Wt1* n'a pas entraîné le développement de la leucémie chez la totalité des souris injectées. En effet, nous avons observé une survie chez 40% des souris (6/15). La survie des souris traitées par 3 injections successives de cytarabine (à la dose de 200 mg/kg/jour/souris, ceci 10 jours après les cellules leucémiques) n'est pas améliorée.

Afin d'optimiser la survie des souris leucémiques en présence de chimiothérapie, le nombre d'injections de cytarabine a été augmenté. Quatre et cinq injections de cytarabine ont permis la survie de 50 et 62,5% des souris injectées avec le mélange des 3 sous-clones exprimant *Wt1*, respectivement (Tableau 11 et Figure 52A).

Sous-clones	Dose de cytarabine (mg/kg/jour/souris)	Début du traitement (jours post-injection des cellules leucémiques)	Nombre d'injections	Cinétique de la LAM (jours)	Rémission ou échec
Mélange des 3 clones/WT1	Sans chimiothérapie			38	Rémission (6/15)
	200	10	3		Rémission (2/10)
			4		Rémission (6/12)
			5		Rémission (5/8)

TABLEAU 12 - EVALUATION DE LA SURVIE DES SOURIS RECEVANT UN MELANGE DE 3 SOUS-CLONES LEUCEMIQUES EXPRIMANT WT1 ET TRAITÉES OU NON PAR CHIMIOThÉRAPIE. Les souris ont reçu une injection intraveineuse de 100 000 cellules leucémiques (mélange en quantité égale des 3 sous-clones exprimant WT1 (B11/WT1, C5/WT1 et E7/WT1)) suivie ou non d'un traitement par chimiothérapie à la dose de 200 mg/kg/souris/ jour durant 3, 4 ou 5 jours consécutifs et débutant 10 jours après l'injection des cellules leucémiques.

L'infiltration des cellules leucémiques dans les organes des souris non traitées et ayant succombées à la leucémie a été évaluée *via* l'expression de la ZsGreen par cytométrie en flux (Figure 52B). Le foie et la moelle osseuse sont les deux organes les plus envahis par les cellules leucémiques à hauteur de 10,8 et 14%, respectivement. La rate et les poumons ont un infiltrat leucémique de l'ordre de 3% en moyenne et les reins sont à nouveau très peu infiltrés puisqu'ils

présentent moins de 0,5% de cellules ZsGreen⁺ (Figure 52B). L'infiltration leucémique semble moins importante qu'en l'absence de WT1. Un test statistique (test-t de Student) comparant l'infiltration des organes des souris leucémiques injectées avec le mélange des 3 clones exprimant ou non *Wt1* a révélé une différence significative uniquement pour le foie (valeur p de 0,0132).

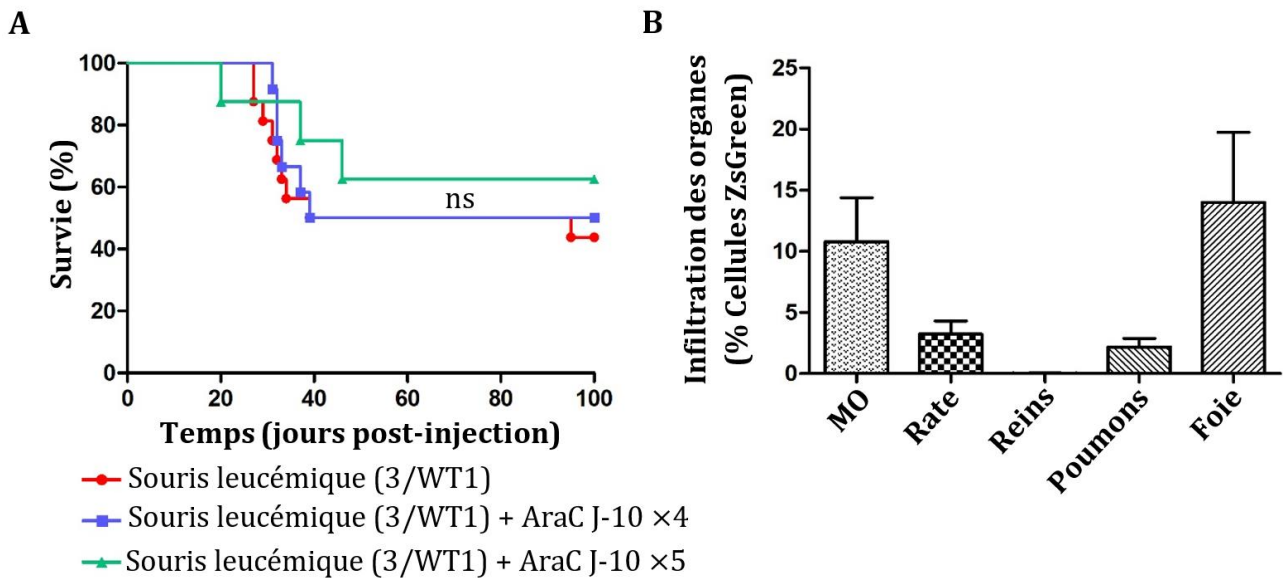


FIGURE 52 - SURVIE PROLONGEE DES SOURIS INJECTEES AVEC LE MELANGE DES 3 SOUS-CLONES SUREXPRIMANT *WT1* AVEC OU SANS TRAITEMENT PAR CHIMIOETHERAPIE. (A) La survie des souris injectées avec le mélange des 3 sous-clones surexprimant *Wt1* (B11/WT1, C5/WT1 et E7/WT1 en quantité égale, 3/WT1) et traitées ou non par chimiothérapie (4 ou 5 injections successives de cytarabine à 200 mg/kg/souris/jour débutant 10 jours après l'injection des cellules leucémiques) a été suivie. Un test statistique (Logrank) a été réalisé et n'a pas montré de différence significative (ns) de survie entre les groupes de souris traitées par 4 (n=12) ou 5 injections (n=8) de cytarabine et les souris non traitées (n=15). (B) L'histogramme présente la moyenne d'infiltration des organes de 5 souris leucémiques n'ayant pas reçu de traitement par chimiothérapie et qui fut déterminée par l'expression de la protéine ZsGreen par cytométrie en flux.

Afin d'évaluer la limite de détection de l'expression du gène *Wt1* du mélange des 3 sous-clones surexprimant *Wt1* (3/WT1) présent dans la moelle osseuse des souris injectées, nous avons réalisé une gamme étalon en diluant le mélange de ces sous-clones (3/WT1) dans des cellules isolées de la moelle osseuse de souris normales. Ainsi, nous avons évalué un seuil de détection à 0,075% ($7,5 \times 10^{-4}$), c'est-à-dire une détection au maximum de 7,5 cellules leucémiques parmi 10000 cellules de moelle osseuse (environ 1/1333). En effet, le gène *Wt1* a été amplifié pour la dilution à 5×10^{-4} (0,050%) mais cette expression est inférieure à celle de la MO contrôle (Figure 53A).

L'expression du gène *Wt1* du mélange des 3 sous-clones exprimant *Wt1* utilisé pour l'injection intraveineuse des souris a été évaluée et était de 28179,1 copies de *Wt1* pour 10^4 copies du gène *Abl1* (valeur moyenne de 2 expériences indépendantes) (données non présentées).

L'expression de *Wt1* a également été quantifiée dans la moelle osseuse des souris leucémiques et cette analyse a révélé une expression moyenne de 1776 copies *Wt1* normalisée pour 10^4 copies du gène *Abl1* (Figure 53B).

Enfin, 90 jours après l'injection des cellules leucémiques, nous avons sacrifié l'ensemble des souris survivantes afin d'estimer la persistance de cellules par une analyse de l'expression du gène *Wt1* dans la moelle osseuse de ces souris par RT-qPCR. Une expression moyenne de 202,9 copies *Wt1*/ 10^4 copies *Abl1* a été détectée pour les souris survivantes traitées par chimiothérapie correspondant à une diminution d'environ 1 log par rapport aux souris leucémiques (Figure 53B). Les souris survivantes non traitées présentaient une expression moyenne de 9,367 copies *Wt1*/ 10^4 copies *Abl1* (données non présentées).

Nous avons également évalué l'infiltration sanguine par RT-qPCR des souris traitées ou non par chimiothérapie et ayant développé la leucémie. Les souris leucémiques présentaient une moyenne d'expression de *Wt1* de 10491 copies *Wt1*/ 10^4 copies *Abl1* versus 466,5 copies *Wt1*/ 10^4 copies *Abl1* pour les souris traitées à la cytarabine (Figure 53C).

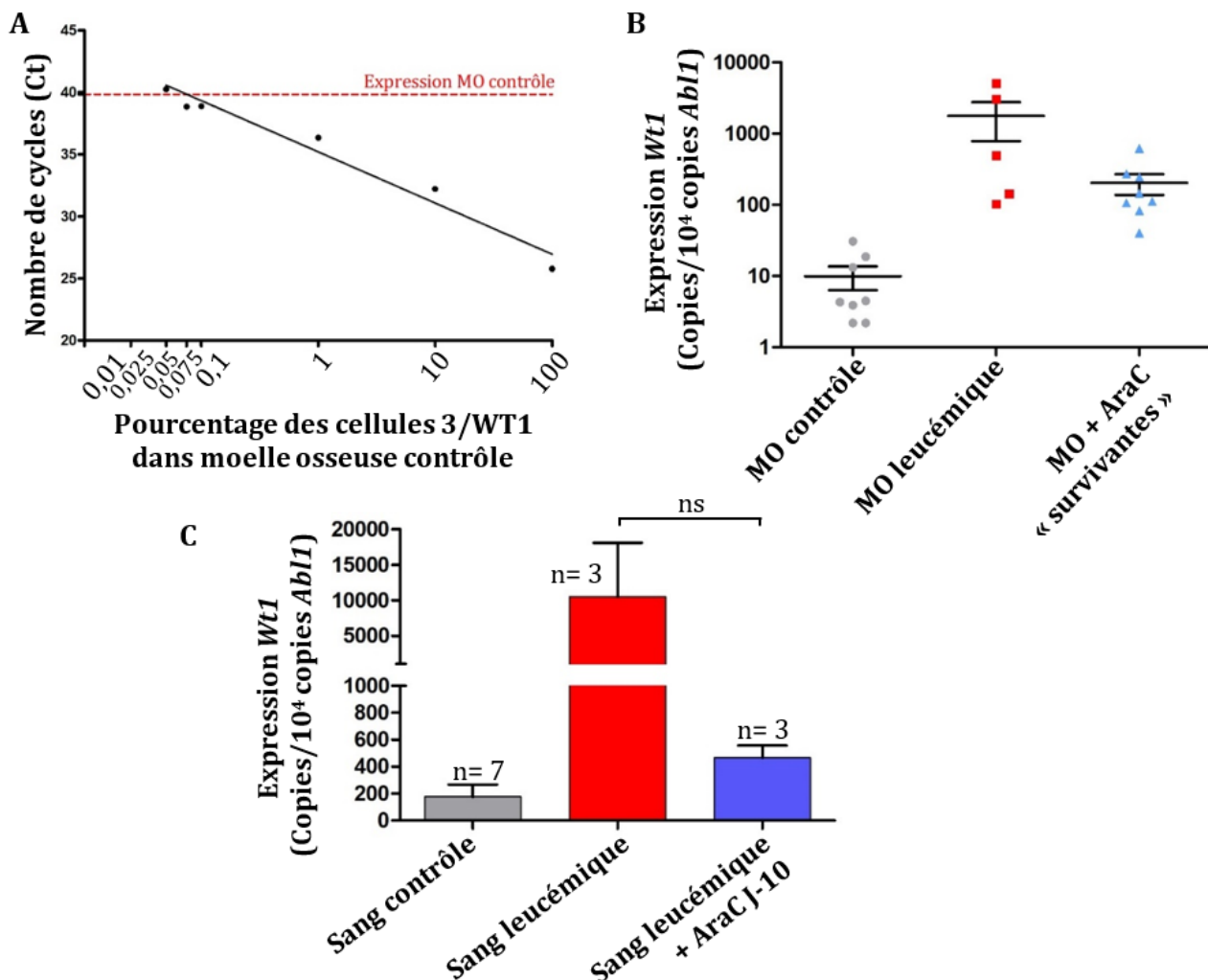


FIGURE 53 - LIMITE DE DETECTION DES CELLULES PERSISTANTES PAR RT-QPCR ET EXPRESSION DE *WT1* DANS LA MOELLE OSSEUSE ET LE SANG DES SOURIS INJECTEES AVEC LE MELANGE DES 3

SOUS-CLONES EXPRIMANT WT1. (A) Gamme étalon préparée en mélangeant les 3 sous-clones exprimant *Wt1* (3/WT1) dans des cellules normales de moelle osseuse murine. Une extraction des ARN totaux et une transcription inverse a ensuite été réalisée avant l'analyse de l'expression du gène *Wt1* par qPCR. Ce graphique représente les valeurs de Ct obtenues pour les différentes concentrations cellulaires. Le point 3/WT1 correspond à l'expression de *Wt1* du mélange cellulaire et ensuite les points de dilution au 1/10e et les points de dilution intermédiaires entre 10^{-3} (0,1%) et 10^{-4} (0,01%) cellules. La ligne rouge correspond à la valeur de Ct des cellules de moelle osseuse murine normale. (B) L'expression du gène *Wt1* a été évaluée et normalisée pour 10^4 copies du gène *Abl1* dans la moelle osseuse des souris leucémiques et des souris survivantes traitées par chimiothérapie. (C) L'histogramme présentent l'expression du gène *Wt1* dans le sang des souris leucémiques traitées (bleu) ou non (rouge) par chimiothérapie et n'ayant pas présenté de prolongation de survie. Un test statistique (test-t de Student) comparant l'expression de *Wt1* des souris leucémiques traitées ou non n'a pas révélé de différence significative (ns).

En résumé :

Notre stratégie thérapeutique ayant fonctionné pour l'injection du mélange des 3 sous-clones, nous l'avons reproduite en présence des mêmes sous-clones surexprimant le gène *Wt1* (B11/WT1, C5/WT1 et E7/WT1). Néanmoins, leur injection n'induit pas 100% de mortalité chez les souris et le protocole de chimiothérapie a dû être réadapté en augmentant le nombre d'injections de cytarabine (4 et 5 injections) afin d'obtenir une survie des souris plus importante après traitement.

90 jours post-injection du mélange des sous-clones leucémiques, l'analyse par RT-qPCR de l'expression du gène *Wt1* dans la moelle osseuse des souris leucémiques et survivantes suite au traitement à la cytarabine a permis de mettre en évidence une diminution de la charge leucémique et une MRD leucémique après chimiothérapie. Une cinétique à plus long terme devrait nous permettre de confirmer cette MRD.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ainsi, mon projet de thèse avait pour objectif de développer un modèle syngénique et immun de LAM et de MRD surexprimant ou non le gène *Wt1* et s'approchant au mieux de la pathologie humaine. Il pourra par la suite être utilisé comme outil pour la compréhension des mécanismes d'induction et de maintien de la MRD leucémique.

Le gène *Wt1* a été choisi pour deux raisons principales. Tout d'abord, il s'agit d'un gène surexprimé chez la majorité des patients atteints de LAM au diagnostic et il représente un marqueur pouvant servir au suivi de la MRD. De plus, c'est un antigène capable d'induire une réponse immunitaire cytotoxique et humorale chez les patients leucémiques. Enfin, il existe 96% d'homologies de séquence entre la protéine humaine et murine, ce qui peut permettre à long terme, de décrire des épitopes importants pour la réponse immunitaire et l'induction de la MRD.

Mon projet de thèse avait donc plusieurs objectifs, tout d'abord de (1) caractériser la lignée murine leucémique C1498, les sous-clones dérivés de celle-ci ainsi que la leucémie engendrée par l'injection de ces cellules. Dans un deuxième temps, (2) de sélectionner certains sous-clones leucémiques pour leur sensibilité au traitement par chimiothérapie et d'obtenir des sous-clones exprimant de manière stable le gène *Wt1*. Enfin, (3) de développer ce modèle murin syngénique et immun de MRD surexprimant ou non le gène *Wt1*.

Ainsi, dans cette dernière partie, je discuterais l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de thèse et j'aborderais les futures utilisations de ce modèle murin de LAM et de MRD surexprimant ou non le gène *Wt1*.

[La lignée C1498 est une lignée de leucémie aiguë myélo-monocytaire](#)³²⁰

L'une des premières descriptions de cette lignée tumorale date de 1953, où son injection par voie intrapéritonéale ou en sous-cutanée dans des souris C57BL/6 a montré une prolifération importante de ces cellules avec un envahissement de la circulation sanguine et des organes hématopoïétiques. Les auteurs ont conclu, d'après l'aspect cellulaire de cette lignée ainsi que les caractéristiques de la pathologie induite, qu'il s'agissait d'une leucémie aiguë granulocytaire.³²¹ Par la suite, sa caractérisation a été poursuivie et il a été montré l'inhibition de la croissance *in vitro* des cellules hématopoïétiques saines *via* la production de substances solubles produites par cette lignée C1498 à travers une chambre de diffusion.³³⁰⁻³³²

Cependant, d'autres études ont proposé une origine différente à cette lignée. C'est le cas de l'étude de Boyer et ses collaborateurs qui ont décrit une lignée de type myélo-monocytaire

exprimant les marqueurs granulocytaires (Gr-1) et monocytaires (Mac-1 et Mac-3).³²³ Labelle et son équipe ont, quant à eux, décrit ces cellules comme appartenant à la lignée lymphocytaire T Natural Killer (NKT) par l'expression de certains marqueurs associés à cette population tels que l'expression du gène de la chaîne *Vβ8.2* du TCR ou le *CD3ε*, ainsi que des marqueurs extracellulaires (CD1d, CD69, DX5/CD49b pan-NK...)³²⁴ Cette divergence concernant la nature de cette lignée ainsi que la leucémie associée est principalement due à l'ancienneté des études réalisées.

Le phénotypage par immunomarquage de cette lignée a montré, *in vitro*, une faible expression de marqueurs membranaires. L'équipe de Labelle et ses collaborateurs avait conclu à une lignée de type NKT après détection de l'expression du *TCRVβ8.2* et du *CD3ε* par RT-qPCR. Cependant, nous avons montré que l'expression du TCR et du *CD3ε* observée dans plus de 70% des cellules C1498 se localisait uniquement dans le milieu intracellulaire.³²⁴

Nous avons également observé l'expression intracellulaire d'un marqueur de la lignée monocyttaire, Mac-3 (non utilisé dans l'étude de Labelle *et al.*) chez plus de 90% des cellules rendant difficile la détermination de la lignée d'appartenance par cette simple analyse phénotypique. Ce phénotypage a donc mis en évidence l'expression de marqueurs appartenant aux lignées myéloïdes et lymphoïdes comme ce qui est retrouvé chez les patients atteints de LAM. En effet, ils présentent régulièrement un immunophénotype aberrant associé à la leucémie dont notamment l'expression conjointe de marqueurs de lignées lymphoïdes par des blastes myéloïdes qui est retrouvé chez environ 30% des patients.¹³⁵

Ainsi, afin d'identifier l'appartenance de ces cellules à une lignée hématopoïétique, un marquage immunofluorescent de la myéloperoxydase, enzyme spécifique des cellules de la lignée myéloïde a été détecté par microscopie à fluorescence dans l'ensemble des cellules et confirme l'origine myéloïde de la lignée C1498.^{333,334} Le marquage cytochimique des estérases a révélé un mélange de cellules appartenant à la lignée granulocytaire et monocyttaire par l'expression des estérases dégradant le naphthol AS-D chloroacétate et l' α -naphthyl butyrate, respectivement.³²⁵ Cette présence de monocytes est en concordance avec l'immunophénotypage révélant l'expression du marqueur Mac-3. Enfin, une coloration cellulaire au MGG nous a permis d'observer par microscopie l'immatunité de ces cellules notamment par la présence de noyaux volumineux contenant la plupart du temps plusieurs nucléoles, des vacuoles et un halo péri-nucléaire avec un cytoplasme bleuté. L'ensemble de ces caractéristiques correspondant à des blastes immatures.³³³ Ces différentes analyses nous ont

permis de conclure que la lignée leucémique C1498 est composée d'un mélange de myéloblastes et de monoblastes.

Ces analyses ont également été réalisées *ex vivo* après l'injection de la lignée par voie intraveineuse aux souris congéniques C57BL/6J (CD45.1+) et isolement des cellules médullaires après le développement de la leucémie chez 100% des souris. Celles-ci ont confirmé la présence d'un mélange de myéloblastes et de monoblastes leucémiques infiltrant la moelle osseuse de ces souris. La leucémie entraîne une diminution de l'ensemble des populations lymphoïdes et myéloïdes médullaires. Cette inhibition de l'hématopoïèse normale par la lignée C1498 a été précédemment démontré *in vitro* et ceci est également une caractéristique des LAM humaines.³³²

L'immunomarquage des cellules leucémiques via le CD45.2 et leur suivi par cytométrie en flux a montré une infiltration d'autres organes que la moelle osseuse tels que la rate, les poumons, ou le foie. En accord avec la LAM induite par la lignée C1498, l'infiltration extramédullaire est plus couramment retrouvée chez des patients atteints de LAM appartenant au sous-type M4 ou M5 de la classification FAB, c'est-à-dire des LAM à composante monocyttaire.³³⁵

Une infiltration leucémique supérieure à 20% a également été observée au niveau sanguin, ainsi qu'une augmentation du nombre de monocytes (monocytose). De façon comparable, la monocytose sanguine et/ou médullaire est retrouvée chez les patients atteints de LAM de type M4 ou M5.⁹⁵

Nous avons pu observer une augmentation de volume de certains organes infiltrés, c'est notamment le cas de la rate. Cette splénomégalie est provoquée par une forte infiltration leucémique (>30%) mais aussi par une augmentation des populations lymphocytaires, monocytaires et granulocytaires dans cet organe. Cette augmentation pourrait s'expliquer par un mécanisme d'hématopoïèse extramédullaire afin de palier au dysfonctionnement de la moelle osseuse. Ce mécanisme est notamment mis en jeu lors de l'embryogenèse où le foie fœtal et la rate assure l'hématopoïèse pendant le développement médullaire mais il est également déclenché lors d'une infection ou d'un cancer.³

L'ensemble de ces résultats atteste de l'origine myéloïde de ces cellules C1498 et montre que cette lignée induit une leucémie aiguë de type myélo-monocytaire pouvant se rapprocher d'une LAM humaine de type M4 dans la classification FAB.

Cette lignée est composée de sous-clones différents sur un plan génomique et immunogène ³³⁶

Chez les patients, les LAM sont caractérisées par une hétérogénéité clonale présente dès le diagnostic. Les nouvelles techniques de séquençage ont amélioré nos connaissances de ces maladies et ont permis la détection de plusieurs sous-clones génétiquement différents chez un même patient.^{13,337} De plus, une étude de Klco et ses collaborateurs a étudié les fonctionnalités de différents sous-clones leucémiques et a montré une différence dans leur capacité à s'implanter dans des souris immunodéficientes.⁸⁸

Ainsi, une dilution limite de la lignée C1498 a permis d'isoler 6 sous-clones (dénommés B11, C5, E2, E7, F1 et G10) et d'étudier leurs profils génomiques, ainsi que leurs capacités à induire la leucémie et une réponse immunitaire chez des souris syngéniques C57BL/6J ou immunodéficientes NOD-SCID. L'ensemble de ces 6 sous-clones conservent le phénotype de la lignée dont ils sont issus avec la présence de myéloblastes et de monoblastes confirmé après une coloration cellulaire au MGG et une analyse cytochimique des estérases. Du fait de la clonalité, ce mélange de myéloblastes et de monoblastes suggère fortement la présence de progéniteurs communs monocytaire-granulocytaire (GMP). Cependant, suite aux difficultés rencontrées lors de la mise au point d'une double coloration d'estérases, nous n'avons pu le confirmer.

Ces 6 sous-clones leucémiques induisent le développement de la leucémie chez la totalité des souris immunodéficientes avec une cinétique plus rapide pour les sous-clones E2, F1 et G10. L'injection de ces derniers dans des souris C57BL/6J entraîne également le décès de l'ensemble des souris. Cependant, les trois autres sous-clones (B11, C5 ou E7) entraînent une mortalité comprise entre 30 et 60% selon le sous-clone injecté dans ces souris immunocompétentes. Cela révèle l'existence d'une hétérogénéité clonale fonctionnelle au sein de cette lignée comme ce qui a été décrit chez les patients atteints de LAM.

De plus, les souris survivantes à cette injection présente une réponse lymphocytaire T cytotoxique spécifique du sous-clone et de la lignée C1498 et sont immunisées contre une seconde induction leucémique. Cette réponse immunitaire est donc capable d'empêcher le développement leucémique *de novo* et signifie certainement que les sous-clones B11, C5 et E7 sont plus immunogènes et sensibles à la lyse cytotoxique des lymphocytes T. Il doit donc exister des mécanismes déclenchés par les trois autres sous-clones qui empêchent cette réponse antitumorale. Des études sur la leucémie induite par la lignée C1498 ont montré la présence de lymphocytes T régulateurs (T reg) au niveau du site d'injection corrélée à une diminution de la prolifération et de la production d'IFN- γ des lymphocytes T. De plus, ils ont également montré

que ces lymphocytes T surexpriment la protéine PD-1 (program cell death 1) favorisant ainsi l'immunosuppression de ces cellules par les lymphocytes T reg. Enfin, lors du développement de la leucémie induite par la lignée C1498, une augmentation de la fréquence de lymphocytes T présentant un phénotype épuisé (PD1⁺Tim3⁺) a été mis en évidence. Cet épuisement altère leurs fonctions telles que la production de cytokines (TNF- α , IFN- γ et IL-2).^{338,339} L'ensemble de ces mécanismes peuvent représenter des explications à cette différence fonctionnelle existant entre ces sous-clones leucémiques. Ainsi, lors de la LAM induite par les cellules leucémiques C1498, certains sous-clones pourraient devenir majoritaires tels que les sous-clones E2, F1 ou G10 et favoriser l'échappement au système immunitaire.

Il est, aujourd'hui, reconnu qu'un gène muté peut entraîner la production de néoantigènes tumoraux, c'est notamment le cas des mutations *NPM1* ou *FLT3-ITD* qui induisent une réponse lymphocytaire CD4⁺ et CD8⁺.^{295,340} Puisqu'il existe une hétérogénéité moléculaire avec des mutations spécifiques à certains sous-clones, il est donc probable que certains d'entre-eux présentent des antigènes particuliers pouvant induire une réponse lymphocytaire efficace tandis que d'autres échappent à cette réponse immunitaire car n'exprimant pas ces antigènes. Une étude rétrospective des adénocarcinomes pulmonaires primaires a montré une corrélation positive entre une faible hétérogénéité néoantigénique au diagnostic et une survie globale augmentée. De plus, ils font un lien entre l'hétérogénéité clonale néoantigénique induite par la chimiothérapie et un pronostic thérapeutique défavorable.³⁴¹

Nous nous sommes donc demandé si ces sous-clones présentaient des aberrations génomiques particulières pouvant expliquer cette différence dans la cinétique leucémique et cette immunogénicité. Ainsi, une analyse comparative par hybridation génomique a été réalisée sur l'ensemble des ADNg isolés des sous-clones et de la lignée C1498. Celle-ci a révélé des différences entre les sous-clones telles que des délétions et des insertions géniques communes à certains sous-clones ou spécifiques à chacun d'eux. Il faudra maintenant associer ces résultats à des analyses de mutations afin d'évaluer les gènes pouvant être impliqués dans ces différences de développement leucémique et d'immunogénicité. L'analyse du transcriptome nous permettrait également de mettre en évidence des différences d'expression de gènes pouvant participer à ces mécanismes.

Développement du modèle de LAM et de MRD surexprimant ou non le gène *Wt1*

La cytarabine est l'un des principaux traitements utilisés lors de la phase d'induction et de consolidation chez les patients atteints de LAM.²⁷ Ainsi, nous avons administré la cytarabine à des souris C57BL/6J développant la LAM afin de favoriser leur survie et d'établir une MRD leucémique. Nous avons fait le choix d'écartier l'un des 6 sous-clones (G10) après l'analyse de sa sensibilité au traitement par chimiothérapie, puisqu'il s'est révélé nettement plus résistant à la cytarabine *in vitro* que les autres sous-clones.

Une expression stable du gène *Wt1* a été obtenue après transfection des 5 sous-clones leucémiques (B11, C5, E2, E7 et F1) et confirmation par RT-qPCR. Nous avons mis en place une méthode standardisée afin de normaliser l'expression de ce gène par rapport à un gène de référence (*Abl1*) à l'identique de ce qui est réalisé pour le diagnostic clinique et le suivi de la MRD chez les patients atteints de LAM. L'expression de ce gène dépasse les 39000 copies *Wt1*/10⁴ copies *Abl1* pour les sous-clones E2/WT1 et F1/WT1 tandis que le sous-clone B11/WT1 exprime le plus faiblement ce gène à hauteur de 4000 copies *Wt1*/10⁴ copies *Abl1*. L'expression de *Wt1* dans l'ensemble de ces sous-clones est dans l'intervalle d'expression retrouvée chez les patients atteints de LAM au diagnostic.¹³¹ De plus, la présence de la protéine WT1 a été confirmée par western-blot et par immunomarquage fluorescent. Ainsi, nous avons observé la surexpression des isoformes majeures de WT1 de 52 et 54 kDa correspondant aux isoformes comprenant ou non l'épissage de l'exon 5 et/ou des 3 acides aminés KTS et qui sont exprimées dans la moelle osseuse des patients atteints de LAM.¹⁶⁵ L'immunomarquage fluorescent nous a permis de mettre en évidence une localisation nucléaire de la protéine WT1 surexprimée, ce qui est en accord avec son rôle de facteur de transcription. De plus, certaines études ont montré une localisation cytoplasmique dans certains types cellulaires, ce qui est le cas pour ces sous-clones leucémiques pouvant suggérer une phosphorylation de la protéine ou un rôle dans la traduction des protéines.^{170,171,219}

L'analyse de sensibilité à la cytarabine a également été évaluée pour les sous-clones surexprimant le gène *Wt1* et celle-ci a montré une différence significative uniquement pour le sous-clone C5/WT1 qui semble plus sensible au traitement que les cellules non-transfectées (IC50 de 0,7365 versus 4,906 µg/mL). Ceci est en opposition avec la littérature puisque quelques études ont montré une chimiorésistance associée à l'expression du gène *Wt1*, notamment dans le cas des mésothéliums pleuraux ou dans les cancers du poumon non à petites cellules.^{342,343} Cependant, de nombreuses études s'étant intéressées à ce gène ont identifié des variations de fonctions de ce facteur de transcription selon les isoformes

exprimées et également selon le type cellulaire étudié pouvant donc impacter la sensibilité de ce sous-clone.

Dans un premier temps, nous avons choisi de mettre au point notre modèle de MRD leucémique à partir de l'injection d'un seul sous-clone surexprimant fortement *Wt1* et étant très sensible à la cytarabine, à savoir le sous-clone E2/WT1.

Ainsi, 3 quantités cellulaires (10^4 , 10^5 ou 10^6) ont été injectées par voie intraveineuse afin d'évaluer la cinétique de développement de la maladie chez des souris syngéniques C57BL/6J. Nous avons sélectionné la quantité de 100000 cellules pour l'injection puisqu'elle induisait la leucémie de manière homogène chez les souris. Une cinétique rapide mais nous laissant néanmoins une fenêtre d'intervention thérapeutique suffisante.

L'expression du gène *Wt1* dans le sang et la moelle osseuse des souris leucémiques a été estimée en moyenne à 11945 et 39815 copies *Wt1*/ 10^4 copies *Abl1*, respectivement. Cette expression s'apparente à une valeur élevée retrouvée chez les patients atteints de LAM au diagnostic.¹³¹

Nous souhaitons débiter le traitement par chimiothérapie dès l'arrivée des cellules leucémiques dans la moelle osseuse ou la circulation sanguine des souris. En effet, les patients atteints de LAM sont principalement diagnostiqués lors de l'apparition de signes et/ou symptômes déclenchés par le défaut d'hématopoïèse et l'envahissement leucémique de la moelle osseuse et du sang périphérique tels que la fatigue provoquée par l'anémie. Ainsi, nous avons étudié la cinétique d'infiltration des cellules leucémiques dans la moelle osseuse et le sang des souris injectées avec le sous-clone E2/WT1. Les analyses effectuées par cytométrie en flux ou RT-qPCR de l'expression de la protéine ZsGreen ou du gène *Wt1*, respectivement, ont révélé des infiltrations médullaires et sanguines tardives puisque la détection des cellules leucémiques n'a été possible qu'en fin de leucémie, ne nous permettant pas d'utiliser cette stratégie pour le traitement des souris. Nous avons donc évalué de manière plus empirique, différentes cinétiques d'injection de la cytarabine à ces souris en utilisant deux doses de chimiothérapie (100 ou 200 mg/kg/jour/souris). Le traitement des souris avec 1 injection par jour à 200 mg/kg/souris durant 3 jours consécutifs et débutant 10 jours après l'injection des cellules leucémiques a permis d'induire une survie prolongée de 11,1% des souris (3/27). Ces souris présentaient la persistance d'une faible quantité de cellules ZsGreen⁺ détectées par cytométrie en flux dans la moelle osseuse, 150 jours après l'injection du sous-clone E2/WT1.

Cette stratégie de traitement a ensuite été testée sur des mélanges de sous-clones du fait de l'hétérogénéité clonale observée chez les patients. Ainsi, une survie prolongée sans rechute a

été obtenue chez 39% des souris injectées avec un mélange constitué en quantité équivalente de 3 sous-clones (B11, C5 et E7) et traitées par chimiothérapie. Un suivi de la persistance leucémique a été réalisé par cytométrie en flux *via* l'expression de la protéine fluorescente ZsGreen pour l'ensemble des souris survivantes, permettant la détection de cellules résiduelles circulantes (en moyenne de 0,5%) jusqu'à plus de 100 jours post-injection des cellules leucémiques. Environ 5 mois après l'injection leucémique, nous avons sacrifié l'ensemble de ces souris survivantes afin de détecter des cellules résiduelles dans la moelle osseuse de celles-ci. L'expression de la ZsGreen a été analysée par RT-qPCR et était comprise entre 1,2 et 190,9 copies ZsGreen/10⁴ copies *Abl1* chez 4 souris survivantes sur 13. Une réduction de plus de 3 log a donc été observée par rapport à l'expression de la ZsGreen dans la moelle osseuse des souris leucémiques dont l'expression moyenne était de 96305 copies ZsGreen/10⁴ copies *Abl1*. Lors du suivi de la MRD par RT-qPCR, une diminution supérieure à 3 log de l'expression du gène *NPM1* ou du transcrite de fusion *RUNX1-RUNX1T1* entre le diagnostic et après traitement prédit un meilleur pronostic avec un risque de rechute plus faible chez ces patients.^{344,345} Une analyse par séquençage a permis de confirmer cette maladie résiduelle mesurable pour 40% d'entre-elles. Pour les autres souris, l'expression était soit en dessous du seuil de détection de la RT-qPCR déterminé à 10⁻⁴ (0,01%) ou alors ces souris avaient éliminé la leucémie.

Une fois le modèle de MRD obtenue avec le mélange des 3 sous-clones, nous avons utilisé le même protocole thérapeutique sur des souris injectées avec un mélange en quantité égale des 3 mêmes sous-clones surexprimant *Wt1* (B11/WT1, C5/WT1 et E7/WT1). L'injection de ce mélange cellulaire n'a pas induit la mort de la totalité des souris puisqu'une survie a été observée chez 40% d'entre-elles. Le nombre d'injections de cytarabine a donc été adapté afin d'obtenir une survie plus importante de souris après traitement (4 et 5 injections à la même dose et cinétique). L'expression du gène *Wt1* dans la moelle osseuse des souris traitées et survivantes (en moyenne 202,9 copies *Wt1*/10⁴ copies *Abl1*) était nettement plus faible que pour les souris leucémiques (en moyenne 1776 copies *Wt1*/10⁴ copies *Abl1*) mais plus forte que chez les souris survivantes à la leucémie et n'ayant pas reçu la cytarabine avec une moyenne de 9,367 copies *Wt1*/10⁴ copies *Abl1*. Cela signifie que la chimiothérapie favorise la persistance des cellules leucémiques.

Les souris ayant succombé à la leucémie (traitées ou non par chimiothérapie) ont présenté une expression du gène *Wt1* similaire au niveau médullaire mais l'expression au niveau sanguin était plus faible pour les souris traitées. Une des explications est l'accessibilité des cellules leucémiques circulantes à la chimiothérapie par rapport à celles installées au sein de la niche

hématopoïétique expliquant ainsi cette faible expression dans la circulation sanguine des souris traitées. En effet, la niche hématopoïétique participe à la protection des CSH et malheureusement des CSL et progéniteurs également, favorisant ainsi la résistance aux traitements et la persistance leucémique.^{5,346}

Ces deux modèles de LAM et de MRD ont été induits par l'injection d'un mélange de 3 sous-clones exprimant ou non le gène *Wt1*, ceci pouvant recréer une certaine hétérogénéité clonale comme décrit au diagnostic chez les patients leucémiques. Des études ont montré que les cellules persistantes et responsables de la rechute peuvent être soit un sous-clone majoritaire ayant acquis de nouvelles anomalies génétiques ou un sous-clone minoritaire n'ayant pas été éradiqué par le traitement et ayant également développé des mutations additionnelles favorisant la prolifération leucémique et la rechute.¹³ Ceci amène à nous demander si les cellules persistantes détectées dans les souris survivantes de ces deux modèles sont un mélange des 3 sous-clones de départ ou uniquement l'un ou deux d'entre-eux. De même, à l'image des leucémies humaines, ces sous-clones présentent-ils de nouvelles altérations génétiques ? Il sera donc intéressant, à plus long terme, d'isoler ces cellules résiduelles et de réaliser des analyses génomique, mutationnelle et/ou transcriptomique afin de répondre à ces questions.

Quel avenir pour ces modèles syngéniques et immun de LAM et MRD surexprimant ou non *Wt1*

Le modèle murin idéal serait un modèle reproduisant les caractéristiques génétiques et moléculaires de la LAM au sein d'un microenvironnement se rapprochant au plus près de celui présent chez les patients leucémiques. Ceci pour permettre d'étudier les mécanismes de la leucémogénèse, d'identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques et de tester l'efficacité de nouveaux traitements qui seraient transférables chez l'Homme. Différents types de modèles murins de LAM ont été développés tels que des modèles de souris transgéniques, de Knock-in, de Knock-out ou de xénogreffes. Ces modèles ont permis d'étudier la leucémogénèse en s'intéressant à des aberrations génétiques couramment retrouvées dans les LAM telles que la translocation t(8 ;21), l'inversion 16 ou impliquant le gène *MLL*.³⁴⁷ D'autres modèles se sont intéressés aux rôles de certaines mutations récurrentes (*FLT3-ITD*, *K-RAS*, *NPM1*) ou ont mis en évidence l'existence des cellules souches leucémiques.^{79,316,348}

Notamment, les chercheurs ont développé des modèles murins humanisés dans des souris immunodéficientes. Ces modèles reposent sur l'implantation dans des souris immunodéficientes, soit de cellules de patients leucémiques provenant du sang périphérique,

de la moelle osseuse ou de leucaphérèse, soit de CSH issues de patients sains préalablement transduites avec un gène ou une aberration d'intérêt dans la pathologie leucémique.³⁴⁹ Ceci afin d'étudier le potentiel de ces cellules leucémiques et également de tester l'efficacité de nouvelles immunothérapies *in vivo*. Cependant, pour que ces modèles soient possibles il est nécessaire de remplacer le système hématopoïétique et immunitaire murin par le système humain, cela passe notamment par une irradiation sub-léthale au préalable, des souris immunodéficientes ainsi que par l'ajout de cytokines, de facteurs supportant l'expansion et l'implantation des cellules humaines ou encore la co-transplantation de cellules de foie ou de thymus foetaux.^{350,351} Ces différentes manipulations afin d'obtenir un modèle humanisé optimale sont encore en cours d'optimisation.

Il existe une hétérogénéité d'implantation des cellules primaires de patients dans les souris « hôtes » puisqu'il a été mis en évidence que l'injection dans plusieurs souris immunodéficientes (NSG) de cellules mononuclées (CMN) issues du même patient n'entraînait pas une implantation et un développement cellulaire identique *in vivo*. De plus, ils ont montré dans ce même modèle que la transplantation des CMN favorisait l'amplification des lymphocytes T au détriment de l'implantation des cellules myéloïdes leucémiques.³⁵² Ce constat indique la difficulté d'étudier la pathologie leucémique *in vivo* en parallèle de la réponse immunitaire dans les modèles actuels de souris humanisées.

Plus récemment, une équipe a mis en place un modèle de maladie résiduelle utilisant la xénogreffe d'une lignée à cytogénétique normale et mutés *RUNX1* chez des souris immunodéficientes NOD-SCID. Le développement leucémique a été suivi et détecté au niveau médullaire, sanguin et splénique. Un traitement par chimiothérapie de ces souris a entraîné l'élimination des cellules au niveau sanguin et splénique mais une maladie résiduelle est restée détectable au niveau de la moelle osseuse. Les auteurs ont proposé d'étudier, grâce à ce modèle, les mécanismes de résistance au traitement et de nouvelles thérapies.³⁵³ Néanmoins, ce modèle de xénogreffes dans des souris immunodéficientes fait abstraction du système immunitaire qui est certainement un acteur essentiel dans la leucémogénèse, la sélection clonale et la maladie résiduelle leucémique.

C'est pourquoi, les deux modèles syngéniques et immuns de LAM et de MRD surexprimant ou non *Wt1* que nous avons développé vont permettre l'étude de l'implication de la réponse immunitaire dans la persistance leucémique. En effet, des études sur le lymphome ont montré que les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ pouvaient induire la quiescence des cellules tumorales par production d'IFN- γ et de TNF- α et donc provoquer leur résistance aux traitements.³¹¹⁻³¹³ Il

serait intéressant d'évaluer si ce mécanisme est mis en jeu dans les LAM et s'il pourrait causer la résistance à la chimiothérapie et la persistance leucémique. Une autre intervention de la réponse immunitaire pouvant expliquer la maladie résiduelle serait la création d'un équilibre entre la prolifération des cellules leucémiques et la lyse de celles-ci par les lymphocytes T cytotoxiques. L'intervention de mécanismes immunosuppresseurs, à un instant donné, favoriserait alors la croissance leucémique et la rechute tels que la présence de lymphocytes T régulateurs et de cellules myéloïdes suppressives.^{354,355}

Le modèle surexprimant la protéine WT1 pourra permettre d'étudier la réponse lymphocytaire T spécifique de cet antigène lors de la leucémie et la MRD. En effet, certains patients présentent au diagnostic des réponses lymphocytaires T cytotoxiques et humorales dirigées contre certains épitopes de cette protéine. Ces épitopes décrits chez les patients pour différentes molécules du HLA de classe I ou de classe II sont proches ou identiques à ceux décrits dans un contexte H-2b chez la souris C57BL/6J puisqu'il existe entre les séquences protéiques murine et humaine de WT1 une homologie supérieure à 90%.³¹⁹ Il serait donc intéressant d'étudier cette réponse lymphocytaire T. Certains épitopes reconnus au cours de la leucémie le sont-ils toujours pendant la MRD ? Existe-t-il d'autres épitopes de WT1 encore non décrits chez les patients pouvant induire une réponse lymphocytaire capable de reconnaître et lyser spécifiquement les cellules leucémiques ? Certains épitopes sont-ils impliqués dans l'établissement de la MRD ?

Mieux connaître ces mécanismes mis en jeu lors de la leucémie et la MRD permettrait d'envisager de nouvelles thérapies afin d'éliminer les cellules résiduelles chez ces patients atteints de LAM. L'efficacité et les effets de nouvelles thérapies pourrait tout à fait être étudiées dans ces nouveaux modèles de LAM et MRD.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rieger, M. A. & Schroeder, T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
2. Medvinsky, A., Rybtsov, S. & Taoudi, S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 1017–1031 (2011).
3. Kim, C. H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J. Blood Med.* **1**, 13–19 (2010).
4. Ho, M. S. H., Medcalf, R. L., Livesey, S. A. & Traianedes, K. The dynamics of adult haematopoiesis in the bone and bone marrow environment. *Br. J. Haematol.* **170**, 472–486 (2015).
5. Schepers, K., Campbell, T. B. & Passegué, E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* **16**, 254–267 (2015).
6. Sánchez-Aguilera, A. & Méndez-Ferrer, S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **74**, 579–590 (2017).
7. Cullen, P. Case of Splenitis Acutus in which the serum of the blood drawn from the arm had the appearance of milk. *The Edinburgh Medical and Surgical Journal* 169–171 (1811).
8. Freireich, E. J., Wiernik, P. H. & Steensma, D. P. The leukemias: a half-century of discovery. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 3463–3469 (2014).
9. Piller, G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br. J. Haematol.* **112**, 282–292 (2001).
10. Estey, E. & Döhner, H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**, 1894–1907 (2006).
11. Porcu, P. *et al.* Hyperleukocytic Leukemias and Leukostasis: A Review of Pathophysiology, Clinical Presentation and Management. *Leuk. Lymphoma* **39**, 1–18 (2000).
12. Welch, J. S. *et al.* The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **150**, 264–278 (2012).
13. Ding, L. *et al.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **481**, 506–510 (2012).
14. Monnereau, A. *et al.* *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim.* (Institut de veille sanitaire, 2013).
15. Gatta, G. *et al.* Burden and centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet—a population-based study. *Lancet Oncol.* **18**, 1022–1039 (2017).

16. Xie, M. *et al.* Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat. Med.* **20**, 1472–1478 (2014).
17. Monnereau, A. *et al.* *Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine, 1989-2013. Partie 2 – Hémopathies malignes.* (Institut de veille sanitaire, 2016).
18. Deschler, B. & Lübbert, M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer* **107**, 2099–2107 (2006).
19. Pagano, L., Caira, M., Fianchi, L. & Leone, G. Environmental risk factors for MDS/AML. *Hematol. Meet. Rep. Former. Haematol. Rep.* **2**, (2009).
20. Khalade, A., Jaakkola, M. S., Pukkala, E. & Jaakkola, J. J. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health* **9**, (2010).
21. Zeichner, S. B. & Arellano, M. L. Secondary Adult Acute Myeloid Leukemia: a Review of Our Evolving Understanding of a Complex Disease Process. *Curr. Treat. Options Oncol.* **16**, 37 (2015).
22. Appelbaum, F. R. Age and acute myeloid leukemia. *Blood* **107**, 3481–3485 (2006).
23. Felipe Rico, J., Hassane, D. C. & Guzman, M. L. Acute myelogenous leukemia stem cells: from Bench to Bedside. *Cancer Lett.* **338**, 4–9 (2013).
24. Hope, K. J., Jin, L. & Dick, J. E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat. Immunol.* **5**, 738–743 (2004).
25. Ishikawa, Y. *et al.* Comprehensive analysis of cooperative gene mutations between class I and class II in de novo acute myeloid leukemia. *Eur. J. Haematol.* **83**, 90–98 (2009).
26. Conway O'Brien, E., Prideaux, S. & Chevassut, T. The Epigenetic Landscape of Acute Myeloid Leukemia. *Advances in Hematology.* **10**, 79-85 (2014).
27. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
28. Carow, C. E. *et al.* Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood* **87**, 1089–1096 (1996).
29. Nakao, M. *et al.* Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **10**, 1911–1918 (1996).

30. Yamamoto, Y. *et al.* Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* **97**, 2434–2439 (2001).
31. Kiyoi, H. *et al.* Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* **12**, 1333–1337 (1998).
32. Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schwab, R., Schmieja, K. & Hiddemann, W. Overexpression and Constitutive Activation of FLT3 Induces STAT5 Activation in Primary Acute Myeloid Leukemia Blast Cells. *Cancer Res* **9**. 2140-2150 (2003).
33. Jan, M. *et al.* Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* **4**, 149ra118 (2012).
34. Mead, A. J. *et al.* FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **110**, 1262–1270 (2007).
35. Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D. & Shivakrupa, R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells Dayt. Ohio* **23**, 16–43 (2005).
36. Malaise, M., Steinbach, D. & Corbacioglu, S. Clinical implications of c-Kit mutations in acute myelogenous leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **4**, 77–82 (2009).
37. Bowen, D. T. *et al.* RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood* **106**, 2113–2119 (2005).
38. Illmer, T. *et al.* Activation of the RAS Pathway Is Predictive for a Chemosensitive Phenotype of Acute Myelogenous Leukemia Blasts. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3217–3224 (2005).
39. Pabst, T. & Mueller, B. U. Complexity of CEBPA dysregulation in human acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 5303–5307 (2009).
40. Avellino, R. & Delwel, R. Expression and regulation of C/EBP α in normal myelopoiesis and in malignant transformation. *Blood* **129**, 2083–2091 (2017).
41. Chim, C. S., Wong, A. S. Y. & Kwong, Y. L. Infrequent hypermethylation of CEBPA promotor in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **119**, 988–990 (2002).

42. Pabst, T. *et al.* AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat. Med.* **7**, 444–451 (2001).
43. Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G. & Downing, J. R. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**, 321–330 (1996).
44. Lam, K. & Zhang, D.-E. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **17**, 1120–1139 (2012).
45. Ohki, M. Molecular basis of the t(8;21) translocation in acute myeloid leukaemia. *Semin. Cancer Biol.* **4**, 369–375 (1993).
46. Anderson, K. L. *et al.* Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood* **91**, 3702–3710 (1998).
47. Mueller, B. U. *et al.* Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood* **100**, 998–1007 (2002).
48. Vangala, R. K. *et al.* The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood* **101**, 270–277 (2003).
49. Mueller, B. U. *et al.* ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood* **107**, 3330–3338 (2006).
50. Carvajal, L. A. & Manfredi, J. J. Another fork in the road--life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep.* **14**, 414–421 (2013).
51. Wong, T. N. *et al.* Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature* **518**, 552–555 (2015).
52. Quintás-Cardama, A. *et al.* p53 pathway dysfunction is highly prevalent in acute myeloid leukemia independent of TP53 mutational status. *Leukemia* **31**, 1296–1305 (2017).
53. Heath, E. M. *et al.* Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia* **31**, 798–807 (2017).
54. Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M. F. & Mecucci, C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* **109**, 874–885 (2007).

55. Leong, S. M. *et al.* Mutant nucleophosmin deregulates cell death and myeloid differentiation through excessive caspase-6 and -8 inhibition. *Blood* **116**, 3286–3296 (2010).
56. Challen, G. A. *et al.* Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **15**, 350–364 (2014).
57. Rasmussen, K. D. *et al.* Loss of TET2 in hematopoietic cells leads to DNA hypermethylation of active enhancers and induction of leukemogenesis. *Genes Dev.* **29**, 910–922 (2015).
58. Ley, T. J. *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2424–2433 (2010).
59. Qu, Y. *et al.* Differential methylation in CN-AML preferentially targets non-CGI regions and is dictated by DNMT3A mutational status and associated with predominant hypomethylation of HOX genes. *Epigenetics* **9**, 1108–1119 (2014).
60. Ferreira, H. J. *et al.* DNMT3A mutations mediate the epigenetic reactivation of the leukemogenic factor MEIS1 in acute myeloid leukemia. *Oncogene* **35**, 3079–3082 (2016).
61. Moran-Crusio, K. *et al.* Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* **20**, 11–24 (2011).
62. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–567 (2010).
63. Cimmino, L. *et al.* Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell* **170**, 1079-1095.e20 (2017).
64. Abdel-Wahab, O. *et al.* Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res.* **70**, 447–452 (2010).
65. Zink, F. *et al.* Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood* **130**, 742–752 (2017).
66. Abdel-Wahab, O. *et al.* Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* **114**, 144–147 (2009).
67. Langemeijer, S. M. C. *et al.* Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* **41**, 838–842 (2009).

68. Gross, S. *et al.* Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J. Exp. Med.* **207**, 339–344 (2010).
69. Chowdhury, R. *et al.* The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep.* **12**, 463–469 (2011).
70. Schnittger, S. *et al.* IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood* **116**, 5486–5496 (2010).
71. Green, C. L. *et al.* The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. *Blood* **116**, 2779–2782 (2010).
72. Eriksson, A., Lennartsson, A. & Lehmann, S. Epigenetic aberrations in acute myeloid leukemia: Early key events during leukemogenesis. *Exp. Hematol.* **43**, 609–624 (2015).
73. Milne, T. A. *et al.* MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol. Cell* **10**, 1107–1117 (2002).
74. Krivtsov, A. V. & Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 823–833 (2007).
75. Fisher, C. L. *et al.* Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. *Blood* **115**, 38–46 (2010).
76. Chou, W.-C. *et al.* Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood* **116**, 4086–4094 (2010).
77. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–648 (1994).
78. Blair, A., Hogge, D. E., Ailles, L. E., Lansdorp, P. M. & Sutherland, H. J. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* **89**, 3104–3112 (1997).
79. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737 (1997).

80. Turhan, A. G. *et al.* Highly purified primitive hematopoietic stem cells are PML-RARA negative and generate nonclonal progenitors in acute promyelocytic leukemia. *Blood* **85**, 2154–2161 (1995).
81. Taussig, D. C. *et al.* Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood* **115**, 1976–1984 (2010).
82. Quek, L. *et al.* Genetically distinct leukemic stem cells in human CD34- acute myeloid leukemia are arrested at a hemopoietic precursor-like stage. *J. Exp. Med.* **213**, 1513–1535 (2016).
83. Passegué, E., Jamieson, C. H. M., Ailles, L. E. & Weissman, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100 Suppl 1**, 11842–11849 (2003).
84. Jaiswal, S. *et al.* Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2488–2498 (2014).
85. Genovese, G. *et al.* Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2477–2487 (2014).
86. Desai, P. *et al.* Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat. Med.* **24**, 1015–1023 (2018).
87. Li, S., Mason, C. E. & Melnick, A. Genetic and epigenetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **36**, 100–106 (2016).
88. Klco, J. M. *et al.* Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **25**, 379–392 (2014).
89. Corces-Zimmerman, M. R., Hong, W.-J., Weissman, I. L., Medeiros, B. C. & Majeti, R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 2548–2553 (2014).
90. Bachas, C. *et al.* The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse. *Leukemia* **26**, 1313–1320 (2012).
91. Weir, E. G. & Borowitz, M. J. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Semin. Hematol.* **38**, 124–138 (2001).

92. Zeijlemaker, W. *et al.* Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **30**, 708–715 (2016).
93. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937–951 (2009).
94. 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* **115**, 453–474 (2010).
95. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br. J. Haematol.* **33**, 451–458 (1976).
96. Neame, P. B. *et al.* Classifying Acute Leukemia by Immunophenotyping: A Combined FAB-Immunologic Classification of AML. *Blood* **68**, 1355–1362 (1986).
97. Haferlach, T., Bacher, U., Thöml, H. & Diem, H. *Atlas de poche Hématologie*. (Lavoisier, 2013).
98. Juliusson, G. *et al.* Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood* **119**, 3890–3899 (2012).
99. Buckley, S. A., Othus, M., Estey, E. H. & Walter, R. B. The Treatment Related Mortality Score Predicts Early Adverse Events during Intensive Induction Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* **124**, 2276–2276 (2014).
100. Dombret, H. & Gardin, C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* **127**, 53–61 (2016).
101. Cheson, B. D. *et al.* Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **8**, 813–819 (1990).
102. Burnett, A. K. *et al.* Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 3360–3368 (2013).

103. Löwenberg, B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 26–28 (2013).
104. Linker, C. A. Autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **31**, 731–738 (2003).
105. Stone, R. M. *et al.* Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 454–464 (2017).
106. Smith, C. C. *et al.* Heterogeneous resistance to quizartinib in acute myeloid leukemia revealed by single-cell analysis. *Blood* **130**, 48–58 (2017).
107. Gallipoli, P., Giotopoulos, G. & Huntly, B. J. P. Epigenetic regulators as promising therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Ther. Adv. Hematol.* **6**, 103–119 (2015).
108. Stein, E. M. *et al.* Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood* **130**, 722–731 (2017).
109. Intlekofer, A. M. *et al.* Acquired resistance to IDH inhibition through trans or cis dimer-interface mutations. *Nature* **559**, 125–129 (2018).
110. DiNardo, C. D. *et al.* Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2386–2398 (2018).
111. Quek, L. *et al.* Clonal heterogeneity of acute myeloid leukemia treated with the IDH2 inhibitor enasidenib. *Nat. Med.* **24**, 1167–1177 (2018).
112. Austin, R., Smyth, M. J. & Lane, S. W. Harnessing the immune system in acute myeloid leukaemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **103**, 62–77 (2016).
113. He, S. Z. *et al.* A Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics and anti-leukemic activity of the anti-CD123 monoclonal antibody CSL360 in relapsed, refractory or high-risk acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **56**, 1406–1415 (2015).
114. Kovtun, Y. *et al.* A CD123-targeting antibody-drug conjugate, IMG632, designed to eradicate AML while sparing normal bone marrow cells. *Blood Adv.* **2**, 848–858 (2018).
115. Boddu, P. *et al.* The emerging role of immune checkpoint based approaches in AML and MDS. *Leuk. Lymphoma* **59**, 790–802 (2018).

116. Greiner, J., Bullinger, L., Guinn, B., Döhner, H. & Schmitt, M. Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 7161–7166 (2008).
117. Gill, S., Maus, M. V. & Porter, D. L. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25years in the making. *Blood Rev.* **30**, 157–167 (2016).
118. Kenderian, S. S. *et al.* CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 1637–1647 (2015).
119. Cartellieri, M. *et al.* Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer J.* **6**, e458 (2016).
120. Martínez-Cuadrón, D. *et al.* A phase I-II study of plerixafor in combination with fludarabine, idarubicin, cytarabine, and G-CSF (PLERIFLAG regimen) for the treatment of patients with the first early-relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* **97**, 763–772 (2018).
121. Lowenberg, B. Strategies in the treatment of acute myeloid leukemia. *Haematologica* **89**, 1029–1032 (2004).
122. Mordant, P. *et al.* Minimal residual disease in solid neoplasia: New frontier or red-herring? *Cancer Treat. Rev.* **38**, 101–110 (2012).
123. Schuurhuis, G. J. *et al.* Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* **131**, 1275–1291 (2018).
124. Mathé, G. & Reizenstein, P. Managing minimal residual malignant disease. *Oncology* **43**, 137–142 (1986).
125. Lee, M. S. *et al.* Detection of minimal residual bcr/abl transcripts by a modified polymerase chain reaction. *Blood* **72**, 893–897 (1988).
126. Ravandi, F., Walter, R. B. & Freeman, S. D. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* **2**, 1356–1366 (2018).
127. Hourigan, C. S. & Karp, J. E. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 460–471 (2013).

128. Chen, X. *et al.* Relation of clinical response and minimal residual disease and their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 1258–1264 (2015).
129. Jongen-Lavrencic, M. *et al.* Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1189–1199 (2018).
130. Maurillo, L. *et al.* Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow. *Haematologica* **92**, 605–611 (2007).
131. Cilloni, D. *et al.* Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5195–5201 (2009).
132. Vedula, R. S. & Lindsley, R. C. Measurement of Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **12**, 574–581 (2017).
133. Greaves, M. F. Proceedings: Surface antigens of leukaemic cells. *Br. J. Cancer* **32**, 280–281 (1975).
134. Baker, M. A., Ramachandar, K. & Taub, R. N. Specificity of heteroantisera to human acute leukemia-associated antigens. *J. Clin. Invest.* **54**, 1273–1278 (1974).
135. San Miguel, J. F. *et al.* Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* **98**, 1746–1751 (2001).
136. Feller, N. *et al.* MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* **18**, 1380–1390 (2004).
137. Baer, M. R. *et al.* High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* **97**, 3574–3580 (2001).
138. Freeman, S. D. *et al.* Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 4123–4131 (2013).

139. Kern, W. *et al.* Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **104**, 3078–3085 (2004).
140. Yin, J. A. L. *et al.* Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood* **120**, 2826–2835 (2012).
141. Zhu, H.-H. *et al.* MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood* **121**, 4056–4062 (2013).
142. Busque, L., Buscarlet, M., Mollica, L. & Levine, R. L. Concise Review: Age-Related Clonal Hematopoiesis: Stem Cells Tempting the Devil. *Stem Cells Dayt. Ohio* **36**, 1287–1294 (2018).
143. Krönke, J. *et al.* Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 2709–2716 (2011).
144. Ivey, A. *et al.* Molecular Detection of Minimal Residual Disease Provides the Most Powerful Independent Prognostic Factor Irrespective of Clonal Architecture in Nucleophosmin (NPM1) Mutant Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **124**, 70–70 (2014).
145. Charlton, J. & Pritchard-Jones, K. WT1 Mutation in Childhood Cancer in The Wilms' Tumor (WT1) Gene. *Methods in Molecular Biology* **1467**, 1–14 (2016).
146. Park, S. *et al.* Inactivation of WT1 in nephrogenic rests, genetic precursors to Wilms' tumour. *Nat. Genet.* **5**, 363–367 (1993).
147. Gessler, M. *et al.* Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* **343**, 774–778 (1990).
148. Rose, E. A. *et al.* Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms' tumor gene. *Cell* **60**, 495–508 (1990).
149. Knudson, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 820–823 (1971).

150. Berger, A. H., Knudson, A. G. & Pandolfi, P. P. A continuum model for tumour suppression. *Nature* **476**, 163–169 (2011).
151. Call, K. M. *et al.* Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* **60**, 509–520 (1990).
152. Haber, D. A. *et al.* An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* **61**, 1257–1269 (1990).
153. Oji, Y. *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci.* **95**, 822–827 (2004).
154. Oji, Y. *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* **95**, 583–587 (2004).
155. Miyoshi, Y. *et al.* High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 1167–1171 (2002).
156. Ueda, T. *et al.* Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Sci.* **94**, 271–276 (2003).
157. Koesters, R. *et al.* WT1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by in vitro stimulated cytotoxic T cells. *Int. J. Cancer* **109**, 385–392 (2004).
158. King-Underwood, L. & Pritchard-Jones, K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* **91**, 2961–2968 (1998).
159. Summers, K. *et al.* Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia* **21**, 550–551; author reply 552 (2007).
160. Haber, D. A. *et al.* Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 9618–9622 (1991).
161. Bruening, W. & Pelletier, J. A Non-AUG Translational Initiation Event Generates Novel WT1 Isoforms. *J. Biol. Chem.* **271**, 8646–8654 (1996).
162. Scharnhorst, V., Dekker, P., van der Eb, A. J. & Jochemsen, A. G. Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J. Biol. Chem.* **274**, 23456–23462 (1999).

163. Dallosso, A. R. *et al.* Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 405–415 (2004).
164. Toska, E. & Roberts, S. G. E. Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1). *Biochem. J.* **461**, 15–32 (2014).
165. Kramarzova, K. *et al.* Real-time PCR quantification of major Wilms' tumor gene 1 (WT1) isoforms in acute myeloid leukemia, their characteristic expression patterns and possible functional consequences. *Leukemia* **26**, 2086–2095 (2012).
166. Renshaw, J., King-Underwood, L. & Pritchard-Jones, K. Differential splicing of exon 5 of the Wilms tumour (WT1) gene. *Genes. Chromosomes Cancer* **19**, 256–266 (1997).
167. Tatsumi, N. *et al.* Identification of a Novel C-Terminal Truncated WT1 Isoform with Antagonistic Effects against Major WT1 Isoforms. *PLoS One* **10**, e0130578 (2015).
168. Sharma, P. M., Bowman, M., Madden, S. L., Rauscher, F. J. & Sukumar, S. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev.* **8**, 720–731 (1994).
169. Smolen, G. A., Vassileva, M. T., Wells, J., Matunis, M. J. & Haber, D. A. SUMO-1 modification of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Cancer Res.* **64**, 7846–7851 (2004).
170. Ye, Y., Raychaudhuri, B., Gurney, A., Campbell, C. E. & Williams, B. R. Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *EMBO J.* **15**, 5606–5615 (1996).
171. Sakamoto, Y., Yoshida, M., Semba, K. & Hunter, T. Inhibition of the DNA-binding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1, by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene* **15**, 2001–2012 (1997).
172. Wang, Z. Y., Qiu, Q. Q. & Deuel, T. F. The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J. Biol. Chem.* **268**, 9172–9175 (1993).
173. Drummond, I. A. *et al.* Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* **257**, 674–678 (1992).

174. Holmes, G. *et al.* Two N-terminal self-association domains are required for the dominant negative transcriptional activity of WT1 Denys-Drash mutant proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 723–728 (1997).
175. Moffett, P. *et al.* Antagonism of WT1 activity by protein self-association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11105–11109 (1995).
176. Reddy, J. C. *et al.* WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 10878–10884 (1995).
177. Reddy, J. C. & Licht, J. D. The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1287**, 1–28 (1996).
178. Pritchard-Jones, K. & King-Underwood, L. The Wilms tumour gene WT1 in leukaemia. *Leuk. Lymphoma* **27**, 207–220 (1997).
179. Wang, D. *et al.* Role for first zinc finger of WT1 in DNA sequence specificity: Denys-Drash syndrome-associated WT1 mutant in ZF1 enhances affinity for a subset of WT1 binding sites. *Nucleic Acids Res.* **46**, 3864–3877 (2018).
180. Stoll, R. *et al.* Structure of the Wilms Tumor Suppressor Protein Zinc Finger Domain Bound to DNA. *J. Mol. Biol.* **372**, 1227–1245 (2007).
181. Ladomery, M., Sommerville, J., Woolner, S., Slight, J. & Hastie, N. Expression in *Xenopus* oocytes shows that WT1 binds transcripts in vivo, with a central role for zinc finger one. *J. Cell Sci.* **116**, 1539–1549 (2003).
182. Yang, L., Han, Y., Suarez Saiz, F., Saurez Saiz, F. & Minden, M. D. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* **21**, 868–876 (2007).
183. Mundlos, S. *et al.* Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* **119**, 1329–1341 (1993).
184. Larsson, S. H. *et al.* Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* **81**, 391–401 (1995).
185. Laity, J. H., Chung, J., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes. *Biochemistry* **39**, 5341–5348 (2000).

186. Bruening, W., Moffett, P., Chia, S., Heinrich, G. & Pelletier, J. Identification of nuclear localization signals within the zinc fingers of the WT1 tumor suppressor gene product. *FEBS Lett.* **393**, 41–47 (1996).
187. Rauscher, F. J., Morris, J. F., Tournay, O. E., Cook, D. M. & Curran, T. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* **250**, 1259–1262 (1990).
188. Hamilton, T. B., Barilla, K. C. & Romaniuk, P. J. High affinity binding sites for the Wilms' tumour suppressor protein WT1. *Nucleic Acids Res.* **23**, 277–284 (1995).
189. Nakagama, H., Heinrich, G., Pelletier, J. & Housman, D. E. Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1489–1498 (1995).
190. Wang, Z. Y., Qiu, Q. Q., Enger, K. T. & Deuel, T. F. A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8896–8900 (1993).
191. Wells, J., Rivera, M. N., Kim, W. J., Starbuck, K. & Haber, D. A. The predominant WT1 isoform (+KTS) encodes a DNA-binding protein targeting the planar cell polarity gene Scribble in renal podocytes. *Mol. Cancer Res. MCR* **8**, 975–985 (2010).
192. Goodyer, P., Dehbi, M., Torban, E., Bruening, W. & Pelletier, J. Repression of the retinoic acid receptor-alpha gene by the Wilms' tumor suppressor gene product, wt1. *Oncogene* **10**, 1125–1129 (1995).
193. Dey, B. R. *et al.* Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **8**, 595–602 (1994).
194. Dame, C. *et al.* Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood* **107**, 4282–4290 (2006).
195. Englert, C. *et al.* WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J.* **14**, 4662–4675 (1995).
196. Nichols, K. E., Re, G. G., Yan, Y. X., Garvin, A. J. & Haber, D. A. WT1 induces expression of insulin-like growth factor 2 in Wilms' tumor cells. *Cancer Res.* **55**, 4540–4543 (1995).
197. Duarte, A., Caricasole, A., Graham, C. F. & Ward, A. Wilms' tumour-suppressor protein isoforms have opposite effects on Igf2 expression in primary embryonic cells, independently of p53 genotype. *Br. J. Cancer* **77**, 253–259 (1998).

198. Harrington, M. A. *et al.* Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. *J. Biol. Chem.* **268**, 21271–21275 (1993).
199. Andikyan, V. & Taylor, H. S. WT1 represses HOX gene expression in the regulation of gynaecologic tumour histologic type. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 4522–4531 (2009).
200. Englert, C., Maheswaran, S., Garvin, A. J., Kreidberg, J. & Haber, D. A. Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res.* **57**, 1429–1434 (1997).
201. McCann, S., Sullivan, J., Guerra, J., Arcinas, M. & Boxer, L. M. Repression of the c-myc gene by WT1 protein in T and B cell lines. *J. Biol. Chem.* **270**, 23785–23789 (1995).
202. Mayo, M. W. *et al.* WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J.* **18**, 3990–4003 (1999).
203. Han, Y., San-Marina, S., Liu, J. & Minden, M. D. Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by WT1 protein. *Oncogene* **23**, 6933–6941 (2004).
204. Udtha, M., Lee, S.-J., Alam, R., Coombes, K. & Huff, V. Upregulation of c-MYC in WT1-mutant tumors: assessment of WT1 putative transcriptional targets using cDNA microarray expression profiling of genetically defined Wilms' tumors. *Oncogene* **22**, 3821–3826 (2003).
205. Simpson, L. A. *et al.* The antiapoptotic gene A1/BFL1 is a WT1 target gene that mediates granulocytic differentiation and resistance to chemotherapy. *Blood* **107**, 4695–4702 (2006).
206. Szemes, M. *et al.* Control of epigenetic states by WT1 via regulation of de novo DNA methyltransferase 3A. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 74–83 (2013).
207. McCoy, C., McGee, S. B. & Cornwell, M. M. The Wilms' tumor suppressor, WT1, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the multidrug resistance-1 promoter. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 377–386 (1999).
208. Marcet-Palacios, M. *et al.* The transcription factor Wilms tumor 1 regulates matrix metalloproteinase-9 through a nitric oxide-mediated pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 256–265 (2007).
209. Laity, J. H., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11932–11935 (2000).

210. Caricasole, A. *et al.* RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7562–7566 (1996).
211. Nurmehmedov, E., Yengo, R. K., Ladomery, M. R. & Thunnissen, M. M. G. M. Kinetic behaviour of WT 1's zinc finger domain in binding to the alpha-actinin-1 mRNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **497**, 21–27 (2010).
212. Kennedy, D., Ramsdale, T., Mattick, J. & Little, M. An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling. *Nat. Genet.* **12**, 329–331 (1996).
213. Bharathavikru, R. *et al.* Transcription factor Wilms' tumor 1 regulates developmental RNAs through 3' UTR interaction. *Genes Dev.* **31**, 347–352 (2017).
214. Ladomery, M. R., Slight, J., Mc Ghee, S. & Hastie, N. D. Presence of WT1, the Wilm's tumor suppressor gene product, in nuclear poly(A)(+) ribonucleoprotein. *J. Biol. Chem.* **274**, 36520–36526 (1999).
215. Davies, R. C. *et al.* WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev.* **12**, 3217–3225 (1998).
216. Little, N. A., Hastie, N. D. & Davies, R. C. Identification of WTAP, a novel Wilms' tumour 1-associated protein. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2231–2239 (2000).
217. Markus, M. A. *et al.* WT1 interacts with the splicing protein RBM4 and regulates its ability to modulate alternative splicing in vivo. *Exp. Cell Res.* **312**, 3379–3388 (2006).
218. Ortega, A. *et al.* Biochemical function of female-lethal (2)D/Wilms' tumor suppressor-1-associated proteins in alternative pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* **278**, 3040–3047 (2003).
219. Niksic, M., Slight, J., Sanford, J. R., Caceres, J. F. & Hastie, N. D. The Wilms' tumour protein (WT1) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in functional polysomes. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 463–471 (2004).
220. Bor, Y. *et al.* The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes Dev.* **20**, 1597–1608 (2006).
221. Armstrong, J. F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W. A., Hastie, N. D. & Bard, J. B. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.* **40**, 85–97 (1993).
222. Kreidberg, J. A. *et al.* WT-1 is required for early kidney development. *Cell* **74**, 679–691 (1993).

223. Motamedi, F. J. *et al.* WT1 controls antagonistic FGF and BMP-pSMAD pathways in early renal progenitors. *Nat. Commun.* **5**, 4444 (2014).
224. Sim, E. U.-H. *et al.* Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene* **21**, 2948–2960 (2002).
225. Ryan, G., Steele-Perkins, V., Morris, J. F., Rauscher, F. J. & Dressler, G. R. Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Dev. Camb. Engl.* **121**, 867–875 (1995).
226. Wagner, N., Wagner, K.-D., Xing, Y., Scholz, H. & Schedl, A. The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **15**, 3044–3051 (2004).
227. Hammes, A. *et al.* Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* **106**, 319–329 (2001).
228. Hossain, A. & Saunders, G. F. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J. Biol. Chem.* **276**, 16817–16823 (2001).
229. Rao, M. K. *et al.* Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes Dev.* **20**, 147–152 (2006).
230. Hsu, S. Y. *et al.* Wilms' tumor protein WT1 as an ovarian transcription factor: decreases in expression during follicle development and repression of inhibin-alpha gene promoter. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **9**, 1356–1366 (1995).
231. Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N. D. & Schedl, A. YAC complementation shows a requirement for *Wt1* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 1845–1857 (1999).
232. Martínez-Estrada, O. M. *et al.* *Wt1* is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat. Genet.* **42**, 89–93 (2010).
233. Herzer, U., Crocoll, A., Barton, D., Howells, N. & Englert, C. The Wilms tumor suppressor gene *wt1* is required for development of the spleen. *Curr. Biol.* **9**, S1 (1999).
234. Rackley, R. R. *et al.* Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **4**, 1023–1031 (1993).

235. Wagner, K.-D. *et al.* The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *EMBO J.* **21**, 1398–1405 (2002).
236. Cano, E., Carmona, R. & Muñoz-Chápuli, R. Wt1-expressing progenitors contribute to multiple tissues in the developing lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **305**, L322-332 (2013).
237. Ijpenberg, A. *et al.* Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev. Biol.* **312**, 157–170 (2007).
238. Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Glaser, T. & Housman, D. E. Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1707–1712 (1991).
239. Fraizer, G. C., Patmasiriwat, P., Zhang, X. & Saunders, G. F. Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow [letter]. *Blood* **86**, 4704–4706 (1995).
240. Menssen, H. D., Renkl, H. J., Entezami, M. & Thiel, E. Wilms' tumor gene expression in human CD34+ hematopoietic progenitors during fetal development and early clonogenic growth. *Blood* **89**, 3486–3487 (1997).
241. Hosen, N. *et al.* The Wilms' tumor gene WT1-GFP knock-in mouse reveals the dynamic regulation of WT1 expression in normal and leukemic hematopoiesis. *Leukemia* **21**, 1783–1791 (2007).
242. Huff, V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 111–121 (2011).
243. Phelan, S. A., Lindberg, C. & Call, K. M. Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is down-regulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **5**, 677–686 (1994).
244. Sekiya, M., Adachi, M., Hinoda, Y., Imai, K. & Yachi, A. Downregulation of Wilms' tumor gene (wt1) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells. *Blood* **83**, 1876–1882 (1994).
245. Loeb, D. M. *et al.* An isoform of the Wilms' tumor suppressor gene potentiates granulocytic differentiation. *Leukemia* **17**, 965–971 (2003).
246. Svensson, E. *et al.* DNA-binding dependent and independent functions of WT1 protein during human hematopoiesis. *Exp. Cell Res.* **308**, 211–221 (2005).

247. Inoue, K. *et al.* Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* **91**, 2969–2976 (1998).
248. Tsuboi, A. *et al.* Constitutive expression of the Wilms' tumor gene WT1 inhibits the differentiation of myeloid progenitor cells but promotes their proliferation in response to granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Leuk. Res.* **23**, 499–505 (1999).
249. Svedberg, H., Richter, J. & Gullberg, U. Forced expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene inhibits proliferation of human hematopoietic CD34(+) progenitor cells. *Leukemia* **15**, 1914–1922 (2001).
250. Ellisen, L. W., Carlesso, N., Cheng, T., Scadden, D. T. & Haber, D. A. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J.* **20**, 1897–1909 (2001).
251. King-Underwood, L. *et al.* Wt1 is not essential for hematopoiesis in the mouse. *Leuk. Res.* **29**, 803–812 (2005).
252. Alberta, J. A. *et al.* Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis. *Blood* **101**, 2570–2574 (2003).
253. Kirschner, K. M. *et al.* The Wilms' tumor suppressor Wt1 activates transcription of the erythropoietin receptor in hematopoietic progenitor cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 2690–2701 (2008).
254. Vidovic, K. *et al.* Wilms' tumor gene 1 protein represses the expression of the tumor suppressor interferon regulatory factor 8 in human hematopoietic progenitors and in leukemic cells. *Leukemia* **24**, 992–1000 (2010).
255. Hosen, N. *et al.* Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **116**, 409–420 (2002).
256. Inoue, K. *et al.* Aberrant Overexpression of the Wilms Tumor Gene (WT1) in Human Leukemia. *Blood* **89**, 1405–1412 (1997).
257. King-Underwood, L., Renshaw, J. & Pritchard-Jones, K. Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood* **87**, 2171–2179 (1996).

258. Hou, H.-A. *et al.* WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood* **115**, 5222–5231 (2010).
259. Vidovic, K. *et al.* Leukemia associated mutant Wilms' tumor gene 1 protein promotes expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Res.* **37**, 1341–1349 (2013).
260. Gaidzik, V. I. *et al.* Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood* **113**, 4505–4511 (2009).
261. Krauth, M.-T. *et al.* WT1 mutations are secondary events in AML, show varying frequencies and impact on prognosis between genetic subgroups. *Leukemia* **29**, 660–667 (2015).
262. Paschka, P. *et al.* Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 4595–4602 (2008).
263. Virappane, P. *et al.* Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 5429–5435 (2008).
264. Smith, S. I., Weil, D., Johnson, G. R., Boyd, A. W. & Li, C. L. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, is upregulated by leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood* **91**, 764–773 (1998).
265. Smith, S. I., Down, M., Boyd, A. W. & Li, C. L. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, reduces the tumorigenicity of the leukemic cell line M1 in C.B-17 scid/scid mice. *Cancer Res.* **60**, 808–814 (2000).
266. Murata, Y., Kudoh, T., Sugiyama, H., Toyoshima, K. & Akiyama, T. The Wilms tumor suppressor gene WT1 induces G1 arrest and apoptosis in myeloblastic leukemia M1 cells. *FEBS Lett.* **409**, 41–45 (1997).
267. Wang, Y. *et al.* WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation. *Mol. Cell* **57**, 662–673 (2015).

268. Lyu, Y. *et al.* Dysfunction of the WT1-MEG3 signaling promotes AML leukemogenesis via p53-dependent and -independent pathways. *Leukemia* **31**, 2543–2551 (2017).
269. Ueda, Y. *et al.* Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma* **54**, 1450–1458 (2013).
270. Bergmann, L. *et al.* High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood* **90**, 1217–1225 (1997).
271. Nishida, S. *et al.* AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood* **107**, 3303–3312 (2006).
272. Li, Y. *et al.* Role of the Wilms' tumor 1 gene in the aberrant biological behavior of leukemic cells and the related mechanisms. *Oncol. Rep.* **32**, 2680–2686 (2014).
273. Yamagami, T. *et al.* Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood* **87**, 2878–2884 (1996).
274. Glienke, W. *et al.* Effective treatment of leukemic cell lines with wt1 siRNA. *Leukemia* **21**, 2164–2170 (2007).
275. Algar, E. M. *et al.* A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene* **12**, 1005–1014 (1996).
276. Ito, K. *et al.* Antiapoptotic function of 17AA(+)WT1 (Wilms' tumor gene) isoforms on the intrinsic apoptosis pathway. *Oncogene* **25**, 4217–4229 (2006).
277. Deuel, T. F., Guan, L. S. & Wang, Z. Y. Wilms' tumor gene product WT1 arrests macrophage differentiation of HL-60 cells through its zinc-finger domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 192–196 (1999).
278. Svedberg, H., Chylicki, K., Baldetorp, B., Rauscher, F. J. & Gullberg, U. Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. *Oncogene* **16**, 925–932 (1998).
279. Østergaard, M., Olesen, L. H., Hasle, H., Kjeldsen, E. & Hokland, P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70% of acute myeloid leukaemia patients - results from a single-centre study. *Br. J. Haematol.* **125**, 590–600 (2004).

280. Cilloni, D. *et al.* Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia* **16**, 2115–2121 (2002).
281. Inoue, K. *et al.* WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* **84**, 3071–3079 (1994).
282. Hämäläinen, M. M. *et al.* Wilms tumour gene 1 overexpression in bone marrow as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Eur. J. Haematol.* **80**, 201–207 (2008).
283. Weisser, M. *et al.* Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **19**, 1416–1423 (2005).
284. Alonso-Dominguez, J. M. *et al.* Correlation of WT1 expression with the burden of total and residual leukemic blasts in bone marrow samples of acute myeloid leukemia patients. *Cancer Genet.* **205**, 190–191 (2012).
285. Gabert, J. *et al.* Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318–2357 (2003).
286. Andersson, C. *et al.* Reduction in WT1 gene expression during early treatment predicts the outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* **21**, 225–233 (2012).
287. Lambert, J. *et al.* MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin. *Oncotarget* **5**, 6280–6288 (2014).
288. Nomdedéu, J. F. *et al.* Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML. *Leukemia* **27**, 2157–2164 (2013).
289. Lapillonne, H. *et al.* High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 1507–1515 (2006).
290. Candoni, A. *et al.* Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Eur. J. Haematol.* **82**, 61–68 (2009).

291. Kwon, M. *et al.* Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: correlation with flow cytometry and chimerism. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **18**, 1235–1242 (2012).
292. Ogawa, H. *et al.* The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood* **101**, 1698–1704 (2003).
293. Zhao, X.-S. *et al.* Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* **47**, 499–507 (2012).
294. Rautenberg, C. *et al.* Wilms' Tumor 1 Gene Expression Using a Standardized European LeukemiaNet-Certified Assay Compared to Other Methods for Detection of Minimal Residual Disease in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia after Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **24**, 2337-2343 (2018).
295. Anguille, S., Van Tendeloo, V. F. & Berneman, Z. N. Leukemia-associated antigens and their relevance to the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Leukemia* **26**, 2186–2196 (2012).
296. Cheever, M. A. *et al.* The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 5323–5337 (2009).
297. Gaiger, A., Reese, V., Disis, M. L. & Cheever, M. A. Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **96**, 1480–1489 (2000).
298. Gaiger, A. *et al.* WT1-specific serum antibodies in patients with leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7**, 761s-765s (2001).
299. Scheibenbogen, C. *et al.* CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **100**, 2132–2137 (2002).
300. Rezvani, K. *et al.* T-cell responses directed against multiple HLA-A*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: identification, quantification, and characterization. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 8799–8807 (2005).

301. Casalegno-Garduño, R. *et al.* Immune responses to WT1 in patients with AML or MDS after chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *Int. J. Cancer* **138**, 1792–1801 (2016).
302. Tsuboi, A. *et al.* Cytotoxic T-lymphocyte responses elicited to Wilms' tumor gene WT1 product by DNA vaccination. *J. Clin. Immunol.* **20**, 195–202 (2000).
303. Tsuboi, A. *et al.* Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **51**, 614–620 (2002).
304. Maslak, P. G. *et al.* Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T-cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood* **116**, 171–179 (2010).
305. Maslak, P. G. *et al.* Phase 2 trial of a multivalent WT1 peptide vaccine (galinpepimut-S) in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* **2**, 224–234 (2018).
306. Van Tendeloo, V. F. *et al.* Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13824–13829 (2010).
307. Damdinsuren, A. *et al.* FLT3-ITD drives Ara-C resistance in leukemic cells via the induction of RUNX3. *Leuk. Res.* **39**, 1405–1413 (2015).
308. Eckford, P. D. W. & Sharom, F. J. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem. Rev.* **109**, 2989–3011 (2009).
309. Ishikawa, F. *et al.* Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1315–1321 (2007).
310. Grüllich, C., Friske, V. & Finke, J. Ex vivo detection of primary leukemia cells resistant to granule cytotoxin-induced cell death: a rapid isolation method to study granzyme-B-mediated cell death. *Ann. Hematol.* **87**, 701–708 (2008).
311. Müller, M. *et al.* EblacZ tumor dormancy in bone marrow and lymph nodes: active control of proliferating tumor cells by CD8+ immune T cells. *Cancer Res.* **58**, 5439–5446 (1998).

312. Farrar, J. D. *et al.* Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **162**, 2842–2849 (1999).
313. Braumüller, H. *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**, 361–365 (2013).
314. Koebel, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**, 903–907 (2007).
315. Forster, A. *et al.* Engineering de novo reciprocal chromosomal translocations associated with Mll to replicate primary events of human cancer. *Cancer Cell* **3**, 449–458 (2003).
316. Li, L. *et al.* Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood* **111**, 3849–3858 (2008).
317. Chan, I. T. & Gilliland, D. G. Oncogenic K-ras in mouse models of myeloproliferative disease and acute myeloid leukemia. *Cell Cycle Georget. Tex* **3**, 536–537 (2004).
318. Pardee, T. S., Zuber, J. & Lowe, S. W. Flt3-ITD alters chemotherapy response in vitro and in vivo in a p53-dependent manner. *Exp. Hematol.* **39**, 473-485 (2011).
319. Gaiger, A., Reese, V., Disis, M. L. & Cheever, M. A. Immunity to WT1 in the animal model and in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **96**, 1480–1489 (2000).
320. Mopin, A., Driss, V. & Brinster, C. A Detailed Protocol for Characterizing the Murine C1498 Cell Line and its Associated Leukemia Mouse Model. *J. Vis. Exp. JoVE.* **116**, 1-12 (2016).
321. Goldie, H., Butler, C. H., Anderson, M. M., Maxwell, M. C. & Hahn, P. F. Growth characteristics of free C1498 granulocytic leukemia tumor cells in the peritoneal fluid and the blood of C57 mice. *Cancer Res.* **13**, 125–129 (1953).
322. Leprêtre, F. *et al.* Waved aCGH: to smooth or not to smooth. *Nucleic Acids Res.* **38**, e94 (2010).
323. Boyer, M. W. *et al.* Dependency on intercellular adhesion molecule recognition and local interleukin-2 provision in generation of an in vivo CD8+ T-cell immune response to murine myeloid leukemia. *Blood* **85**, 2498–2506 (1995).
324. LaBelle, J. L. & Truitt, R. L. Characterization of a murine NKT cell tumor previously described as an acute myelogenous leukemia. *Leuk. Lymphoma* **43**, 1637–1644 (2002).

325. Klobusická, M. Possibilities and limitations of cytochemical methods in diagnosis of acute leukemia. *Micron Oxf. Engl.* 1993 **25**, 317–329 (1994).
326. Travlos, G. S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.* **34**, 548–565 (2006).
327. Naeim, F. & Rao, P. N. Chapter 11 - Acute Myeloid Leukemia. *Hematopathology* **1**, 207–255 (2008).
328. Yáñez, A., Ng, M. Y., Hassanzadeh-Kiabi, N. & Goodridge, H. S. IRF8 acts in lineage-committed rather than oligopotent progenitors to control neutrophil vs monocyte production. *Blood* **125**, 1452–1459 (2015).
329. Langer, S. W., Sehested, M. & Jensen, P. B. Anthracycline extravasation: a comprehensive review of experimental and clinical treatments. *Tumori* **95**, 273–282 (2009).
330. Graham, J. D., Welch, C. M. & Patchen, M. L. Studies of an Implanted Murine Myelogenous Leukemia C1498. (1975).
331. Miller, A. M., Marmor, J. B., Page, P. L., Russell, J. L. & Robinson, S. H. Unregulated growth of murine leukemic cells and suppression of normal granulocyte growth in diffusion chamber cultures. *Blood* **47**, 737–745 (1976).
332. Quesenberry, P. J. *et al.* Inhibition of normal murine hematopoiesis by leukemic cells. *N. Engl. J. Med.* **299**, 71–75 (1978).
333. Wickramasinghe, S., Porwit, A. & Erber, W. CHAPTER 2 - Normal bone marrow cells: Development and cytology. *Blood and Bone Marrow Pathology* **2**, 19–44 (2011).
334. Matsuo, T. *et al.* The percentage of myeloperoxidase-positive blast cells is a strong independent prognostic factor in acute myeloid leukemia, even in the patients with normal karyotype. *Leukemia* **17**, 1538–1543 (2003).
335. Kobayashi, R. *et al.* Extramedullary infiltration at diagnosis and prognosis in children with acute myelogenous leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **48**, 393–398 (2007).
336. Driss, V. *et al.* Sub-clonal analysis of the murine C1498 acute myeloid leukaemia cell line reveals genomic and immunogenic diversity. *Immunol. Lett.* **192**, 27–34 (2017).

337. Bochtler, T. *et al.* Clonal heterogeneity as detected by metaphase karyotyping is an indicator of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 3898–3905 (2013).
338. Zhou, Q. *et al.* Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia. *Blood* **114**, 3793–3802 (2009).
339. Zhou, Q. *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8⁺ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* **117**, 4501–4510 (2011).
340. Greiner, J. *et al.* Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **120**, 1282–1289 (2012).
341. McGranahan, N. *et al.* Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* **351**, 1463–1469 (2016).
342. Wu, C. *et al.* Wilms' tumor 1 enhances Cisplatin-resistance of advanced NSCLC. *FEBS Lett.* **588**, 4566–4572 (2014).
343. Plönes, T. *et al.* Turning back the Wheel: Inducing Mesenchymal to Epithelial Transition via Wilms Tumor 1 Knockdown in Human Mesothelioma Cell Lines to Influence Proliferation, Invasiveness, and Chemotaxis. *Pathol. Oncol. Res. POR* **23**, 723–730 (2017).
344. Pigazzi, M. *et al.* Minimal residual disease monitored after induction therapy by RQ-PCR can contribute to tailor treatment of patients with t(8;21) RUNX1-RUNX1T1 rearrangement. *Haematologica* **100**, e99–e101 (2015).
345. Alizad Ghandforoush, N. *et al.* Evaluation of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia with NPM1 Marker. *Int. J. Hematol.-Oncol. Stem Cell Res.* **10**, 147–152 (2016).
346. Meads, M. B., Hazlehurst, L. A. & Dalton, W. S. The Bone Marrow Microenvironment as a Tumor Sanctuary and Contributor to Drug Resistance. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2519–2526 (2008).
347. Cook, G. J. & Pardee, T. S. Animal models of leukemia: any closer to the real thing? *Cancer Metastasis Rev.* **32**, 63–76 (2013).
348. Cutts, B. A. *et al.* Nf1 deficiency cooperates with oncogenic K-RAS to induce acute myeloid leukemia in mice. *Blood* **114**, 3629–3632 (2009).

349. Xia, J. *et al.* Modeling Human Leukemia Immunotherapy in Humanized Mice. *EBioMedicine* **10**, 101–108 (2016).
350. Theocharides, A. P. A., Rongvaux, A., Fritsch, K., Flavell, R. A. & Manz, M. G. Humanized hematolymphoid system mice. *Haematologica* **101**, 5–19 (2016).
351. Shultz, L. D., Brehm, M. A., Garcia-Martinez, J. V. & Greiner, D. L. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 786–798 (2012).
352. von Bonin, M. *et al.* In Vivo Expansion of Co-Transplanted T Cells Impacts on Tumor Re-Initiating Activity of Human Acute Myeloid Leukemia in NSG Mice. *PLoS ONE* **8**, (2013).
353. Sivagnanalingam, U. *et al.* Residual Disease in a Novel Xenograft Model of RUNX1-Mutated, Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *PloS One* **10**, e0132375 (2015).
354. Kanakry, C. G. *et al.* Early lymphocyte recovery after intensive timed sequential chemotherapy for acute myelogenous leukemia: peripheral oligoclonal expansion of regulatory T cells. *Blood* **117**, 608–617 (2011).
355. Sun, H. *et al.* Increase in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) associated with minimal residual disease (MRD) detection in adult acute myeloid leukemia. *Int. J. Hematol.* **102**, 579–586 (2015).