



Université
de Lille



UNIVERSITE DE LILLE
École doctorale de Biologie-Santé de Lille

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE BIOLOGIE – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

**EXPLORATION MULTI-OMIQUE DE LA MALADIE RÉSIDUELLE MINIMALE
DANS DEUX MODÈLES SYNGÉNIQUES MURINS DE DORMANCE TUMORALE
DE LEUCÉMIE MYÉLOÏDE ET DE MÉLANOME**

Présentée et soutenue le 22 Octobre 2024, par

Marie-Océane LAGUILLAUMIE

COMPOSITION DU JURY

Pr Jérôme KLUZA *Président du jury*

Professeur d'Université, Université de Lille

Dr Thierry IDZIOREK *Directeur de thèse*

CRHC, ONCOLille, UMR-S 1277 INSERM – UMR 9020 CNRS

Dr Loïc LEMONNIER *Directeur de thèse*

CRCN, PhyCell, INSERM U1003

Dr Robert BALLOTTI *Rapporteur*

DRE Inserm, Inserm U1065, Biologie et pathologies des mélanocytes

Dr Julie CAMEL *Rapporteuse*

CRCN, Inserm 1052, CNRS 5286, Plasticité tumorale dans le mélanome

Pr Christophe VANDIER *Examineur*

INSERM UMR 1069, Université de Tours

Pr Raphaël ITZYKSON *Examineur*

PU-PH, Université de Paris

CANTHER « CANcer heterogeneity, plasticity and resistance to THERapies » (UMR-S 1277
INSERM – UMR 9020 CNRS, ONCOLille) & PhyCell (INSERM U1003)

« All we have to decide is what to do with the time that is given us.»

- J.R.R. Tolkien

**EXPLORATION MULTI-OMIQUE DE LA MALADIE RÉSIDUELLE MINIMALE
DANS DEUX MODÈLES SYNGÉNIQUES MURINS DE DORMANCE TUMORALE
DE LEUCÉMIE MYÉLOÏDE ET DE MÉLANOME**

RÉSUMÉ

État de l'art :

La dormance tumorale est une stratégie de résistance utilisée par les cellules cancéreuses. Elle constitue un obstacle majeur dans la thérapie du cancer, puisqu'elle mène à la maladie résiduelle minimale (MRD) et augmente le risque de rechute. Bien que cliniquement significatifs, les mécanismes derrière la dormance tumorale et la MRD ne sont pas bien compris. Nous avons utilisé deux modèles murins syngéniques de leucémie myéloïde et de mélanome élaborés par le laboratoire pour explorer les profils génétiques, épigénétiques, transcriptomiques et protéomiques liés à la dormance tumorale. Par cette approche multi-omique, nous avons cherché à découvrir les processus moléculaires conduisant à la MRD et à identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

Résultats :

Nous avons réalisé une analyse multi-omique complexe incluant le séquençage de l'exome entier (WES), l'analyse des variations du nombre de copies (CNV), l'immunoprécipitation de la chromatine suivie du séquençage (ChIP-seq) et des investigations du transcriptome et du protéome. L'analyse WES a identifié un chevauchement subtil de mutations génétiques entre les modèles de dormance de mélanome et de leucémie, avec de nombreuses mutations trouvées exclusivement dans les cellules de dormance. Ces signatures génétiques spécifiques suggèrent que les pressions sélectives durant la MRD peuvent conférer une résistance au microenvironnement ou aux traitements. En combinant les données CNV, les marques d'histones et les signatures d'expression génique transcriptomique avec l'analyse

d'enrichissement de Gene Ontology (GO), nous avons identifié des rôles fonctionnels potentiels de ces gènes mutés et obtenu des informations sur les voies impliquées dans la MRD. De plus, en comparant les "gènes MRD murins" avec les données correspondantes aux maladies humaines provenant de bases de données publiques, nos travaux soulignent des caractéristiques communes liées à la progression de la maladie. L'analyse protéomique, combinée aux investigations génétiques multi-omiques, a révélé une signature protéique distincte dans les cellules de dormance avec une implication minimale des mécanismes génétiques. L'analyse d'enrichissement des voies a mis en évidence les processus métaboliques, de différenciation et de remodelage du cytosquelette impliqués dans la MRD. Enfin, nous avons identifié 11 protéines exprimées différemment dans les cellules de dormance de ces deux pathologies.

Conclusions :

Notre recherche met en évidence la nature complexe de la dormance tumorale, impliquant à la fois des éléments génétiques et non génétiques. En comparant les données génomiques, transcriptomiques, protéomiques et épigénomiques, nous fournissons un aperçu approfondi du paysage moléculaire associé à la MRD. Ces résultats posent une base solide pour de futures études et suggèrent des directions prometteuses pour le développement de thérapies ciblées pour la MRD chez les patients atteints de leucémie et de mélanome. Cela souligne la nécessité de prendre en compte à la fois des facteurs génétiques et non génétiques dans les stratégies de traitement.

Mots clés :

"Dormance tumorale, leucémie, mélanome, modèles syngéniques, analyse multi-omique, CHIP-seq, séquençage de l'exome entier, variation du nombre de copies de gène"

ABSTRACT

Background:

Tumor dormancy, a resistance strategy used by cancer cells, is a major impediment in cancer therapy, leading to minimal residual disease (MRD) and increasing the risk of relapse. Although clinically significant, the mechanisms behind tumor dormancy and MRD are not well understood. In this research, we employed two syngeneic murine models of myeloid leukemia and melanoma to explore the genetic, epigenetic, transcriptomic, and proteomic profiles linked to tumor dormancy. By applying a multiomics approach, we aimed to uncover the molecular processes driving MRD and identify possible therapeutic targets.

Results:

We performed a comprehensive omics analysis that included whole-exome sequencing (WES), copy number variation (CNV) analysis, chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq), and investigations of the transcriptome and proteome. The WES analysis identified a limited overlap of gene mutations between the melanoma and leukemia dormancy models, with many mutations found exclusively in dormant cells. These unique genetic signatures suggest that selective pressures during MRD may provide resistance to the surrounding microenvironment or treatments. Combining CNV data, histone marks, and transcriptomic gene expression signatures with Gene Ontology enrichment analysis, we identified the potential functional roles of these mutated genes and gained insights into the pathways involved in MRD. Furthermore, by comparing "murine MRD genes" with corresponding human disease data from public databases, we identified common features related to disease progression. Proteomic analysis, integrated with multi-

omics genetic investigations, revealed a distinct protein signature in dormant cells with minimal involvement of genetic mechanisms. Pathway enrichment analysis pointed to the metabolic, differentiation, and cytoskeletal remodeling processes involved in MRD. Ultimately, we identified 11 proteins that were differentially expressed in dormant cells across both types of pathology.

Conclusions:

Our research highlights the intricate nature of tumor dormancy, involving both genetic and non-genetic elements. Through the comparison of genomic, transcriptomic, proteomic, and epigenomic data, we deliver an extensive overview of the molecular landscape associated with minimal residual disease. These findings lay a solid groundwork for future studies and suggest promising directions for developing targeted therapies for MRD in leukemia and melanoma patients. This underscores the necessity of incorporating both genetic and non-genetic factors into treatment strategies.

Keywords:

Tumour dormancy, leukemia, melanoma, syngeneic model, multiomics analysis, ChIP-seq, whole exome sequencing, copy number variation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier la Région Hauts-de-France et le Centre Hospitalier Universitaire de Lille pour le co-financement de mon allocation doctorale. Merci à la Société Française d'Hématologie et à l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille pour avoir pris le relai financier, me permettant de finaliser mes travaux de recherche. Je remercie tout particulièrement Micheline Magdelon pour son dévouement et sa bonne humeur contagieuse !

Un grand merci aux Professeurs Bruno Quesnel et Salomon Manier de m'avoir accueillie au sein de leur équipe de recherche « Leukemia », ainsi que le Professeur Natalia Prevarskaya dans l'équipe « Ion channels and cancer ». Merci au Docteur Isabelle Van Seuningen de m'avoir accueillie à l'Institut ONCOLille.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury de thèse : au Professeur Jérôme Kluza, merci d'avoir accepté la présidence de mon jury. Aux Docteurs Julie Caramel et Robert Ballotti, merci d'avoir pris à cœur vos rôles de rapporteurs, et merci aux Professeurs Christophe Vandier et Raphaël Itzykson d'avoir accepté d'être présents en qualité d'examineurs.

Je remercie le directeur de l'École Doctorale, le Professeur Patrick Vermersch, ainsi que le coordinateur scientifique François Delcroix, pour leur écoute attentive et leur soutien répété et appuyé. Merci également à Marjorie Vandenhove pour son aide.

Aux Professeurs Christophe Vandier et Loïc Garçon, merci de votre écoute et de votre soutien durant mes Comités de Suivi Individuel. Vos encouragements et vos conseils m'ont redonné foi en moi, quand je doutais de tout.

Je remercie mon directeur de thèse le docteur Thierry Idziorek de m'avoir accordé pleinement sa confiance pour mener à bien ce projet de thèse, et d'avoir fait de son mieux pour m'accompagner pendant toutes ces années, du Master 2 aux longues années de doctorat. Je te souhaite une retraite épanouissante auprès de ta famille.

Au Docteur Yasmine Touil, merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir tendu la main et de t'être autant investie à mes côtés à toutes les étapes de ce projet scientifique si complexe. Ton soutien et ta bienveillance m'ont portée, merci de ta générosité.

Je tiens à remercier Nathalie Jouy et Emilie Floquet pour nos nombreuses heures de cytométrie en flux. Merci à Emilie Desruelles et Nathalie Ziental-Gélus pour nos journées sans fin, en RT-qPCR ou Western blots. Merci à toutes d'avoir été à l'écoute et d'un grand soutien dans ces années si difficiles, à tous les niveaux. Nos travaux n'auront pas de reconnaissance à la hauteur de notre investissement, mais je n'oublierai pas tout ce que vous m'avez apporté, autant d'un point de vue scientifique qu'humain. Je remercie également Bernadette Neve pour le temps qu'elle m'a consacré afin de me faire découvrir et maîtriser Partek. Enfin, un remerciement appuyé au Docteur Mehmet Cagatay Tarhan pour son aide précieuse !

A tous les collaborateurs qui ont participé à cet article, merci.

A mes chers camarades de bureau, de thèse ou de laboratoire qui se reconnaîtront : merci pour les rires, nos échanges, les thé/café, les gâteaux... Et tous nos moments de partage ! Meriem et Lama, merci d'avoir été aussi présentes et attentionnées, ce parcours de thèse aurait été impossible sans vous. Léa, merci d'avoir appelé toutes ces pharmacies et fait tous ces kilomètres avec moi, dans ma quête vitale d'insuline, en pleine pénurie régionale. Antoine, merci de tes précieux conseils et encouragements, de ton implication dans la relecture de ma thèse, sans oublier tes conseils avisés dans nos journées de manip. Sylvie, merci d'être aussi gentille et encourageante, et de ton précieux soutien.

A Touria, Olivier et Marie. Merci de m'avoir prouvé que malgré la maladie, c'est dans nos efforts sans relâche que l'on puise notre plus grande force de résilience.

A mes amis les plus chers. *"You can trust us to stick to you through thick and thin – to the bitter end. And you can trust us to keep any secret of yours – closer than you yourself keep it. But you cannot trust us to let you face trouble alone, and go off without a word"* (J.R.R. Tolkien *et al.*). Fabien, Elsa, merci d'avoir été présents à chaque difficulté de ma vie, comme dans les moments de partage si précieux. Merci d'avoir fait tous ces kilomètres pour me soutenir à l'hôpital, ou chanter à pleins poumons dans CE concert aux décibels incontrôlés. Merci pour ces vacances, ces voyages, ces week-ends, ces souvenirs ancrés dans mon cœur depuis tant d'années, et tous ceux à venir. Ophélie, merci pour ton rire communicatif et ton soutien, je suis fière de te compter parmi mes amis, et j'ai hâte de t'accompagner dans ce nouveau chapitre de vie que vous écrivez tous les trois !

A ma Famille. Maman et Papa, merci d'être de merveilleux parents qui n'ont jamais cessé de croire en moi et de me soutenir inconditionnellement, y compris quand moi-même j'avais perdu espoir. A Mamie Rose, merci de me donner autant d'amour. A ma Rosie, la meilleure collègue de travail, qui me couvre de ronrons et de câlins en toutes circonstances, malgré le régime « courgettes ».

A Flo, la plus belle histoire de ma thèse. Merci d'être aussi attentionné et à l'écoute. Merci de tes encouragements sans faille, de croire en moi plus que quiconque, de faire autant de sacrifices pour moi, pour nous. Merci d'être mon pilier de vie. Pour ces années de vie à deux, et pour toutes celles à venir.

Parce que ceux que l'on aime ne nous quittent jamais vraiment. Je dédie mon travail à Mamie Nini, qui je pense, aurait été très fière de moi. Ton sourire et ta tendresse sont ancrés dans ma mémoire.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	25
CHAPITRE 1 – LA DORMANCE TUMORALE : UNE DYNAMIQUE SUBTILE ENTRE QUIESCENCE ET EQUILIBRE MICRO ENVIRONNEMENTAL	26
I) <i>Définition</i>	26
II) <i>Mécanismes</i>	27
A) La dormance cellulaire, ou quiescence, et l’implication des cellules souches.....	27
B) L’influence du microenvironnement sur la dormance tumorale	30
C) La dormance immunologique : l’axe PD-1/PD-L1 au cœur de la régulation immunitaire	32
D) La dormance angiogénique.....	34
III) <i>Modèles d’étude de la maladie résiduelle minimale</i>	36
A) Modélisations <i>in vivo</i>	36
B) Modélisations <i>in vitro</i>	38
IV) <i>Approches thérapeutiques potentielles pour cibler la MRD</i>	40
A) Importance de la compréhension du rôle de la niche	41
B) Induction ou maintien de la dormance tumorale.....	43
C) Réveiller la dormance pour une élimination ciblée	44
D) Élaborer des essais cliniques pour cibler la MRD.....	44
CHAPITRE 2 – PATHOLOGIES ETUDIÉES DANS LE CADRE DE LA THESE DE RECHERCHE	47
I) <i>La leucémie aiguë myéloïde</i>	47
A) L’hématopoïèse	47
1) Les cellules souches hématopoïétiques à l’origine de l’hématopoïèse.....	47
2) L’hématopoïèse, un modèle hiérarchique évolutif redéfinissant les stades de différenciation	48
B) La leucémie aiguë myéloïde (LAM)	50
1) Description de la pathologie	50
2) Facteurs de risque	51
3) Les altérations génétiques, actrices phares de l’hématopoïèse clonale dans les LAM	52
4) Classification des leucémies aiguës myéloïdes.....	55
5) Diagnostic des leucémies aiguës myéloïdes.....	57
a. Examens préliminaires.....	57
b. Analyses cytologiques et immunophénotypage	57
c. Importance des analyses génétiques et moléculaires	58
6) Thérapies des leucémies aiguës myéloïdes.....	60
a. La chimiothérapie conventionnelle	60
b. Les thérapies ciblées.....	62
7) Leucémie aiguë myéloïde et MRD.....	66
a. Le rôle des cellules souches leucémiques dans la MRD.....	67
b. Détection de la MRD.....	68
II) <i>Le mélanome cutané</i>	73
A) Description de la pathologie	73
B) Développement de la pathologie.....	75
1) Le mélanome in situ	75
2) Le stade invasif	75
3) Le stade métastatique.....	77

.....	78
C) Facteurs de risque.....	79
1) Facteurs endogènes	79
a. Épidémiologie	79
b. Mutations génétiques.....	80
2) Facteurs exogènes.....	81
a. Rayonnements ultraviolets	81
b. Obésité.....	81
D) Classification : du niveau de Clark à la classification de l’OMS	81
E) Diagnostic du mélanome cutané	83
F) Thérapies	84
1) Stades précoces.....	84
2) Stades métastatiques	84
a. Chimiothérapie	84
b. Thérapies ciblées	85
c. Inhibiteurs de points de contrôle immunitaire et stratégies combinatoires	85
G) Mélanome et MRD.....	87
1) Acquisition d’un état dormant	87
2) Détection de la MRD dans le mélanome.....	89
a. Cellules Tumorales Circulantes (CTC).....	91
b. ADN libre circulant (cfDNA)	92
CHAPITRE 3 – APPROCHES OMIQUES DANS L’ETUDE DES CANCERS.....	93
I) <i>Les approches multi-omiques : vers une exploration holistique des cancers et une connaissance approfondie de la maladie résiduelle minimale.....</i>	<i>93</i>
II) <i>Génomique</i>	<i>95</i>
A) Importance de la génomique dans les cancers.....	95
B) Approches génomiques	97
III) <i>Épigénétique.....</i>	<i>100</i>
A) Importance de l’épigénétique dans les cancers.....	100
B) Les modifications des histones, actrices phares de la régulation de l’expression génique .	101
1) H3K4me3	103
2) H3K9me3	104
3) H3K27me3	105
C) Approches épigénétiques	106
IV) <i>Transcriptomique</i>	<i>107</i>
A) Importance de la transcriptomique dans l’étude des cancers.....	107
B) Approches transcriptomiques.....	109
V) <i>Protéomique</i>	<i>110</i>
A) Apport de la protéomique dans l’appréhension des processus oncogéniques	110
B) Approches protéomiques	111
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE THÈSE	113
MATÉRIEL ET MÉTHODES	116
UTILISATION DE MODELES MURINS SYNGENIQUES DE LEUCEMIE MYELOÏDE ET DE MELANOME	118
ANALYSE PAR HYBRIDATION GENOMIQUE COMPARATIVE SUR PUCE	119
ANALYSE DU SEQUENÇAGE WHOLE-EXOME.....	120

ANALYSE DU SEQUENÇAGE CIBLE.....	121
SEQUENÇAGE CHIP-SEQ	122
A) Préparation des échantillons pour le séquençage.....	122
B) Analyse ChIP-Seq	124
1. Analyse sur puce de l'expression génique.....	124
2. Spectrométrie de masse (MS).....	125
A) Préparation des échantillons	125
B) Analyse LC-MS/MS.....	127
C) Analyse des data de MS.....	128
3. Analyse de l'enrichissement des voies Gene-Ontology (GO).....	129
4. Approches expérimentales fonctionnelles : mesures des propriétés physiques et modulation potentielle du cytosquelette.....	129
5. Analyse de data publiques humaines	130
RÉSULTATS.....	131
I) Identification de gènes mutés significativement dans deux modèles murins de dormance tumorale de leucémie myéloïde et de mélanome	132
VI) L'analyse multi-omique des gènes mutés a révélé des implications génétiques potentielles pour le phénotype de dormance dans les modèles de leucémie et de mélanome.	137
VII) Les gènes mutés sont impliqués dans des voies de signalisation	145
VIII) Correspondance entre la « signature génique murine mutée de la MRD » et les pathologies humaines de leucémie et de mélanome	148
IX) L'expression protéique différentielle dans les cellules de dormance de leucémie DA1-3b/D365 met en lumière un processus dominant distinct non génétique dans la MRD.	154
X) L'expression différentielle des protéines dans un modèle murin de leucémie met en évidence son implication dans les voies biologiques.....	160
XI) Analyse de l'expression protéique différentielle dans les cellules de dormance de mélanome	162
XII) L'expression protéique différentielle dans un modèle murin de mélanome met en lumière l'implication significative de voies biologiques.....	166
XIII) L'identification de 11 gènes communs exprimés de manière différentielle dans les deux modèles murins de MRD a révélé une possible signature commune de MRD.....	169
XIV) Impact génétique et d'expression différentielle de la signature MRD des 11 protéines dans la LAM et le mélanome humains	171
XV) Propriétés fonctionnelles partagées par les cellules de dormance des deux modèles de maladie résiduelle	173
DISCUSSION	176
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	176
ANNEXES.....	198
BIBLIOGRAPHIE	206

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHEMATISATION DE LA MRD.	27
FIGURE 2 : SCHEMATISATION DE LA QUIESCENCE INDUITE PAR LA VOIE DES MAPK, A L'ORIGINE DE L'ENTREE EN PHASE G0 DU CYCLE CELLULAIRE.	28
FIGURE 3 : MECANISMES MICROENVIRONNEMENTAUX INFLUENÇANT L'ENTREE OU LA SORTIE DE DORMANCE (SISTIGU <i>ET AL.</i> , 2020).	31
FIGURE 4 : SIGNALISATION PD-1/PD-L1 ENTRE LE LYMPHOCYTE T CD8+ ET LA CELLULE CANCEREUSE.	34
FIGURE 5 : MANIFESTATIONS DE LA DORMANCE TUMORALE.	35
FIGURE 6 : MISE EN PLACE DES MODELES DE MRD DANS UN MODELE PDX.	37
FIGURE 7 : SCHEMA DE MODELISATION OSSEUSE PROPOSEE PAR VOELTZEL <i>ET AL.</i> , 2022.	39
FIGURE 8 : SCHEMATISATION DES STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR CIBLER LA DORMANCE TUMORALE.	41
FIGURE 9 : MODELE HIERARCHIQUE SIMPLIFIE CLASSIQUE DE L'HEMATOPOÏESE.	49
FIGURE 10 : L'HEMATOPOÏESE, UN CONTINUUM DE DIFFERENCIATION.	50
FIGURE 11 : SCHEMA DE FLUX DE L'ACCUMULATION DES MUTATIONS ET DU DEVELOPPEMENT DE LA LAM.	54
FIGURE 12 : MODELE DE CLARK DE LA PROGRESSION DU MELANOME.	74
FIGURE 13 : SCHEMATISATION DE LA BALANCE ENTRE SWI/SNF ET PCR DURANT L'EVOLUTION DU MELANOME.	77
FIGURE 14 : ÉVOLUTION METASTATIQUE DU MELANOME.	78
FIGURE 15 : SCHEMATISATION DU PROTOCOLE ABCDE.	83
FIGURE 16 : APPORT DES APPROCHES MULTI-OMIQUES DANS L'ETUDE DE LA MRD.	95
FIGURE 17 : WHOLE GENOME SEQUENCING (WGS).	99
FIGURE 18 : STRUCTURE CHROMATINIENNE (FULLGRABE <i>ET AL.</i> , 2011).	102
FIGURE 19 : APPLICATIONS DE LA TECHNOLOGIE RNA-SEQ DANS L'ANALYSE DE L'EXPRESSION GENIQUE DES BIOMARQUEURS CANCEREUX.	110
FIGURE 20 : SCHEMA METHODOLOGIQUE SYNTHETIQUE DE LA DEMARCHE EXPERIMENTALE.	117
FIGURE 21 : SIGNATURES GENETIQUES DES CELLULES PARENTALES ET DE DORMANCE DU MELANOME B16-F1 ET DES CELLULES LEUCEMIQUES DA1-3B.	136
FIGURE 22 : HEATMAPS DES RESULTATS DES ANALYSES DE CNV, DE MARQUES D'HISTONE ET D'EXPRESSION TRANSCRIPTOMIQUE DES GENES MUTES DE LA MRD.	145
FIGURE 23 : BUBBLE PLOTS DE L'ANALYSE D'ENRICHISSEMENT DES VOIES AVEC LES GENES MUTES DE MRD DANS LES MODELES DA1-3B (A) ET B16-F1 (B).	146
FIGURE 24 : HEATMAPS DES "GENES MRD" CORRESPONDANT AUX PROFILS GENETIQUES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE LAM HUMAINE (A) ET DE MELANOME (B).	152
FIGURE 25 : ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE DIFFERENTIELLE DANS LES CELLULES DE DORMANCE DE LEUCEMIE DA1-3B PAR RAPPORT A LEURS CELLULES PARENTALES.	155
FIGURE 26 : HEATMAPS DES RESULTATS DES CNV, DES MARQUES D'HISTONES ET DE L'EXPRESSION GENIQUE TRANSCRIPTOMIQUE DES PROTEINES DEREGULEES DANS LES CELLULES LEUCEMIQUES DE DORMANCE DA1-3B/D365 PAR RAPPORT A LEURS CELLULES PARENTALES.	159

FIGURE 27 : BUBBLE PLOTS DE L'ANALYSE D'ENRICHISSEMENT DES VOIES GO DES PROTEINES EXPRIMEES DE MANIERE DIFFERENTIELLE DANS LES CELLULES DE DORMANCE DE LEUCEMIE DA1-3B/D365 PAR RAPPORT A LEURS CELLULES PARENTALES.....	161
FIGURE 28 : ANALYSE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE DIFFERENTIELLE DANS LES CELLULES DE DORMANCE DU MELANOME B16-F1GFP-D COMPAREES A LEURS CELLULES PARENTALES.....	162
FIGURE 29 : HEATMAPS DES RESULTATS DE CNV, DES MARQUES D'HISTONES ET DE L'EXPRESSION GENIQUE TRANSCRIPTOMIQUE DES PROTEINES DEREGULEES DANS LES CELLULES DE DORMANCE DU MELANOME B16-F1GFP-D COMPAREES A LEURS CELLULES PARENTALES.	164
FIGURE 30. BUBBLE PLOTS DE L'ANALYSE D'ENRICHISSEMENT DES VOIES GO DES PROTEINES EXPRIMEES DE MANIERE DIFFERENTIELLE DANS LES CELLULES DE DORMANCE DU MELANOME B16-F1 PAR RAPPORT A LEURS CELLULES PARENTALES.	167
FIGURE 31 : SIGNATURES PROTEIQUES COMMUNES ENTRE LES 2 MODELES DE MRD MURINS.	170
FIGURE 32 : DIAGRAMMES EN BOITE COMPARANT LA CONDUCTANCE DU CYTOPLASME DES CELLULES DE DORMANCE B16-F1GFP-D DU MELANOME ET DES CELLULES DE DORMANCE DA1-3B/D365 DE LA LEUCEMIE PAR RAPPORT A LEURS CELLULES HOMOLOGUES PARENTALES.	175

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DE L'ELN DES LAM, D'APRES SHIMONY, 2023.	56
TABLEAU 2 : CLASSIFICATION DE L'OMS 2018 DES MELANOMES, D'APRES THE 2018 WHO CLASSIFICATION OF MELANOMA—ELDER <i>ET AL.</i>	83
TABLEAU 3 : IMPACT DES 11 PROTEINES COURAMMENT EXPRIMEES DE MANIERE DIFFERENTIELLE DANS LES MODELES DE DORMANCE DU MELANOME B16-F1GFP-D ET DE LA LEUCEMIE MURINE DA1-3B/D365 SUR LA LAM HUMAINE ET LE MELANOME.	172

ABRÉVIATIONS

AA	Acides aminés
ABCB1	ATP binding cassette de sous-famille B 1
ABCE1	ATP binding cassette subfamily E member 1
ACN	Acétonitrile
<i>Acy1</i>	Aminoacylase 1
<i>Adam2</i>	ADAM metallopeptidase domain 2
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNtc	ADN tumoral circulant
<i>Adssl1</i>	Adenylosuccinate synthase 1
AGC	Automatic gain control
<i>Ahnak</i>	Desmoyokin
<i>Aldh18a1</i>	Aldehyde dehydrogenase 18 family member A1
<i>Aldoa</i>	Aldolase
ALM	Mélanome acro-lentigineux, acral lentiginous melanoma
<i>ANKRD52</i>	Ankyrin repeat domain 52
<i>Ap1b1</i>	AP-1 Complex Subunit Beta-1
<i>Ap3d1</i>	Adaptor related protein complex 3 subunit delta 1
AR	Réactif analytique
ARN	Acide ribonucléique
<i>Asns</i>	Asparagine synthetase
<i>Ass1</i>	Argininosuccinate synthase 1
<i>ASXL1</i>	Additional Sex combs like 1
ATAC-seq	Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing
<i>Atn1</i>	Atrophin 1
<i>ATP6V1H</i>	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit H
Bcl-2	B cell lymphoma 2
<i>BCR-ABL</i>	Chromosome de Philadelphie, Breakpoint Cluster Region-Abelson
BMP	Bone Morphogenic Proteins
<i>Bop1</i>	Block of proliferation 1 ribosomal biogenesis factor
BORIS	Brother of the regulator of imprinted sites
<i>BRAF</i>	B-Raf proto-oncogene
<i>Brca2</i>	Breast Cancer 2
<i>Capg</i>	Capping actin protein, gelsolin like
CAR-T	Chimeric antigen receptor-T

<i>Cars</i>	Cysteinyl-tRNA synthetase
CBX7	Chromobox 7
<i>Cdc42bpb</i>	CDC42 binding protein kinase beta
CDK	Cyclin-dependant kinase
<i>CDKN2A</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
<i>CEBPA</i>	CCAAT enhancer binding protein alpha
CGH	Hybridation génomique comparative
ChIP-Seq	Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing
<i>Chrm2</i>	Cholinergic receptor muscarinic 2
<i>Ckb</i>	Creatine kinase B
CKI	Inhibiteur des cyclines kinases (cycline kinase inhibitor)
CNV	Copy number variation
CPTAC	Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium
CRYZL1	Crystallin zeta like 1
CSC	Cellules souches cancéreuses
CSD	<i>Chronically sun-damaged</i>
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CTLA-4	CD152, Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4
<i>Cwf19l1</i>	CWF19 like cell cycle control factor 1
<i>Cyp11a1</i>	Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1
<i>Dapk1</i>	Death associated protein kinase 1
<i>Ddx18</i>	DEAD-box helicase 18
<i>DHX57</i>	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNAJA2	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A2
DNMT	ADN méthyltransférase
DOT1	Disruptor of telomeric silencing 1-like, DOT1L
<i>Dscam</i>	Down syndrome cell adhesion molecule
DTC	Cellules tumorales disséminées
DTIC	Dacarbazine
<i>DTP</i>	<i>Drug-Tolerant Persisters</i>
DTT	DL-dithiothreitol
DTYMK	Deoxythymidylate kinase
EEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2
<i>Ehd1</i>	EH domain containing 1
EHMT2	Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2
<i>Eif2b4</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2B subunit delta

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELN	European LeukemiaNet
<i>Eno1</i>	Enolase 1
EPZ5676	Pinometostat
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EV1	Early Viral 1
FA	Acide formique
FAB	Classification franco-américano-britannique
<i>Fam3a</i>	FAM3 metabolism regulating signaling molecule A
FASP	Filter-Aided Sample Preparation
FDA	Food and Drug Administration
FDR	False discovery rate
<i>FLT3</i>	Fms-like tyrosine kinase 3
FWHM	Full width at half-maximum
GAS6	Growth-arrest specific gene 6
GATA	Gène codant pour les facteurs de transcription se liant à la séquence Guanine Adenine Thymine Adenine)
GDA	Allogreffes dérivées de GEM
<i>Gdi1</i>	GDP dissociation inhibitor 1
GEM	Genetically engineered mouse models
GEO	Gene Expression Omnibus
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 2
GO	Ontologie génique
<i>Grin2a</i>	Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A
GSTT3	Glutathione S-transferase theta 3
GYG	Glycogenin
HCQ	Hydroxychloroquine
HPLC	High-performance liquid chromatography
<i>Hsd17b4</i>	Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4
HTLV	Human T-lymphotropic virus
<i>Htr2c</i>	5-hydroxytryptamine receptor 2C
IAA	iodoacétamide
ICP	Immune checkpoint
<i>IDH1/2</i>	Isocitrate déshydrogénases NADP ⁺ 1 et 2
IFN γ	Interféron gamma
IHC	Immunohistochimie
IL	Interleukine

ILKAP	ILK associated serine/threonine phosphatase
IMC	Indice de masse corporelle
INDEL	Insertion-délétion
ITD	Internal tandem duplications
JARID1	Jumonji, AT rich interactive domain 1
<i>Kif24</i>	Kinesin family member 24
LAG3	Lymphocyte activating 3
LAIP	Leukemia-associated immunophenotype
LAM	Leucémie aiguë myéloïde
<i>Lancl3</i>	LanC like family member 3
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LFQ	Quantification sans marquage
LLA	Leucémie lymphoïde aiguë
LMM	Mélanome de Dubreuilh, lentigo malignant melanoma
LT	Lymphocyte T
LTA4H	Leukotriene A4 hydrolase
<i>Magee1</i>	MAGE family member E1
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MEK	Mitogen-activated protein kinase
MEMS	Micro electro-mechanical systems
METAP2	Methionyl aminopeptidase 2
MITF	Melanocyte inducing transcription factor
MLCK	Myosine légère kinase
<i>MLL1</i>	Lysine methyltransferase 2A
MO	Moelle Osseuse
MRD	Maladie résiduelle minimale (ou <i>minimal residual disease</i>)
MS	Spectrométrie de masse
mTOR	Mammalian target of rapamycin
<i>Muc4</i>	Mucin 4, cell surface associated
<i>NACAD</i>	NAC alpha domain containing
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
<i>Ne1</i>	Hybrid necrosis gene 1
<i>Nedd4</i>	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
<i>NES</i>	Nestin
<i>NF1</i>	Neurofibromine
NFAT	Nuclear factor of activated T cells

NFS	Numération de la formule sanguine
NGS	Next-generation sequencing
NH ₄ HCO ₃	bicarbonate d'ammonium
NMM	Mélanome nodulaire (nodular malignant melanoma)
non-CSD	Non-chronically sun-damaged
NOS	LAM non spécifiées
<i>NPM1</i>	Nucléosphosmine
NQO2	N-ribosyldihydronicotinamide:quinone dehydrogenase 2
NR2F1	Nuclear receptor subfamily 2 group F member 1
<i>NRAS</i>	Neuroblastoma proto-oncogene
<i>Nudt5</i>	Nudix hydrolase 5
<i>OBSCN</i>	Obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
<i>Ola1</i>	Obg like ATPase 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORAI1	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1
<i>Pafah2</i>	Platelet activating factor acetylhydrolase 2
<i>Pck2</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial
<i>PCLO</i>	Piccolo presynaptic cytomatrix protein
<i>Pcpc1</i>	Paraspeckle Protein 1
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death ligand 1
PDCD1	Programmed cell death 1
PDX	Patient-derived xenograft
<i>Pfkm</i>	Phosphofructokinase
PHPT1	Phosphohistidine phosphatase 1
<i>PLEC</i>	Plectin
<i>PLOD3</i>	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
<i>Pml</i>	Promyelocytic leukemia nuclear body scaffold
POSTN	Périostine
PPI	Intéraction protéine-protéine
PPIH	Peptidylprolyl isomerase H
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
<i>PRKDC</i>	Protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit
<i>Prps111</i>	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 like 1
PSM	Peptide-spectrum match
PSMG2	Proteasome assembly chaperone 2

<i>Pten</i>	Phosphatase and tensin homolog
<i>Ptpn11</i>	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11
<i>PURA</i>	Purine rich element binding protein A
PURB	Purine rich element binding protein B
<i>RAD21</i>	Kleisin 21
<i>RAN</i>	Ran, member RAS oncogene family
<i>Rangap1</i>	Ran GTPase activating protein 1
<i>RBM28</i>	RNA binding motif protein 28
RE	Réticulum Endoplasmique
RNA-seq	Séquençage de l'ARN
<i>RP1</i>	Retinitis pigmentosa 1
<i>RUNX1</i>	Runt related transcription factor 1
S100B	S100 calcium binding protein B
SDS	Dodécylsulfate de sodium
<i>Selenbp1</i>	Selenium binding protein 1
SEPTIN-9	Septin 9
<i>Shmt2</i>	Serine hydroxymethyltransferase 2
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SLC25A3	Solute carrier family 25 member 3
SMG	Gènes mutés de manière significative
<i>Snap91</i>	Synaptosome associated protein 91
SNV	Single nucleated variants
SOC	Store-Operated Channels
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
SRA	Sequence Read Archive
SSM	Mélanome superficiel extensif (Superficial spreading melanoma)
<i>Stk40</i>	Serine/threonine kinase 40
<i>Stx7</i>	Syntaxin 7
<i>Tcf7l2</i>	Transcription factor 7 like 2
TCR	T-cell receptor
<i>TDRD1</i>	Tudor domain containing 1
<i>TERT</i>	Telomerase reverse transcriptase
<i>TET2</i>	Ten-eleven translocation 2
<i>Tex2</i>	Testis expressed 2
TFA	Acide trifluoroacétique
TGFβ	Transforming Growth Factor β
<i>Thoc5</i>	THO complex subunit 5

TIM-3	Hepatitis A virus cellular receptor 2
<i>TPI1</i>	Triosephosphate isomerase 1
TPM4	Tropomyosin 4
<i>Trak1</i>	Trafficking kinesin protein 1
Tris-HCL	Acide trishydrochlorique
<i>Trpc5</i>	Transient receptor potential cation channel subfamily C member 5
TSP	Thrombospondine
<i>Ttc7b</i>	Tetratricopeptide Repeat Domain 7B
<i>TTN</i>	Titin
<i>Tubgcp6</i>	Tubulin gamma complex component
UAP1L1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 like 1
UBE2N	Ubiquitin conjugating enzyme E2 N
UPF1	Regulator of nonsense transcripts 1
UV	Rayon ultraviolet
VAF	Fréquence allélique
<i>Vars2</i>	Valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial
VCAM1	Protéine d'adhésion cellulaire vasculaire 1
<i>VCPIP1</i>	Valosin containing protein interacting protein 1
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial
<i>Vmn2r26</i>	Vomer nasal 2, receptor 26
<i>Vps13c</i>	Vacuolar protein sorting 13 homolog C
<i>Vps13d</i>	Vacuolar protein sorting 13 homolog D
<i>VPS53</i>	Vacuolar protein sorting 53
WASF1	WASP family member 1
<i>Wasp1</i>	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein 1
<i>Wdr18</i>	WD repeat domain 18
WES	Séquençage de l'exome entier
WGS	Séquençage du génome entier
<i>Yars</i>	Tyrosyl-tRNA synthetase
<i>Zfpm2</i>	Zinc finger protein, multitype 2 protein
<i>Zpf185</i>	Zinc finger protein 185

INTRODUCTION

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 – La dormance tumorale : une dynamique subtile entre quiescence et équilibre micro environnemental

I) Définition

La dormance tumorale est l'un des mécanismes de résistance employés par les cellules tumorales pour persister dans l'organisme pendant des périodes prolongées, allant de quelques mois à plusieurs années (Aguirre-Ghiso, 2007 ; Quesnel, 2008 ; Quesnel, 2013). On observe leur présence aussi bien chez les individus en bonne santé que chez les patients atteints de cancer, y compris après l'arrêt des traitements (Kauffman *et al.*, 2000 ; Myron Kauffman *et al.*, 2002). Les cellules cancéreuses en dormance sont alors capables de contourner la réponse immunitaire et de survivre aux thérapies : ce phénomène est nommé **maladie résiduelle minimale** et est désigné par l'abréviation MRD (Aguirre-Ghiso, 2007 ; Quesnel, 2013 ; Aguirre-Ghiso, 2021). La persistance des cellules tumorales au sein de l'organisme est fortement corrélée avec la résurgence de la maladie, c'est pourquoi il est essentiel d'en élucider ses mécanismes afin de développer des stratégies thérapeutiques efficaces, en vue d'améliorer les issues cliniques des patients (Figure 1).

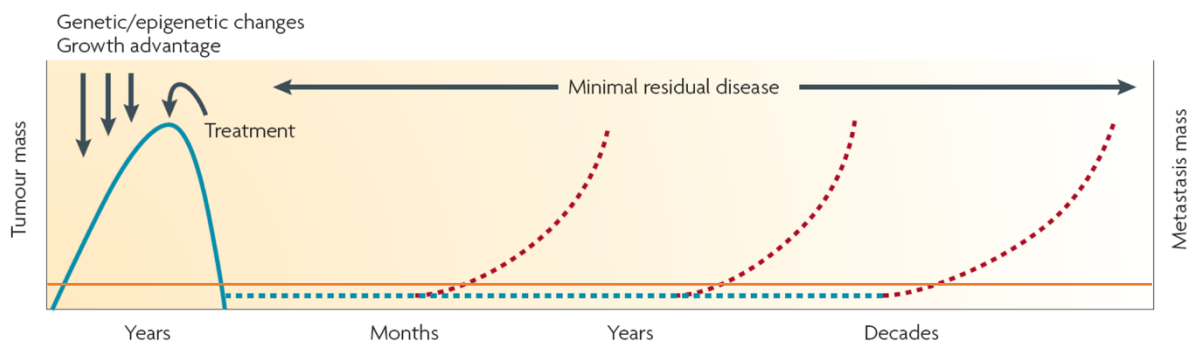


Figure 1 : Schématisation de la MRD.

La tumeur primaire est formée de cellules tumorales accumulant des modifications génétiques et épigénétiques, ce qui lui permet de se développer (ligne bleue continue). La maladie résiduelle (en ligne bleue pointillée) persiste durant de longues périodes après les traitements, en deçà du seuil de détection (ligne orange). La masse tumorale peut croître à nouveau : on parle de rechute (ligne rouge pointillée). (Adapté de Aguirre-Guiso, 2007)

II) Mécanismes

La dormance peut être observée au niveau cellulaire, où elle est appelée dormance cellulaire ou quiescence, ainsi qu'au niveau tumoral, où elle est régulée par le microenvironnement, le système immunitaire et l'angiogenèse (Figure 5).

A) La dormance cellulaire, ou quiescence, et l'implication des cellules souches

A l'échelle de la cellule, le statut **quiescent** est déterminé par une entrée en phase G0 du cycle cellulaire et se caractérise notamment par un ratio faible ERK/p38 (*Extracellular signal-regulated kinases/p38*). En ce sens, le *Transforming Growth Factor β* (TGF β) peut induire la quiescence en augmentant l'activité de p38 et en inhibant ERK, d'après des modèles de carcinome épidermoïde via la voie des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*). Cela conduit à la surexpression de p21 et de p27, deux inhibiteurs des cyclines kinases (CKI) qui favorisent l'arrêt du cycle cellulaire (Adam *et al.*, 2009) (Figure 2).

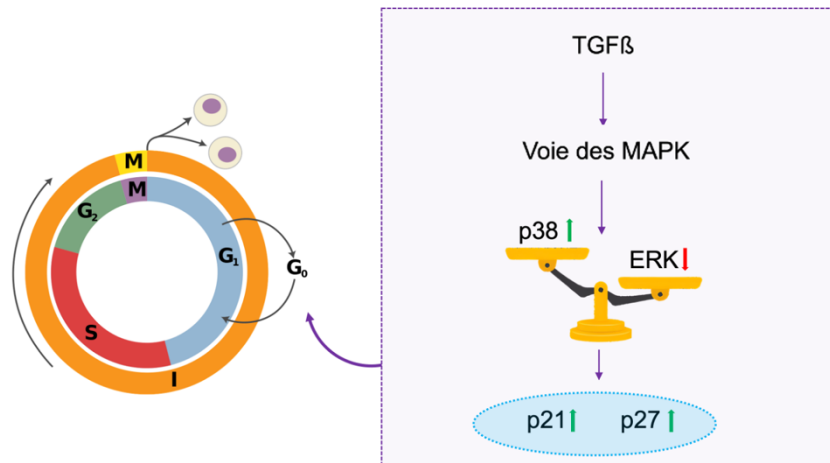


Figure 2 : Schématisation de la quiescence induite par la voie des MAPK, à l'origine de l'entrée en phase G₀ du cycle cellulaire.

Au sein des tumeurs, une population spécifique de cellules, les **cellules souches cancéreuses (CSC)**, joue un rôle crucial dans l'oncogénèse. Ces cellules partagent des caractéristiques avec les cellules souches normales, telles que la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. Elles sont capables de résister aux traitements conventionnels et peuvent participer à l'apparition des rechutes ainsi que de la formation de métastases (Tirino *et al.*, 2013 ; Islam *et al.*, 2015).

Les cellules souches cancéreuses ont été initialement découvertes dans la leucémie par Bonnet et Dick en 1997, qui ont montré que seules les cellules exprimant les marqueurs CD34⁺CD38⁻ pouvaient initier cette maladie. En effet, les cellules souches hématopoïétiques expriment le marqueur de surface CD34, tandis que CD38 est un marqueur exprimé par les cellules plus différenciées. La capacité des CSC à reproduire l'hétérogénéité tumorale a été confirmée dans les cancers solides, notamment dans le cancer du sein, grâce à d'autres marqueurs phénotypiques similaires, à savoir CD44⁺CD24⁻. Cette découverte a depuis été étendue à de

nombreux autres cancers solides, soulignant leur rôle crucial dans la progression de la pathologie (Bonnet & Dick, 1997 ; Al-Hajj *et al.*, 2003).

Si les cellules souches cancéreuses sont traditionnellement associées à des cellules souches normales ayant accumulé de nombreuses mutations au fil du temps, elles peuvent également émerger à partir de cellules progénitrices porteuses de mutations. Ces cellules subissent alors un processus de dédifférenciation pour acquérir des caractéristiques de cellules souches (Tirino *et al.*, 2013 ; Islam *et al.*, 2015).

Dans la hiérarchie cellulaire normale, les cellules souches génèrent des progéniteurs qui, à leur tour, produisent tous les types cellulaires matures constituant un tissu spécifique. Bien que la cellule initiale d'une tumeur puisse être un progéniteur commun, les modifications épigénétiques accumulées par une cellule au sein de la population anormale pendant l'oncogenèse peuvent induire l'apparition de CSC. Selon ce modèle, seules ces cellules possèdent la capacité d'initier la formation d'une tumeur (Visvader, 2011).

Ces CSC partagent des caractéristiques communes avec les cellules en dormance, notamment leur capacité de quiescence réversible pouvant initier la formation métastatique (Aguirre-Ghiso, 2007).

B) L'influence du microenvironnement sur la dormance tumorale

Les cellules tumorales disséminées (DTC) peuvent entrer dans un état de dormance après leur dissémination dans différents organes. Ce processus est influencé par leur microenvironnement qui peut être permissif ou restrictif à la dormance : on parle de **niche** (Murrell *et al.*, 2014).

Au sein de la **niche endostéale**, la MRD peut être induite par des signaux qui régulent la dormance des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse. Ainsi, le *growth arrest-specific gene 6* (GAS6) régule la survie des cellules leucémiques en induisant un état d'arrêt du cycle cellulaire, tandis que des études sur le cancer de la prostate ont montré que GAS6 favorise la dormance des cellules tumorales disséminées lorsque la signalisation du récepteur AXL est prédominante (Bragado *et al.*, 2013 ; Shiozawa *et al.*, 2008 ; Joseph *et al.*, 2012 ; Gao *et al.*, 2012). De même, des signaux tels que les *Bone Morphogenic Proteins 7 et 4* (BMP7, BMP4) et le TGF β 2 sont sécrétés par les cellules stromales de la moelle osseuse, et peuvent induire la dormance en modulant des voies de signalisation cellulaire, influençant le ratio ERK/p38 (Aguirre-Ghiso *et al.*, 2003 ; Gao *et al.*, 2012). Ces découvertes suggèrent que les signaux du microenvironnement pourraient jouer un rôle dans la régulation de la dormance des cellules tumorales, et ce dans différents types de cancer.

La sortie de dormance des cellules tumorales est régulée par divers mécanismes. Ainsi, au sein de la **niche vasculaire**, l'activation de la protéine d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (VCAM1) permet aux DTC de réintégrer le cycle

cellulaire et de former des métastases osseuses en recrutant des progéniteurs d'ostéoclastes (Lu *et al.*, 2011). De façon similaire, la périostine (POSTN) produite par les cellules endothéliales et les fibroblastes favorise également la sortie de dormance (Ghajar *et al.*, 2013) des DTC. Ces cellules peuvent également modifier leur microenvironnement pour soutenir la prolifération, après avoir quitté l'état de dormance, grâce à des mécanismes impliquant des protéines telles que la myosine légère kinase (MLCK) et la fibronectine par exemple (Barkan *et al.*, 2008). Ces données soulignent l'importance de la communication entre les DTC et leur microenvironnement dans la régulation de la dormance tumorale (Figure 3).

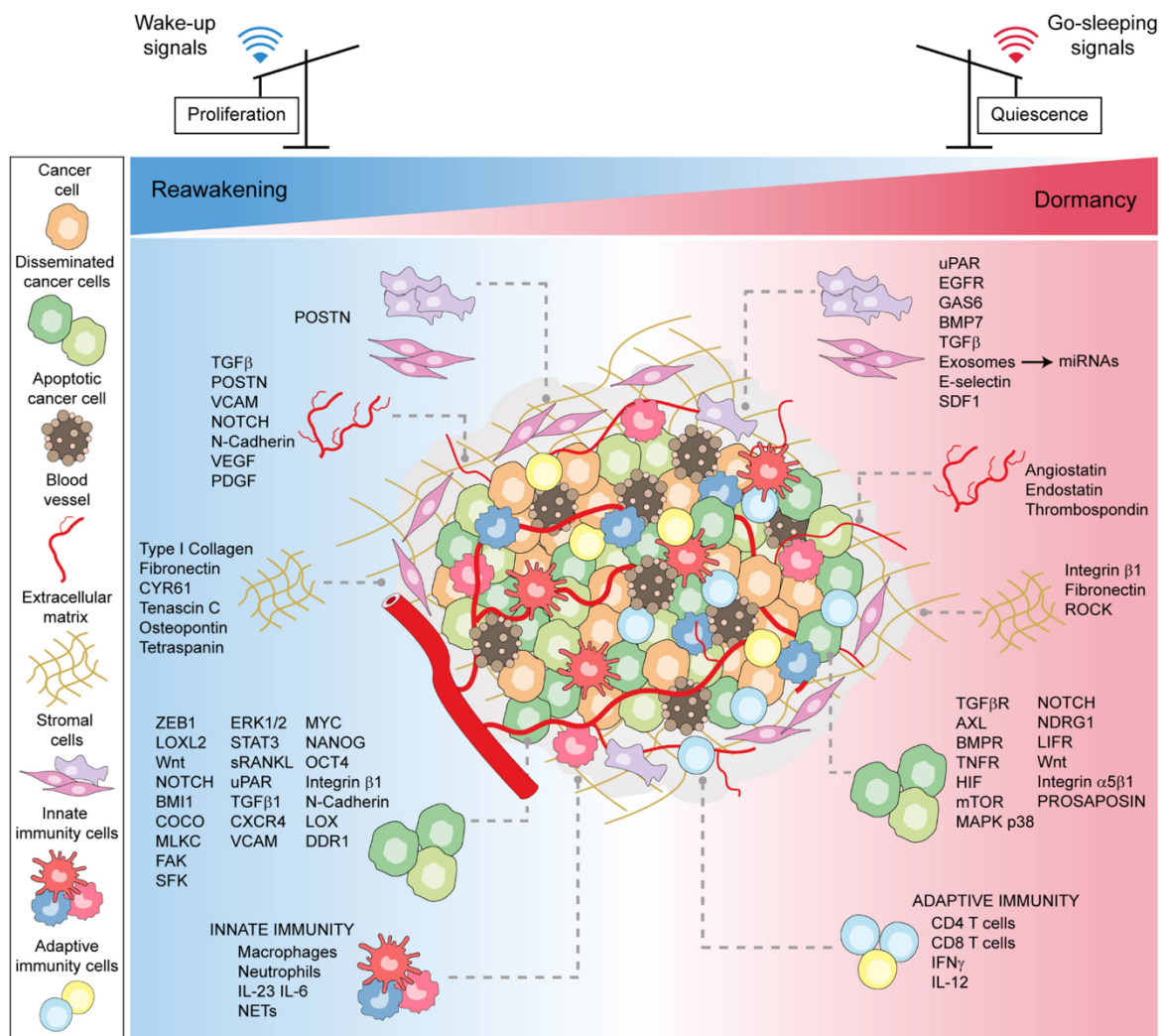


Figure 3 : Mécanismes microenvironnementaux influençant l'entrée ou la sortie de dormance (Sistigu *et al.*, 2020).

C) La dormance immunologique : l'axe PD-1/PD-L1 au cœur de la régulation immunitaire

Le **système immunitaire** joue un rôle actif dans la régulation des cellules tumorales en induisant leur élimination, en contrôlant leur croissance par induction de la dormance tumorale, ou en les remodelant en cas d'échappement tumoral. Chez des patients recevant des organes de donneurs en rémission clinique, une dormance tumorale induite par le système immunitaire a été observée, ce qui souligne l'implication de la réponse immunitaire dans le maintien de la dormance tumorale (Kauffmann *et al.*, 2000 ; Myron Kauffmann *et al.*, 2002). Dans divers modèles expérimentaux, l'implication du système immunitaire adaptatif incluant les lymphocytes T (LT) CD8⁺ a été décrite dans l'induction de la quiescence des cellules tumorales via la production d'interféron gamma (IFN- γ) (Farrar *et al.*, 1999).

Les récepteurs inhibiteurs du **LT CD8⁺** régulent l'activation et l'inactivation des lymphocytes T pour prévenir une stimulation chronique, évitant ainsi l'apparition de pathologies (Wherry et Kurachi, 2015).

Codée par le gène PDCD1 (*Programmed cell death 1*), l'expression de la glycoprotéine PD-1 est favorisée par NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) pour réguler l'activation des lymphocytes T (Oestreich *et al.*, 2008). Lorsque PD-1 se lie à son ligand PD-L1 ou PD-L2, la transduction du signal dépendant du *T-cell receptor* (TCR) est inhibée (Keir *et al.*, 2008). Le récepteur PD-1 se lie à ses ligands, PD-L1 et PD-L2, exprimés notamment par des cellules présentatrices d'antigènes (Fife *et al.*, 2009). En condition physiologique, les points de contrôle du système immunitaire

modulent l'activation des cellules immunitaires pour réguler la réponse immunitaire (Rodig *et al.*, 2003). La liaison de PD-1 à son ligand induit une cascade de signalisation altérant l'activation du lymphocyte T (Chemnitz *et al.*, 2004). Dans le modèle leucémique DA1-3b, il a été montré que les cellules cancéreuses en dormance échappent au système immunitaire en surexprimant PD-L1 (Saudemont *et al.*, 2004 ; Quesnel, 2008). Chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM), PD-L1 est exprimé dans 30 à 60% des blastes leucémiques. Une augmentation de l'expression de PD-L1 a par ailleurs été démontrée chez des patients au stade de MRD (Saudemont *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2017). (Figure 4)

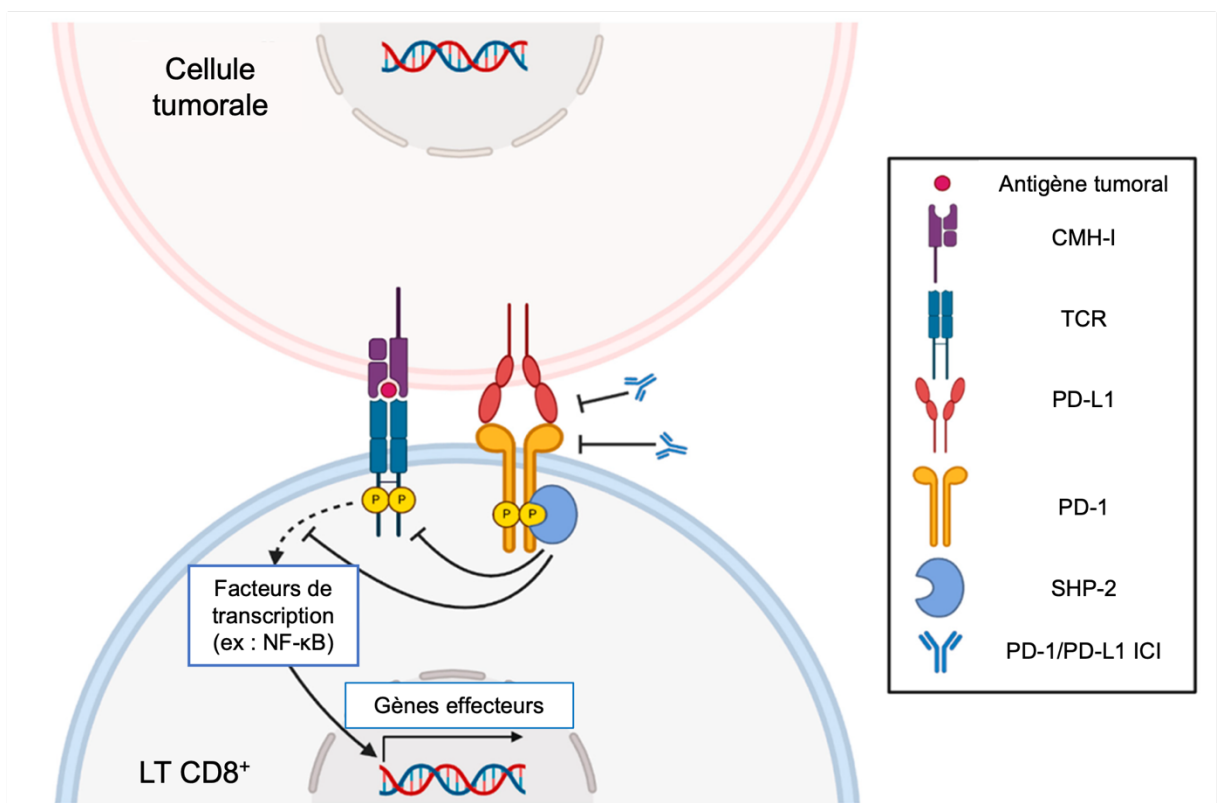


Figure 4 : Signalisation PD-1/PD-L1 entre le lymphocyte T CD8+ et la cellule cancéreuse.

La liaison de PD-L1 avec le récepteur PD-1 sur les cellules T activées entraîne le recrutement de SHP-2 à la queue cytoplasmique de PD-1. Ceci inhibe la signalisation du TCR nécessaire à l'activation des gènes effecteurs des cellules T. Les inhibiteurs de PD-1/PD-L1 bloquent cette voie inhibitrice, ce qui permet alors de restaurer la fonctionnalité des cellules T (adapté de Hoshi *et al.*, 2024).

D) La dormance angiogénique

Les tumeurs dépendent très souvent de l'**angiogenèse** pour leur croissance. Lorsque des DTC forment des micrométastases, elles recrutent de nouveaux vaisseaux sanguins. En cas d'échec de la vascularisation, un équilibre entre la prolifération et l'apoptose permet le maintien de la masse tumorale stable et dormante (Holmgren *et al.*, 1995).

En ce sens, les cellules endothéliales peuvent produire la thrombospondine (TSP) pour maintenir les DTC en dormance, tandis que des facteurs tels que le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) peuvent les activer. Les interactions entre les cellules endothéliales et les DTC peuvent donc influencer sur leur entrée et leur sortie de dormance (Weinstat-Saslow *et al.*, 1994 ; Indraccolo *et al.*, 2009).

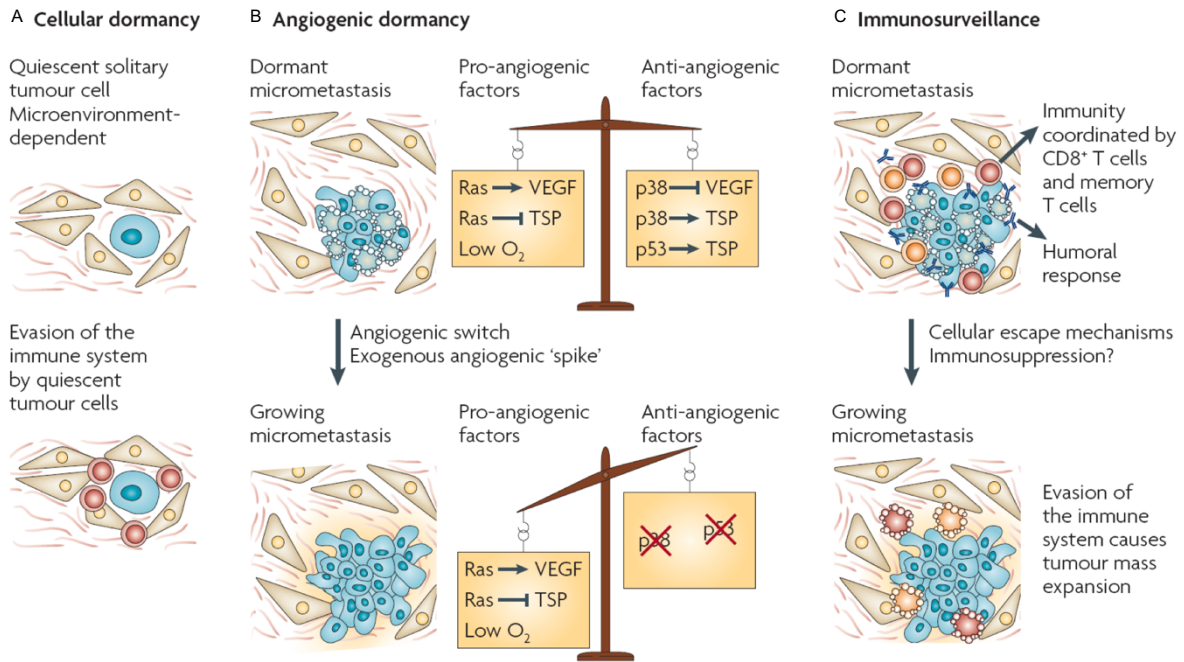


Figure 5 : Manifestations de la dormance tumorale.

(A) Pendant la phase de dormance, les cellules en phase G0-G1 peuvent développer des mécanismes d'échappement à la reconnaissance et à l'éradication du système immunitaire.

(B) La dormance angiogénique dépend de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques comme le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et la thrombospondine (TSP). Des mutations génétiques dans les voies régulant la dormance angiogénique ou des pics angiogéniques externes peuvent relancer la croissance tumorale. Par exemple, l'oncogène Ras peut stimuler le VEGF tout en inhibant la TSP. À l'inverse, la kinase p38 activée par le stress et le suppresseur de tumeur p53 peuvent induire la TSP ou inhiber le VEGF. Une perte de fonction de p53 et/ou de p38 peut favoriser un déséquilibre en faveur de l'angiogenèse.

(C) Dormance immunologique : les cellules tumorales sont maintenues à des niveaux bas grâce à l'activité du système immunitaire, y compris des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et des anticorps anti-idiotypiques ciblant les récepteurs des lymphocytes B. Cependant, cette dormance peut être perturbée si les cellules tumorales échappent au contrôle immunitaire en régulant à la baisse des antigènes spécifiques ou en exprimant des molécules costimulatrices induisant l'apoptose des lymphocytes T CD8+. Il reste à déterminer si ces différentes formes de dormance sont exclusives les unes des autres, mais il est probable qu'elles interviennent à des stades différents de la progression tumorale, la dormance cellulaire pouvant précéder l'immunosurveillance ou la dormance angiogénique.

(adapté de Aguirre-Ghiso, 2007)

III) Modèles d'étude de la maladie résiduelle minimale

Il existe une différence notable dans la manière dont les échantillons de MRD sont étudiés dans les cancers solides et les hémopathies malignes. En effet, l'analyse de ces échantillons est souvent limitée pour les premiers, car après un traitement initial, l'accès aux échantillons nécessaires de tissus solides est difficile. Cela rend alors complexe le prélèvement répété des biopsies. En revanche, dans les hémopathies malignes telles que la leucémie myéloïde ou le myélome multiple, il est plus courant de répéter les ponctions de moelle osseuse afin d'étudier les cellules résiduelles.

L'un des obstacles majeurs à l'étude de la MRD réside également dans le faible nombre de modèles expérimentaux de recherche, et dans la faible quantité de cellules de MRD.

A) Modélisations *in vivo*

Le modèle *in vivo* le plus couramment utilisé consiste en l'injection de lignées cellulaires dans la circulation sanguine de souris (Wang *et al.*, 2015) afin de réaliser une modélisation de l'état métastatique. Les métastases dérivées de DTC sont analysées. Grâce à ce système, la dormance tumorale est analysée à l'échelle multi organique, et les DTC sont suivies à l'échelle unicellulaire (Lawsen *et al.*, 2015). Les DTC en état de dormance peuvent alors être tracées dans divers organes, ce qui favorise la détection de marqueurs de la dormance (Sosa *et al.*, 2015).

L'étude de la MRD est également possible par l'utilisation de modèles de xénogreffes dérivées de patients (PDX, *Patient Derived Xenograft*) (Figure 6) (Sosa *et al.*, 2015) ou encore par des modèles transgéniques. Ces derniers peuvent modéliser la dormance grâce à un oncogène sous le contrôle d'un promoteur inducible (Abravanel *et al.*, 2015).

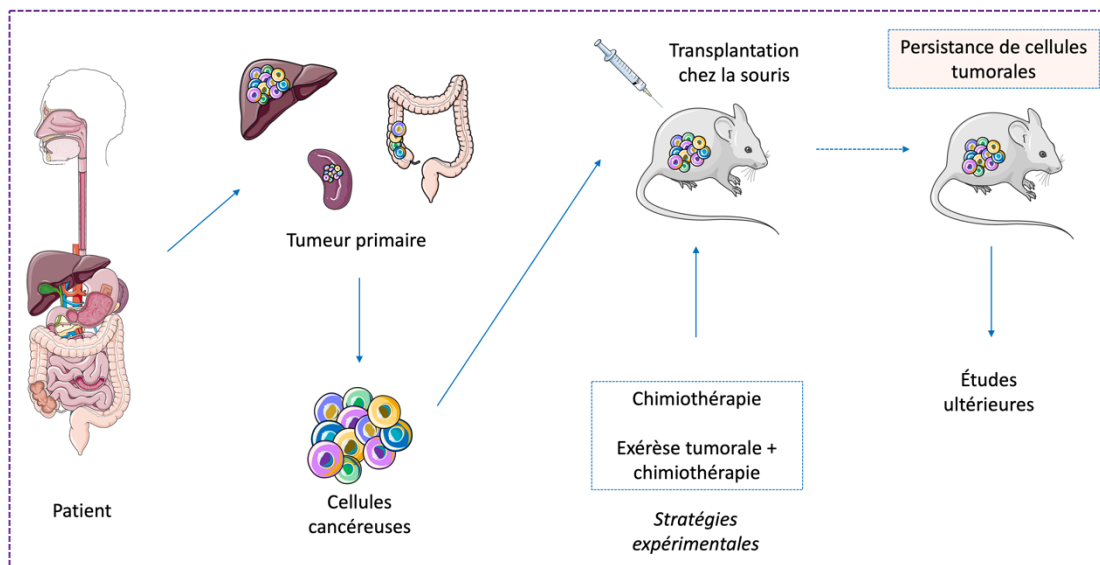


Figure 6 : Mise en place des modèles de MRD dans un modèle PDX.

Les cellules de patients sont isolées de leur organe de provenance, puis sont transplantées chez le modèle murin. Différentes stratégies sont mises en place pour mimer la MRD : soit par chimiothérapie, soit par exérèse tumorale suivie de chimiothérapie. Il y a persistance de cellules pour des études ultérieures.

L'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés (GEM, *Genetically engineered mouse models*) représente une stratégie essentielle à la compréhension de la MRD, car ces outils permettent l'étude plus rapide, à moindre coût et à plus grande échelle des mécanismes en comparaison avec les cohortes humaines (Marsh Durban *et al.*, 2013). Par édition génique, il est possible de mimer l'accumulation progressive de mutations que l'on observe chez l'homme (Cui *et al.*, 2007).

Quant aux modèles murins syngéniques, ils intègrent les notions de dynamique tumorale de la réponse au traitement, en prenant en compte le microenvironnement sans négliger la réponse immunitaire. Par principe de vaccination, le laboratoire a développé deux modèles de dormance tumorale murine de leucémie myéloïde et de mélanome (Saudemont *et al.*, 2004 ; Touil *et al.*, 2016). De même, de nouveaux modèles de transplantation syngéniques génétiquement modifiés, appelés allogreffes dérivées de GEM (GDA), proposent une réponse curative aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires avec une immunogénicité accrue (Zelenay *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2017).

B) Modélisations *in vitro*

La plupart des lignées de cellules cancéreuses présentent un statut prolifératif avancé. C'est pourquoi des essais *in vitro* utilisent des lignées cellulaires modélisant la dormance, comme par exemple la lignée de dormance 4T07 (Aslakson et Miller, 1992) qui est une lignée cancéreuse non métastatique de cancer du sein décrite pour son devenir dormant après dissémination dans les poumons (Tallón de Lara *et al.*, 2021). A noter qu'il existe également plusieurs lignées cellulaires dont la culture 3D *in vitro* induit un statut quiescent (Ghajar *et al.*, 2013 ; Marlow et Dontu, 2015).

Les DTC et les cellules tumorales circulantes exprimant des marqueurs de dormance peuvent également être retirées du patient par exérèse (Chery *et al.*, 2014 ; Vishnoi *et al.*, 2015).

Enfin, parce que la moelle osseuse est le siège métastatique de nombreux cancers, les modélisations de la niche sont de plus en plus fréquentes. L'objectif est d'étudier *in vitro* les modèles cellulaires dans un contexte reproduisant finement les interactions entre ces cellules et leur microenvironnement. En modélisant les caractéristiques de croissance *in vivo* de ces cellules, il est possible de décrypter les mécanismes associés à la niche osseuse (Barkan et Green, 2011 ; Voeltzel *et al.*, 2022). Voeltzel *et al.* (2022) ont ainsi élaboré un système de culture 3D de cellules mésenchymateuses et endothéliales au contact d'un biomatériau minéral particulaire afin de mimer certains aspects de la niche osseuse (Figure 7).

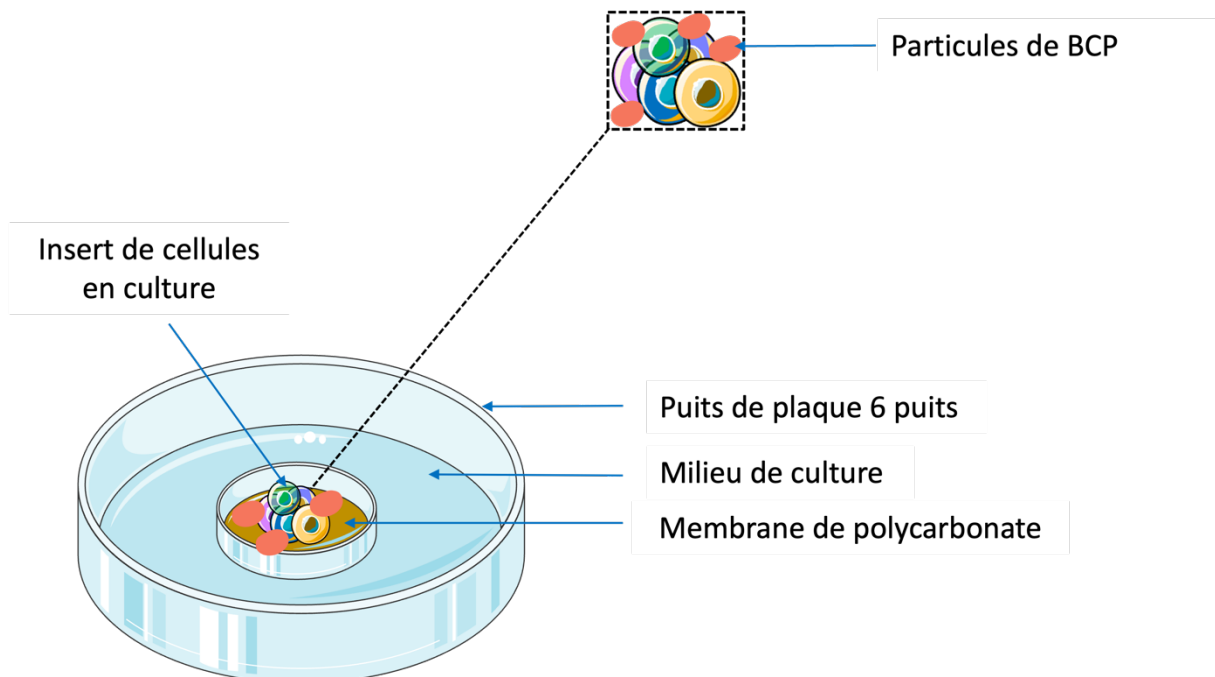


Figure 7 : Schéma de modélisation osseuse proposée par Voeltzel *et al.*, 2022. Établissement d'une structure osseuse 3D incluant une différenciation ostéoblastique *in situ* de cellules HS27A. Modéliser le microenvironnement pourrait contribuer à l'étude de ses interactions avec les cellules résiduelles.

IV) Approches thérapeutiques potentielles pour cibler la MRD

La MRD représente un défi important dans le cadre du traitement des cancers, notamment en raison de la dormance des cellules tumorales résiduelles, qui peuvent provoquer des récives tardives et des métastases. Bien que de nombreux progrès restent à accomplir pour concevoir des thérapies ciblant spécifiquement cette dormance tumorale, la recherche actuelle évolue rapidement vers des technologies de plus en plus novatrices. Plusieurs axes sont ainsi envisagés pour développer des traitements efficaces contre la MRD.

Une première piste consiste à explorer les mécanismes du microenvironnement tumoral afin de mieux caractériser les signatures de dormance des cellules cancéreuses. Ce microenvironnement joue un rôle crucial dans le maintien de la dormance, et une meilleure compréhension de cette niche pourrait permettre de concevoir des thérapies plus ciblées. Par ailleurs, un autre axe de recherche se concentre sur le ciblage des cellules tumorales disséminées (DTC), en s'appuyant sur une connaissance approfondie de leurs mécanismes spécifiques. Dans ce contexte, deux approches thérapeutiques opposées émergent : d'une part, la reprogrammation des cellules dormantes afin de les forcer à réintégrer le cycle cellulaire, ce qui permettrait de les cibler avec des traitements spécifiques aux cellules en prolifération. D'autre part, il est également envisagé de maintenir l'état de dormance de ces cellules résiduelles pour éviter une résurgence incontrôlée de la maladie (Quesnel *et al.*, 2008) (Figure 8).

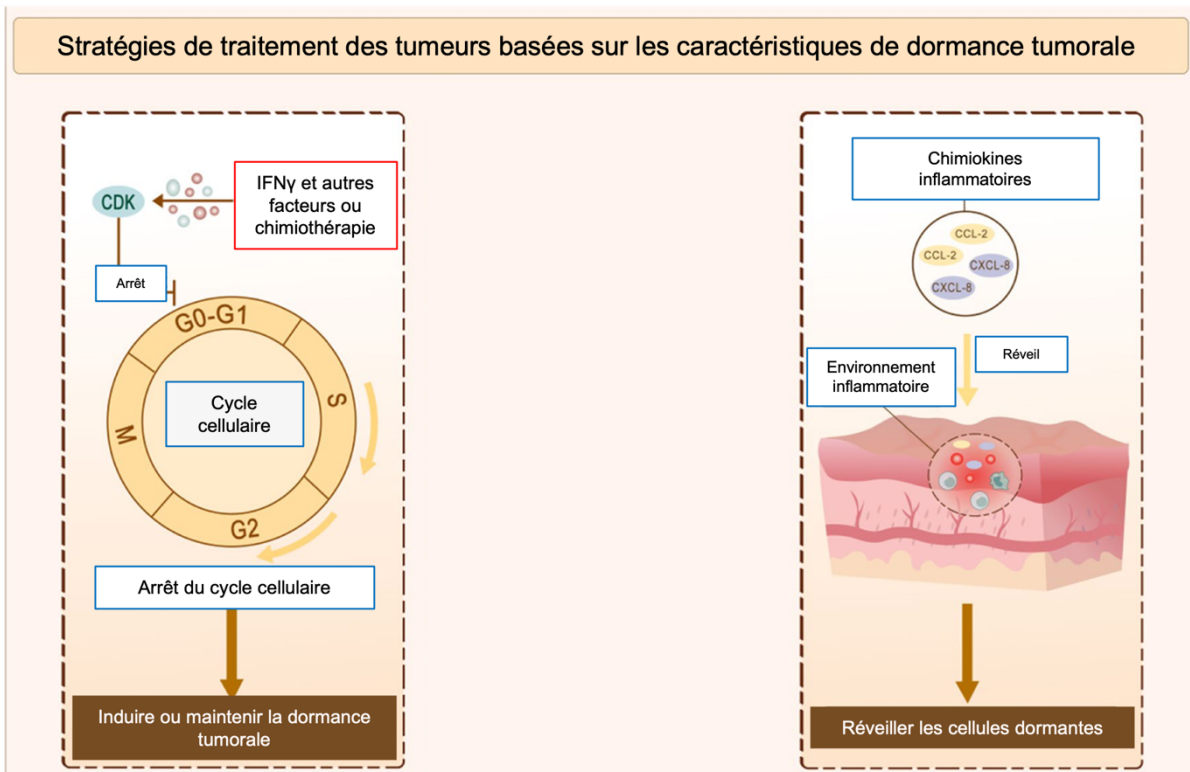


Figure 8 : Schématisation des stratégies thérapeutiques pour cibler la dormance tumorale.

Plusieurs approches sont considérées : induire ou maintenir la dormance, ou induire une sortie de dormance des cellules cancéreuses. (Adapté de Wang *et al.*, 2024)

A) Importance de la compréhension du rôle de la niche

L'exploration des échantillons de MRD de patients permet la caractérisation des cellules cancéreuses dormantes et leur surveillance au fil du temps. Par conséquent, la découverte de nouvelles cibles et/ou marqueurs de dormance tumorale devrait aboutir à de nouvelles stratégies thérapeutiques en vue de prévenir la réactivation des cellules cancéreuses dormantes.

Dans ce contexte, de récentes études ont mis en lumière des découvertes significatives sur les mécanismes de dormance des DTC.

La détection du récepteur nucléaire NR2F1 (*Nuclear receptor subfamily 2 group F member 1, COUP-TF1*) pourrait discriminer deux sous-groupes de DTC : les NR2F1^{high} (où le récepteur est fortement exprimé) et les NR2F1^{low} (où le récepteur est faiblement exprimé). Le profilage de la MRD chez des patientes atteintes de cancer du sein a révélé que celles ayant des DTC NR2F1^{high} avaient des périodes sans métastases osseuses plus longues que celles possédant des DTC NR2F1^{low}. L'arrêt de croissance de NR2F1 inversement corrélé à l'expression de Ki67 (marqueur de prolifération cellulaire) pourrait en être la cause (Borgen *et al.*, 2018). Ainsi, **NR2F1 pourrait jouer un rôle important sur le maintien de dormance des DTC**. De même, le séquençage de l'ARN (acide ribonucléique) sur cellule unique sur des échantillons de patients a révélé la présence de **signature de dormance dans des DTC**, aussi bien dans les prélèvements de tumeurs primaires de foie que dans les prélèvements normaux mais contenant des DTC (Dudgeon *et al.*, 2020). Enfin, l'étude chez le patient de la présence de biomarqueurs est cruciale pour étudier la dormance tumorale. En effet, chez des patientes atteintes de cancer du sein, celles ayant des niveaux détectables de BMP7 dans la moelle osseuse avaient des **périodes non métastatiques plus longues** que celles dont la présence de BMP7 n'avait pas été détectée (Nobre *et al.*, 2021).

Ces exemples reflètent l'importance d'améliorer la compréhension du rôle de la niche et de la production de marqueurs de dormance afin de mieux concevoir les thérapies et d'éliminer les récives.

B) Induction ou maintien de la dormance tumorale

Un des axes explorés pour cibler la dormance tumorale consiste à moduler le cycle cellulaire des cellules cancéreuses afin de les mettre dans un état quiescent. Cette approche vise à ralentir la progression de la maladie et à empêcher la résurgence incontrôlée de la tumeur. L'activation du récepteur NR2F1 par des composés spécifiques comme le C26 a démontré son efficacité pour induire l'arrêt de la prolifération des cellules tumorales et inhiber la croissance et les métastases. En se liant aux promoteurs des gènes *p27*, *SOX9*, et *RARβ*, NR2F1 favorise l'expression d'inhibiteurs de cyclines tels que *p16* et *p21*. Cela mène à un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et à la quiescence cellulaire (Khalil *et al.*, 2022).

Le rôle du microenvironnement tumoral, en particulier la matrice extracellulaire (MEC), s'avère essentiel dans la régulation de la dormance. Des études ont montré que la MEC des tumeurs dormantes se caractérise par des fibres de collagène plus désorganisées, que dans les tumeurs proliférantes. De plus, l'ajout de collagène de type III dans la niche tumorale a permis de maintenir les cellules cancéreuses en dormance, suggérant que cette molécule pourrait jouer un rôle dans la conception de nouvelles thérapies (Di Martino *et al.*, 2024).

Enfin, le rôle des cellules immunitaires - comme les cellules Natural Killer - dans le maintien de la dormance a également été mis en avant. Ainsi, l'interféron-gamma produit par ces cellules peut contribuer à maintenir les cellules tumorales dans un état de dormance, limitant ainsi leur prolifération (Barrow *et al.*, 2024).

Ces découvertes ouvrent la voie à des traitements innovants visant à prolonger l'état de dormance et à empêcher la réactivation des cellules cancéreuses.

C) Réveiller la dormance pour une élimination ciblée

L'autre stratégie consiste à réactiver les cellules dormantes afin de les rendre vulnérables aux traitements. Les cellules dormantes échappent souvent aux chimiothérapies traditionnelles, qui ciblent les cellules en phase proliférative. Cependant, leur réactivation pourrait permettre au système immunitaire et aux traitements ciblés de les éliminer plus efficacement. Dans ce cadre, des études ont montré que l'inflammation joue un rôle clé dans la réactivation des cellules dormantes. Par exemple, les neutrophiles activés dans un contexte inflammatoire peuvent réveiller les cellules cancéreuses dormantes, comme observé dans les cancers du sein, du poumon et de la prostate (Denk *et al.*, 2024). Cependant, cette approche doit être suivie de près pour éviter une prolifération accélérée des tumeurs réactivées, l'expansion de cellules minoritaires portant des mutations ou l'apparition de métastases. Des stratégies thérapeutiques adaptées à la progression tumorale après réactivation seront nécessaires pour limiter ces risques.

D) Élaborer des essais cliniques pour cibler la MRD

Le ciblage de la MRD fait d'ores et déjà l'objet de nombreux essais cliniques basés sur la découverte de ces marqueurs de dormance.

Afin de prévenir les récurrences chez des patientes atteintes de cancer du sein pendant les phases de rémission, un essai de phase II est actuellement en cours. Il a pour visée de bloquer l'**autophagie** activée par les cellules cancéreuses. Pour ce faire, il s'agit d'utiliser des inhibiteurs de l'autophagie telle que l'hydroxychloroquine (HCQ) en combinaison avec des inhibiteurs de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (comme l'essai clinique NCT03032406).

Un autre essai consiste à **cibler les DTC dans la moelle osseuse** après chirurgie et thérapie adjuvante (NCT04841148). L'objectif est de tester la sécurité et l'efficacité de l'HCQ ainsi que d'un anticorps anti-PD-L1, avec ou sans inhibiteur des cyclines CDK4/6 (*cyclin-dependant kinases*) chez des patientes atteintes de cancer du sein ER⁺ à stade précoce.

En évaluant la mobilisation des DTC avant et après traitement (NCT04197999), un autre essai clinique de phase Ib sur GMI-1359 repose sur le blocage des fonctions de l'E-sélectine et du CXCR4 pour **mobiliser les DTC de la moelle osseuse**.

Enfin, l'acide zolédronique est utilisé (essais NCT00072020, NCT00172068) en vue de **réduire les métastases osseuses** chez les femmes ménopausées.

La diversité de ces essais cliniques actuellement en phases de tests soulignent l'intérêt d'étudier et de cibler la MRD pour améliorer l'efficacité thérapeutique.

La dormance tumorale peut être déterminée par un état épigénétique spécifique ; les DTC pourraient alors être reprogrammées pour adopter un phénotype

dormant. Cette découverte a conduit à l'élaboration d'un essai clinique (NCT03572387) utilisant deux drogues approuvées par la *Food and Drug Administration* (FDA), à savoir la 5-azacytidine et l'acide rétinoïque *all-trans*. L'objectif est d'**induire la dormance** chez des patients atteints de cancer de la prostate dont la MRD n'est pas détectable par imagerie traditionnelle. L'efficacité de cette reprogrammation est évaluée par le nombre de DTC, l'expression de NR2F1 et le niveau de signaux biochimiques associés à la dormance. Des technologies plus avancées comme l'analyse de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) ou le séquençage des génomes des DTC sont envisagées pour une meilleure compréhension des mécanismes de dormance.

Tous ces essais cliniques ont pour but la réduction des risques de rechute et de métastases. En identifiant des biomarqueurs spécifiques à la MRD, ces essais cliniques tendent à offrir une approche plus proactive et réactive face à la gestion de la pathologie, et donc une stratégie thérapeutique plus précise et personnalisée.

CHAPITRE 2 – Pathologies étudiées dans le cadre de la thèse de recherche

I) La leucémie aiguë myéloïde

A) L'hématopoïèse

1) *Les cellules souches hématopoïétiques à l'origine de l'hématopoïèse*

L'hématopoïèse est le processus de production et de développement des cellules sanguines à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la moelle osseuse. Ces CSH ont été découvertes *in vivo* en 1961 par James Till et Ernest McCulloch par une expérience de greffe de moelle osseuse de souris létalement irradiées, permettant la formation de colonies myélo-érythrocytaires spléniques. Cette expérience a mis en évidence des caractéristiques propres aux CSH : une capacité de prolifération conséquente, un auto-renouvellement permettant de donner naissance à des cellules identiques, mais pouvant aussi induire une différenciation cellulaire à l'origine de l'apparition de nouvelles populations cellulaires (Till et McCulloch, 1961).

Par division asymétrique, les CSH sont donc capables de produire une cellule souche fille identique et indifférenciée, maintenant la réserve de cellules souches, et une cellule fille qui, après de multiples divisions, est amenée à se différencier en une cellule aux propriétés nouvelles.

Afin de préserver la réserve en CSH et le bon ratio entre CSH et cellules différenciées, un équilibre est nécessaire entre prolifération et différenciation. Cet équilibre est maintenu par des mécanismes intrinsèques ou extrinsèques comme leur interaction avec le microenvironnement. Parmi les mécanismes intrinsèques, la quiescence de cellules souches est primordiale. Cet arrêt de prolifération permet d'éviter un épuisement de la réserve de CSH, mais aussi une trop forte production de cellules souches en défaveur de la production de cellules différenciées. En effet, une prolifération incontrôlée de cellules souches peut être à l'origine de l'induction de mutations. La réponse à un stress peut aussi être à l'origine d'une sortie de quiescence. (Van Velthoven et Rando, 2019 ; Urbán et Cheung, 2021 ; Boyd et Rodrigues, 2018 ; Wilson et Trumpp, 2006 ; Essers *et al.*, 2009).

2) L'hématopoïèse, un modèle hiérarchique évolutif redéfinissant les stades de différenciation

S'il a longtemps été admis que les CSH figuraient au sommet de la pyramide de différenciation des cellules sanguines, le modèle hiérarchique classique de l'hématopoïèse est désormais remis en question. En effet, il existe une hétérogénéité au sein même des progéniteurs de cellules souches, complexifiant alors ce modèle.

Dans le modèle hiérarchique classique, les CSH ayant une longue capacité d'auto-renouvellement (LT-HSC) se différencient en CSH ayant une plus courte durée d'auto-renouvellement (ST-HSC), puis en progéniteurs multipotents (MPP) avec une capacité d'auto-renouvellement restreinte. Les MPP peuvent ensuite se différencier en deux lignées bien distinctes : la lignée myéloïde initiée par les progéniteurs myéloïdes

communs (CMP), et la lignée lymphoïde initiée par les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Ainsi, chaque progéniteur est à l'origine d'une lignée strictement définie, engendrant des cellules différenciées précises suite à des facteurs de transcription ou encore des cytokines. (Figure 9)

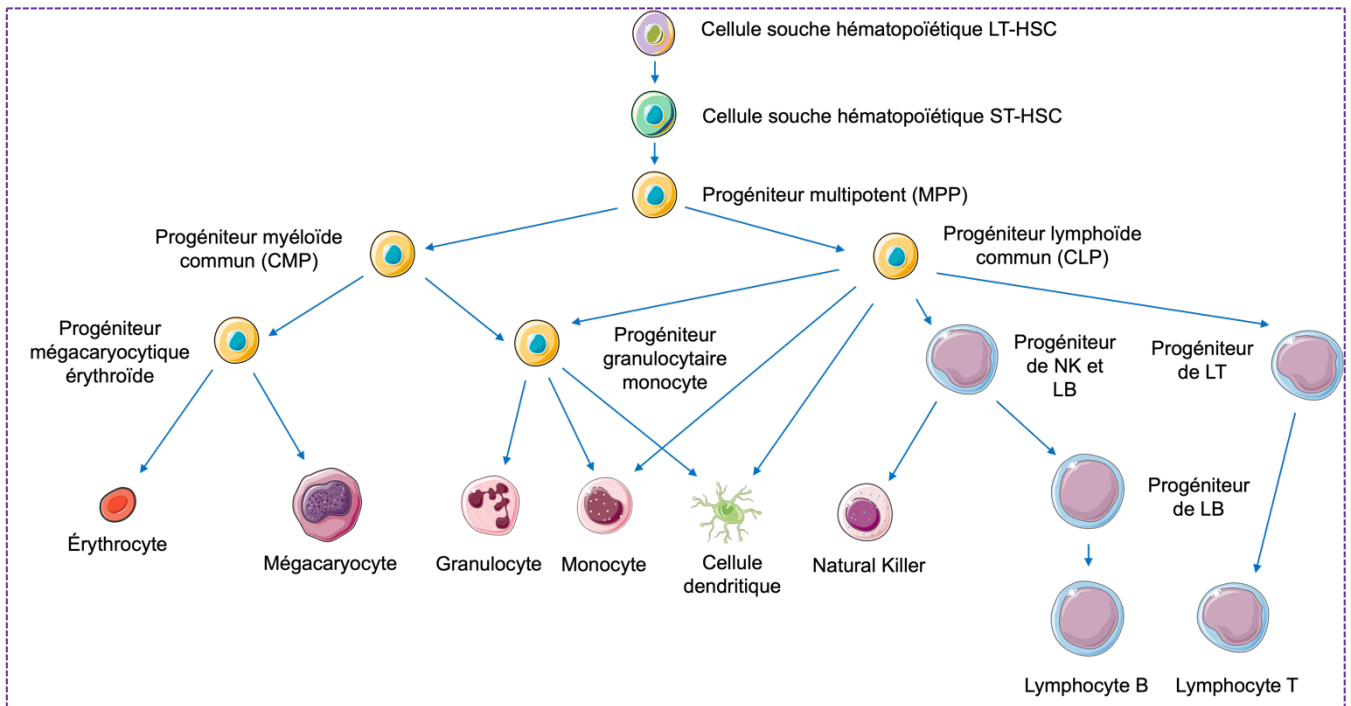


Figure 9 : Modèle hiérarchique simplifié classique de l'hématopoïèse.

Les moyens technologiques actuels ont permis la révision de cette binarisation de l'hématopoïèse. Il est désormais considéré que le destin de la cellule différenciée est initié par un continuum de cellules indifférenciées, sans transition majeure par des progéniteurs multipotents ou unipotents définis. (Velten *et al.*, 2017) Ainsi, il n'y a pas de frontière stricte entre les cellules souches et les progéniteurs (Laurenti et Gottgens, 2018) (Figure 10).

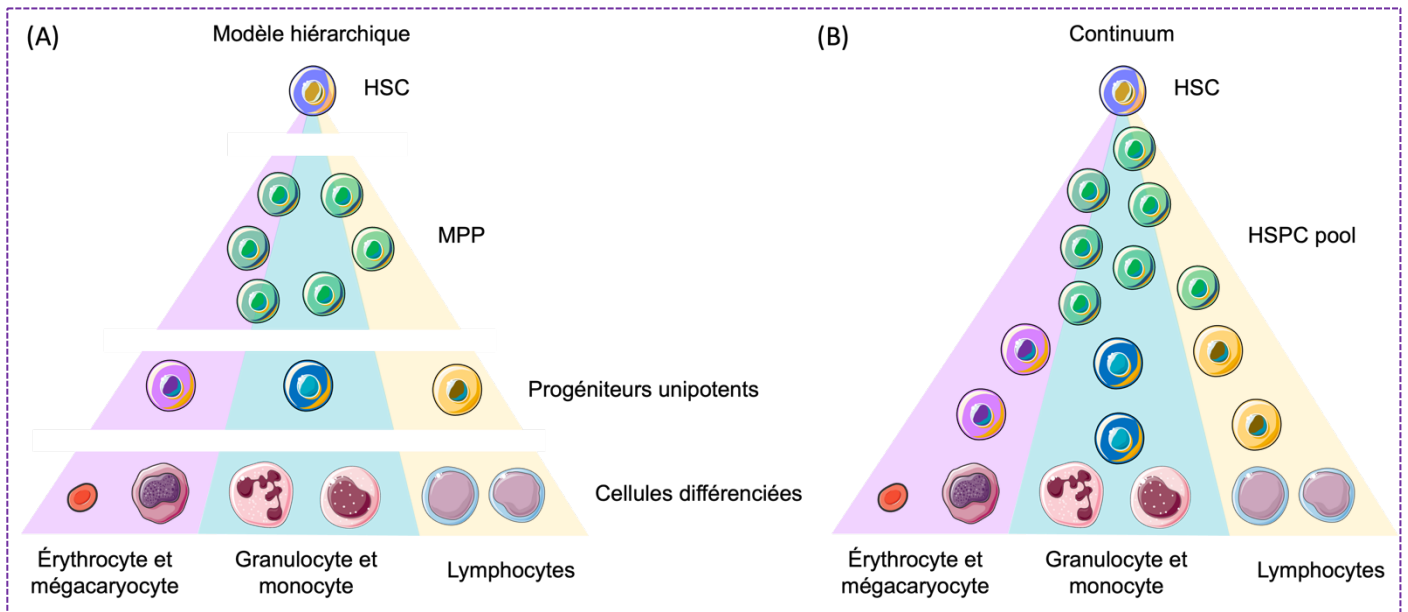


Figure 10 : L'hématopoïèse, un continuum de différenciation.

(A) Modèle historique de l'arbre de différenciation montrant les LT-SCH qui se divisent en différentes lignées de cellules via les CMP et les MPP. (B) Modèle plus récent et nuancé présentant un pool de CSH aptes à évoluer en cellules spécialisées via une transition graduelle. (Inspiré de *Cheng et al.*, 2020)

B) La leucémie aiguë myéloïde (LAM)

1) *Description de la pathologie*

Les leucémies myéloïdes sont des hémopathies malignes ayant pour origine une aberration génétique entraînant un arrêt de la différenciation et une prolifération clonale de précurseurs myéloïdes appelés blastes. Leur prolifération entraîne un déséquilibre de la proportion de cellules souches hématopoïétiques par rapport aux cellules différenciées. L'hématopoïèse ainsi perturbée nuit à la production normale des cellules sanguines, et donc à la préservation du système immunitaire par l'organisme.

Ces cellules leucémiques peuvent alors envahir la moelle osseuse (MO), la circulation sanguine et ensuite atteindre d'autres organes (Doulatov *et al.*, 2022).

Les leucémies myéloïdes aiguës (LAM) présentent une incidence de 3 cas par an pour 100 000 habitants en France, et 5 à 8 cas pour 100 000 individus de moins de 50 ans en Europe. Au-delà de plus de 80 ans, cette incidence s'élève à 20 cas pour 100 000 personnes. L'âge médian au diagnostic est de 68 ans, et si la pathologie n'exclut aucune tranche d'âge, plus de 75% des patients sont diagnostiqués après 25 ans (Mwirigi, Dillon et Raj, 2017).

2) Facteurs de risque

De multiples événements peuvent initier le développement des leucémies myéloïdes, notamment le tabagisme chronique ou l'exposition élevée au benzène. Cependant, les facteurs environnementaux ne peuvent expliquer l'apparition de la maladie que pour une faible proportion des patients (Niederhuber, J.E. *et al.*, 2014 ; Hou et Tien, 2020).

Certains traitements thérapeutiques peuvent également être à l'origine du développement de la pathologie. C'est le cas des radiations ionisantes (radiothérapies) ou encore des agents chimiothérapeutiques (inhibiteurs de la topoisomérase II, épipodophylotoxines mais aussi alkylants). Ces facteurs peuvent notamment induire une hématopoïèse clonale (Maleki *et al.*, 2021).

Parfois, ce sont des mutations génétiques apparaissant *de novo* qui favorisent l'apparition des leucémies myéloïdes. C'est le cas des gènes *EV1* (*Early Viral 1*), *GATA-1* (*Guanine Adenine Thymine Adenine 1*), mais aussi de la trisomie 21, de la neurofibromatose, ou encore des virus HTLV (*Human T-lymphotropic virus*) et Epstein-Barr (Niederhuber, J.E. *et al.*, 2014).

Enfin, la leucémie myéloïde peut résulter d'une hémopathie, comme l'anémie aplasique, le syndrome myéloprolifératif ou encore le syndrome myélodysplasique. Sans traitement, les leucémies myéloïdes peuvent évoluer de la phase chronique – caractérisée par la prolifération excessive d'éléments différenciés de la lignée myéloïde – à une phase d'accélération décrite par l'apparition d'éléments indifférenciés, les blastes, dans le sang. Ceci correspond alors à un tableau clinique de leucémie aiguë myéloïde (Zeichner et Arellano, 2015).

3) Les altérations génétiques, actrices phares de l'hématopoïèse clonale dans les LAM

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) résulte généralement de l'accumulation progressive de mutations génétiques, qui jouent un rôle central dans la majorité des cas. Ces mutations peuvent être classées en mutations primaires et mutations secondaires (Figure 11).

Les mutations primaires incluent des anomalies génétiques récurrentes, telles que des translocations impliquant les gènes *KMT2A*, *RARA* et *MECOM*, qui définissent des sous-types spécifiques de LAM. Ces anomalies sont cruciales pour

l'initiation de la leucémie, conférant aux cellules affectées un avantage de prolifération, les poussant à se multiplier de manière incontrôlée. D'autres mutations primaires, comme celles affectant la région bZIP du gène *CEBPA*, caractérisent également un sous-type distinct de LAM avec un pronostic favorable, que ces mutations soient présentes en configuration bi - ou mono allélique (Döhner *et al.*, 2022).

En parallèle, des mutations secondaires apparaissent au cours de l'évolution de la maladie, aggravant souvent le pronostic. Ces mutations incluent des altérations dans des gènes associés aux syndromes myélodysplasiques, un groupe de désordres hématologiques qui prédisposent à la leucémie, tels que *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2*, *SF3B1* et *SRSF2*. Ces mutations sont généralement liées à un pronostic défavorable, même lorsqu'elles surviennent dans des cas de LAM *de novo*. Parmi ces mutations, la mutation du gène *TP53* est particulièrement significative. Associée à des caryotypes complexes, elle confère un très mauvais pronostic et définit désormais un sous-type distinct de LAM, prenant la priorité sur d'autres mutations dans la classification diagnostique (Döhner *et al.*, 2022).

L'accumulation de ces altérations génétiques peut conduire à une hématopoïèse clonale, définie par l'apparition de mutations somatiques dans les cellules sanguines ou médullaires d'individus ne présentant pas d'hémopathie ou d'anomalie cytologique. Ce phénomène, bien que se produisant aussi chez des individus initialement sains, augmente le risque de développer une hémopathie maligne, telle que la LAM, constituant ainsi un état pré-leucémique potentiel (Danlos, Papo et Micol, 2019 ; Jaiswal et Ebert, 2019). Les gènes les plus fréquemment concernés par l'hématopoïèse clonale incluent *DNMT3A* (ADN méthyltransférase 3),

muté dans plus de 20 % des LAM et associé à un mauvais pronostic, et *TET2* (Ten-eleven translocation 2), qui est muté ou délété dans 10 % des cas (Xie *et al.*, 2014 ; Delhommeau *et al.*, 2009). D'autres gènes impliqués dans la régulation épigénétique de l'ADN, tels que *IDH1*, *IDH2* (Isocitrate déshydrogénases NADP⁺ 1 et 2) et *ASXL1*, sont également souvent mutés dans le contexte de la LAM. Dans ces clones pré-leucémiques, des mutations secondaires peuvent se développer, notamment celles concernant les gènes *NPM1* (nucléophosmine) et *FLT3* (Fms-like tyrosine kinase 3), qui initient le développement de la pathologie (Döhner *et al.*, 2017).

La multiplicité des clones pouvant évoluer dans la pathologie entraîne une résistance importante aux traitements et favorise la survie d'un clone parfois minoritaire, ce qui peut induire des rechutes.

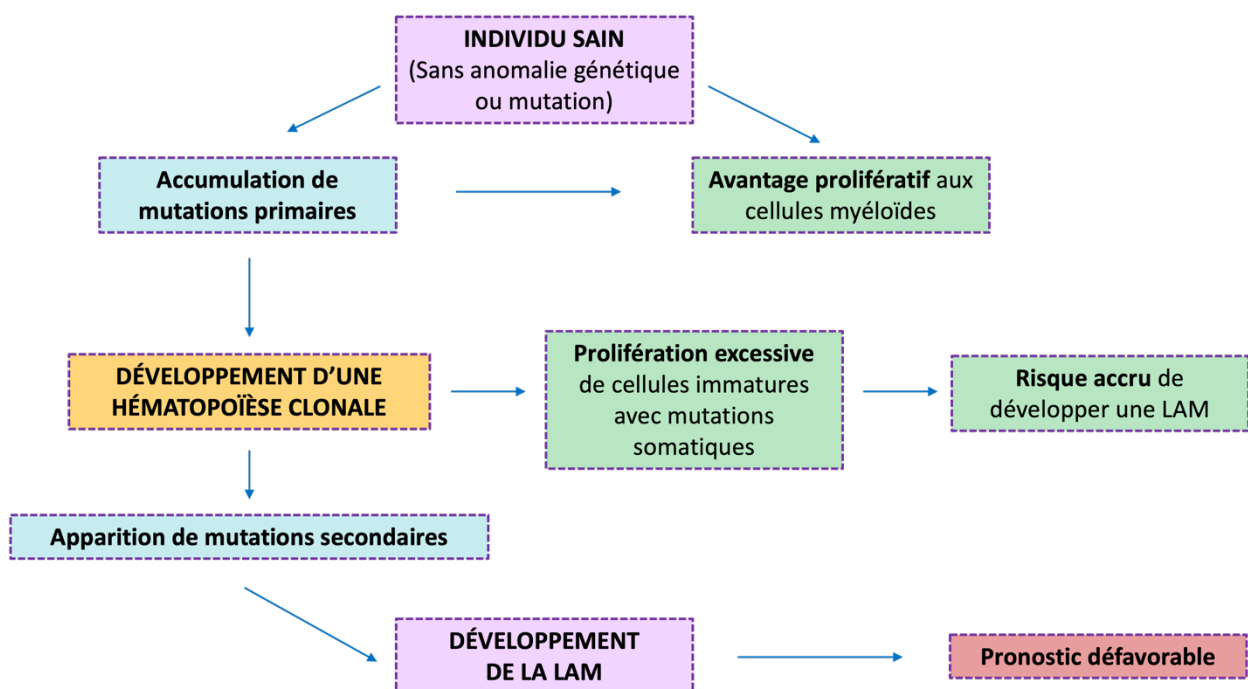


Figure 11 : Schéma de flux de l'accumulation des mutations et du développement de la LAM.

4) Classification des leucémies aiguës myéloïdes

Parce que les leucémies myéloïdes sont des pathologies complexes aux altérations génétiques multiples, elles font l'objet de différentes classifications, basées sur des critères étiologiques, morphologiques, génétiques et sur le phénotypage immunitaire.

Le système de classification franco-américano-britannique FAB est le premier référentiel faisant foi jusqu'en 2001. Il utilise les caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques et cytochimiques des cellules pour établir 10 sous-types de LAM, définis lors de la réalisation du myélogramme. Ce système est nécessaire au diagnostic et à l'orientation de la prise en charge initiale, mais n'est pas un indicateur de l'agressivité de la maladie (Döhner *et al.*, 2022).

En 2001, consciente des limites prodiguées par la classification FAB, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi une nouvelle méthode de classification impliquant alors la description morphologique, l'immunophénotypage, mais aussi les données cliniques et les mutations génétiques. La dernière mise à jour de ce système date de 2016. Dans cette version, les LAM sont divisées en 6 sous-types : (1) les LAM avec anomalies ou mutations génétiques récurrentes, (2) les LAM avec anomalies liées à la myélodysplasie, (3) les néoplasmes myéloïdes liés aux traitements, (4) les LAM non spécifiées (NOS), (5) les sarcomes myéloïdes, et (6) les LAM associées à la trisomie 21 (Döhner *et al.*, 2022). Comme la classification FAB, le système proposé par l'OMS ne prend pas en compte la gravité de la pathologie, et ne permet pas un meilleur pronostic, ni une thérapie adaptée.

En 2010, l'*European LeukemiaNet* (ELN) a alors créé un nouveau système de catégorisation rendant mieux compte de l'hétérogénéité biologique et clinique des leucémies myéloïdes, afin d'y inclure la notion de pronostic. Ainsi, 3 catégories ont été considérées selon le risque : favorable, intermédiaire et défavorable. Cette classification inclut des critères morphologiques, cytogénétiques, hématologiques et de génie moléculaire (Arber *et al.*, 2016) (Tableau 1).

Sous-type	Anomalies génétiques majeures
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> t(8;21)(q22;q22.1) ; RUNX1:RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11 Mutation NPM1 sans mutation FLT3-ITD Mutation CEBPA bZIP dans le cadre de lecture
Intermédiaire	<ul style="list-style-type: none"> Mutation NPM1 avec mutation FLT3-ITD t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A
Défavorable	<ul style="list-style-type: none"> t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EV11) (8;16)(p11;p13)/KAT6A::CREBBP t(3q26.2;v)/MECOM(EV11)-modifié Mutations de RUNX1, ASXL1, TP53, BCOR, EZH2, SF3B1, STAG2, SRSF2, U2AF1 ou encore ZRSR2f

Tableau 1 : Classification de l'ELN des LAM, d'après Shimony, 2023.

Malgré l'aide considérable qu'apporte cette nouvelle classification dans la prise en charge thérapeutique, il persiste une hétérogénéité conséquente à l'intérieur de chaque groupe de risque. Le profil mutationnel de chaque patient est alors à prendre en compte. Ainsi, les patients leucémiques présentant des mutations de *NPM1* ou *DNMT3A* auraient un pronostic amélioré avec une chimiothérapie d'induction à haute dose (Patel *et al.*, 2012).

5) Diagnostic des leucémies aiguës myéloïdes

a. Examens préliminaires

La numération de la formule sanguine (NFS) peut mettre en évidence des anomalies telles que la baisse du taux d'hémoglobine, des polynucléaires et des plaquettes, ou encore une expansion du nombre de leucocytes. La suspicion de la leucémie amène alors le praticien à réaliser un myélogramme sur le patient. Cet examen consiste en un prélèvement sous anesthésie locale d'une quantité modérée de moelle osseuse par ponction et aspiration des os iliaques ou du sternum. Chez le bébé, c'est parfois le tibia qui est privilégié. Les populations cellulaires sont ainsi analysées selon des aspects morphologiques et génétiques. Les résultats sont complétés par l'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR). A partir de ces éléments, le praticien définira la stratégie thérapeutique à mettre en place. Celle-ci prend également en compte les facteurs pronostiques dont les comorbidités et l'âge. (Guide de bonnes pratiques des ponctions médullaires, Société Française d'Hématologie).

b. Analyses cytologiques et immunophénotypage

Grâce à la cytométrie en flux, il est possible de caractériser les aberrations dans l'expression des protéines, le plus souvent membranaires. On peut ainsi constater l'expression de marqueurs différents de ceux de la lignée myéloïde, ou encore une modulation de leur expression en comparaison à celle des cellules de l'hématopoïèse normale (Preudhomme *et al.*, 2020). L'immunophénotypage va donc définir le

phénotype anormal des cellules leucémiques (LAIP : *leukemia-associated immunophenotype*) auquel on peut inclure les marqueurs impliqués dans le blocage de la différenciation, ou la leucémogénèse : CD34, CD45, CD90/CD45RA, CD117, CD33, CD133, CD13, CLL1/TIM3/CD97, CD123, CD7, CD56, CD19. Les technologies actuelles permettent d'associer le phénotype suivant aux cellules souches leucémiques : CD34⁺/CD38⁻/CD90⁻/CD45RA⁺/CD123⁺/CD97⁺/TIM-3⁺/CLL-1⁺ (Jentzsch *et al.*, 2017).

c. Importance des analyses génétiques et moléculaires

Pour établir une approche thérapeutique optimisée dans le traitement de la LAM, il est essentiel d'examiner les anomalies génétiques. Cette analyse, intégrée dans la classification ELN, permet de prendre en compte la gravité des différentes variantes de la maladie. Les anomalies génétiques observées dans la LAM comprennent une diversité de mutations, telles que celles affectant les gènes *NPM1*, *RUNX1* (*runt related transcription factor 1*), *CEBPA* (CCAAT enhancer binding protein alpha) et *FLT3*. On trouve également des fusions génétiques comme *CBFB::MYH11* et *RUNX1::RUNX1T1*, ainsi que des translocations, des inversions chromosomiques et d'autres anomalies chromosomiques associées aux syndromes myélodysplasiques. Parmi ces anomalies, certaines sont clairement liées à un pronostic défavorable, tandis que d'autres offrent des perspectives plus nuancées. Par exemple, la combinaison de la mutation *NPM1* avec celle de *FLT3-ITD* (internal tandem duplications) complique le pronostic, tandis que la mutation *NPM1* isolée ou en association avec des mutations des gènes *IDH1/2* peut conduire à une évaluation plus positive (Döhner *et al.*, 2022).

L'immunophénotypage, effectué par cytométrie en flux multiparamétrique, constitue un élément fondamental pour un diagnostic précis de la LAM. Cette technique permet d'identifier divers marqueurs de surface et intracellulaires des cellules, soulignant ainsi l'hétérogénéité inhérente à cette maladie. Il est important de noter qu'aucun marqueur n'est universellement exprimé, ce qui complique le processus de diagnostic. Dans les cas où un prélèvement médullaire n'est pas possible et où les blastes circulants sont absents, la confirmation du phénotype myéloïde peut être réalisée à l'aide d'une biopsie de la moelle osseuse, accompagnée de techniques d'immunohistochimie (Döhner *et al.*, 2022).

L'analyse cytogénétique classique est une étape indispensable dans l'évaluation de la LAM. Lorsque cette analyse ne fournit pas de résultats concluants, l'hybridation in situ par fluorescence représente une alternative efficace pour déceler des anomalies spécifiques, notamment les fusions de gènes comme *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *KMT2A (MLL)* et *MECOM (EVI1)*, ainsi que des anomalies chromosomiques associées aux syndromes myélodysplasiques, telles que la perte de matériel des chromosomes 5q, 7q ou 17p.

Les tests de génétique moléculaire doivent être effectués afin de détecter toutes les anomalies génétiques pertinentes qui caractérisent la LAM et les catégories de risque, ainsi que celles nécessaires pour des traitements ciblés. Ces analyses peuvent être réalisées à l'aide de plateformes de diagnostic capables d'évaluer simultanément les mutations et les réarrangements. Il est toutefois essentiel d'interpréter ces résultats avec prudence, car les tissus hématopoïétiques peuvent présenter des réversions

somatiques, entraînant ainsi des résultats faussement négatifs. De plus, ces tests peuvent ne pas détecter les variants de nombre de copies germinales, qui sont relativement fréquents et représentent des allèles de prédisposition.

Enfin, pour les patients porteurs de mutations NPM1 et présentant une LAM à core-binding factor, il est conseillé d'effectuer une évaluation moléculaire initiale par PCR quantitative (qPCR) ou par PCR digitale (dPCR). Cela facilite le suivi de la maladie résiduelle minimale après traitement (Döhner *et al.*, 2022).

6) Thérapies des leucémies aiguës myéloïdes

a. La chimiothérapie conventionnelle

L'objectif thérapeutique consiste en l'élimination des blastes leucémiques et a pour visée de retrouver une numération sanguine saine : on parle de rémission complète. Pour arriver à ce résultat, le traitement proposé au patient s'articule en trois temps : la chimiothérapie d'induction, la chimiothérapie de consolidation et la chimiothérapie d'intensification ou allogreffe de la moelle osseuse (Döhner *et al.*, 2022).

i. La chimiothérapie d'induction

Elle repose sur l'utilisation de cytarabine et d'anthracyclines. Ces dernières s'intercalent entre les paires de bases azotées de l'ADN, inhibant ainsi l'action de la topoisomérase II. Quant à la cytarabine, elle bloque la synthèse de l'ADN en

remplaçant la cytosine dans les brins néoformés (Fernandez, H.F. *et al.*, 2009 ; Lichtman, 2013). Le traitement s'effectue selon le procédé dit « 7+3 », c'est-à-dire que le patient est perfusé pendant 7 jours de 100 à 200 mg/m²/jour de cytarabine ou d'agent alternatif tels que la fluradabine, la cladribine ou encore la clofarabine. S'en suivent 3 jours de perfusion de 36 à 45 mg/m² d'anthracyclines telles que la daunorubicine, la mitoxantrone ou encore l'idarubicine. (Döhner *et al.*, 2022).

ii. La chimiothérapie de consolidation

En règle générale, la chimiothérapie d'induction ne suffit malheureusement pas à éliminer l'ensemble des blastes leucémiques car certains peuvent résister aux thérapies et induire la rechute. C'est pourquoi une chimiothérapie de consolidation est nécessaire et consiste en l'administration d'une dose intermédiaire régulière des traitements précédents afin d'éliminer les cellules leucémiques qui pourraient persister (Döhner *et al.*, 2022).

iii. La chimiothérapie d'intensification

Lorsque le tableau clinique met en évidence une leucémie à risque intermédiaire ou défavorable, ou bien lorsque la thérapie réalisée n'aboutit pas à des résultats satisfaisants, une chimiothérapie d'intensification peut être proposée (Burnett *et al.*, 2013).

Le choix de la stratégie thérapeutique envisagée dépend de l'âge du patient. S'il est âgé ou si la chimiothérapie de consolidation est trop difficile à supporter pour

lui, la thérapie proposée peut consister en une combinaison de venetoclax et d'azacytidine. Le premier inhibe Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*), une protéine anti-apoptotique, tandis que la seconde inactive les ADN méthyltransférases via son action sur DNMT1 (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*). Ensemble, ces molécules freinent la progression de la maladie (Pollyea *et al.*, 2022).

Pour les patients plus jeunes, des greffes de CSH peuvent être proposées. Si ces cellules proviennent d'un donneur sain, on dit qu'elles sont allogéniques. Elles sont autologues si elles proviennent du patient malade et ont été isolées après la chimiothérapie de consolidation. Aussi, des lymphocytes de donneurs peuvent être utilisés afin de raviver la réponse immunitaire chez le patient. (Cornelissen et Blaise, 2015). Cependant, la greffe de CSH demeure une stratégie thérapeutique peu employée car ses bénéfices sont souvent moindres face au risque de toxicité suite aux thérapies précédentes, au risque de rejet, ainsi qu'aux comorbidités développées chez le patient (Döhner *et al.*, 2022).

b. Les thérapies ciblées

i. Les thérapies moléculaires

Ces thérapies inhibent des protéines spécifiques intra- ou extracellulaires, en général impliquées dans les mécanismes de prolifération cellulaire. Elles permettent alors d'agir sur certaines mutations génétiques, dont les principales sont *FLT3*, *IDH1/IDH2* ou encore *Bcl-2*.

Ainsi, le gène *FLT3* peut être ciblé par la midostaurine. Cet anticancéreux est prescrit en complément de la chimiothérapie de consolidation, lors de pronostic défavorable, en cas de maladie réfractaire ou encore de rechute chez les patients atteints de la mutation *FLT3* (Döhner *et al.*, 2022). Pour cibler cette mutation, la sorafenib et la giltérinib sont également utilisées (Yeh *et al.*, 2022).

Quant aux gènes *IDH1* et *IDH2*, l'enasidébib et l'ivosidenib ont montré leur efficacité concernant la survie des patients (Stein *et al.*, 2021 ; DiNardo *et al.*, 2018).

Enfin, le venetoclax est le principal inhibiteur de Bcl-2 ; il permet aux patients les plus âgés ou fragiles de mieux résister aux fortes doses de cytarabine et anthracyclines (Silva *et al.*, 2022).

ii. Les immunothérapies et thérapies cellulaires

Les immunothérapies agissent sur le système immunitaire, en vue d'éliminer les cellules leucémiques. Ainsi, certains anticorps monoclonaux sont utilisés. C'est le cas du gemtuzumab qui, couplé à l'ozogamicine, cible l'antigène CD33 et est employé en chimiothérapie d'induction et de consolidation sur des patients leucémiques CD33+ (Lambert *et al.*, 2014). L'utilisation des anticorps est prometteuse, et le couplage de certains d'entre eux peut augmenter l'efficacité thérapeutique. En effet, les anticorps anti-CD123 couplés à des anti-CD33 induisent une destruction des blastes CD33⁺ ou CD123⁺ ; on parle de médiation cellulaire spécifique.

L'immunothérapie permet également de cibler les points de contrôle immunitaires, les *immune checkpoints* (ICP). En effet, ces interactions ligand-récepteur sont utilisées par les cellules cancéreuses pour échapper au système immunitaire. Dans ce contexte, les deux principaux ICP au cœur des thérapies ciblées concernant les LAM sont CTLA-4 (CD152, *Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4*) et l'axe PD-1/PD-L1 (*Programmed Death-1* et *Programmed Death-Ligand 1*). CTLA-4 inhibe la fonction effectrice des lymphocytes T de par sa fonction d'agoniste compétitif de l'interaction CD28/B7. L'anticorps ipilimumab cible CTLA-4 et participe aux essais cliniques dans le traitement de la LAM. Quant à PD-1, ce marqueur est exprimé majoritairement par les lymphocytes T CD8⁺. PD-L1 est surexprimé par de nombreuses cellules tumorales, principalement sous l'induction de l'IFN γ (interféron gamma) et de l'IL-4 (interleukine 4) produits par les cellules T activées : l'axe PD-1/PD-L1 joue donc activement dans l'échappement à la réponse immunitaire et la progression tumorale. Pour bloquer cet axe, différents anticorps sont aujourd'hui engagés dans des essais afin de déterminer leur efficacité : il s'agit du pidilizumab, du pembrolizumab et du nivolumab. En bloquant ces ICP, l'objectif est donc de maintenir l'activité des lymphocytes T en vue d'éliminer les cellules leucémiques.

Cependant, dans le contexte de la LAM, aucun inhibiteur d'ICP n'a encore reçu l'approbation de la FDA. En effet, de nombreux patients atteints de LAM présentent une population de blastes bien définie, caractérisée par 1 à 2 mutations pilotes et/ou des altérations cytogénétiques, et ils peuvent développer des sous-clones qui n'apparaissent qu'au cours de la progression de la maladie ou lors d'une rechute. Les inhibiteurs d'ICP sont généralement plus efficaces dans les cancers présentant une

forte charge mutationnelle, tels que le mélanome ou le cancer du poumon, ce qui n'est pas le cas pour la LAM (Gurska et Gritsman, 2023).

L'émergence de la thérapie par cellules T à récepteur d'antigène chimérique (*chimeric antigen receptor-T*), dite CAR-T, a révolutionné les réponses cliniques des patients. Cela consiste au prélèvement et à la modification des propres lymphocytes T du patient, pour qu'ils expriment un anticorps chimérique antigène-dépendant appelé CAR. Ces derniers peuvent alors reconnaître et éliminer les cellules exprimant un antigène spécifique, ce qui leur confère une importante réponse antitumorale. (Silva *et al.*, 2022). La thérapie par cellules CAR-T dans la LAM en est encore à ses débuts, avec plus de vingt essais cliniques en cours ciblant divers antigènes, tels que CD33, CD123 et CLL-1 (Fiorenza et Turtle, 2021). Les antigènes CD33 et CD123, bien que largement exprimés sur les blastes leucémiques, sont également présents sur les CSH, ce qui complique leur ciblage et entraîne des toxicités indésirables (Ehninger *et al.*, 2014). En revanche, CLL-1 se révèle prometteur, car il est fortement exprimé dans la LAM tout en étant rare sur les CSH saines (Ma *et al.*, 2019). Les cellules CAR-T ciblant CLL-1 ont montré une efficacité antitumorale sans affecter les CSH (Wang *et al.*, 2018). L'approche à double ciblage, combinant CD33 et CLL-1, a également montré des résultats prometteurs (Liu *et al.*, 2018). Un des principaux défis de la thérapie CAR-T dans la LAM est l'absence d'antigènes cibles spécifiques. En effet, les cellules leucémiques expriment des antigènes myéloïdes tels que CD33 et CD123, qui se trouvent également sur les CSH normales, rendant difficile le ciblage exclusif des cellules tumorales (Cummins et Gill, 2019). Des stratégies innovantes, telles que les cellules CAR-T à double ciblage, pourraient offrir une solution pour minimiser les

toxicités en permettant une discrimination plus efficace entre les cellules tumorales et les cellules saines (Perna *et al.*, 2017).

7) Leucémie aiguë myéloïde et MRD

Concernant la leucémie myéloïde aiguë, l'état de rémission est obtenu dans 50 à 80% des cas selon l'âge et le type de LAM des patients. Pourtant, on constate une réapparition de la maladie dans plus de 50% des cas dans un délai de 2 mois à 5 ans (Döhner *et al.*, 2017). Cette situation peut s'expliquer par l'hétérogénéité de la pathologie, rendant difficile la détection et le suivi de la MRD.

En effet, suite à la thérapie, il a été montré chez certains patients que la rechute était due à la réémergence d'un sous-clone leucémique présentant de nouvelles mutations ou ayant développé une instabilité antigénique lui permettant d'échapper au système immunitaire (Ding *et al.*, 2012). Il arrive également que la rechute se produise suite à l'émergence d'une sous-population clonale leucémique qui, bien que minoritaire à l'étape du diagnostic, ait survécu aux thérapies et ait par la suite proliféré grâce à sa chimiorésistance (Bachas *et al.*, 2012). Enfin, même après une rémission, la persistance de sous-clones porteurs des mutations les plus décrites de la LAM, à savoir *DNMT3A*, *IDH1*, *NPM1* ou *NRAS*, peut induire une nouvelle prolifération de cellules leucémiques, et la rechute (Kim *et al.* 2016 ; Young *et al.* 2016).

a. Le rôle des cellules souches leucémiques dans la MRD

Les cellules souches leucémiques (CSL) représentent une sous-population clé dans la pathophysiologie de la leucémie aiguë myéloïde (LAM), jouant un rôle essentiel dans l'émergence de la MRD et les rechutes. Ces cellules, qui peuvent dériver soit de cellules souches hématopoïétiques normales, soit de cellules progénitrices plus différenciées ayant acquis des caractéristiques malignes, ont la capacité de se dé-différencier pour retrouver des propriétés similaires à celles des cellules souches (Lapidot *et al.*, 1994). La hiérarchie cellulaire observée dans la LAM est similaire à celle de l'hématopoïèse normale, avec les CSL occupant une position dominante (Bonnet et Dick, 1997). Bien que leur fréquence soit faible, de l'ordre d'une cellule pour 250 000 à 1 000 000 de cellules leucémiques, leur potentiel d'auto-renouvellement supérieur leur permet de proliférer et de générer de nouvelles cellules leucémiques, maintenant ainsi la maladie (O'Reilly *et al.*, 2021).

Cette persistance des CSL au sein de la population cellulaire tumorale pourrait expliquer les échecs thérapeutiques, car elles sont souvent responsables des rechutes qui surviennent après un traitement initial (Toledo-Guzmán *et al.*, 2018). Par conséquent, une compréhension approfondie des mécanismes régulant ces cellules est cruciale pour développer des stratégies thérapeutiques visant à les éliminer, dans le but d'atteindre une rémission durable chez les patients atteints de LAM (Hope *et al.*, 2004 ; Dick, 2005).

Les CSL représentent une population cellulaire clé dans la MRD et la rechute des patients atteints de LAM. Ces cellules, caractérisées par leur expression des

marqueurs de surface CD34 et CD38, sont essentielles pour comprendre la dynamique de la maladie, car elles sont responsables de la capacité de la LAM à échapper aux traitements (Hope *et al.*, 2004 ; Krause et Van Etten, 2007). La sous-population CD34⁺ CD38⁻ est particulièrement enrichie en CSL, reconnues pour leur capacité d'auto-renouvellement et leur résistance aux traitements chimiothérapeutiques (Boyd et Rodrigues, 2018). De plus, des études ont démontré que la présence de ces cellules au diagnostic est corrélée à une évolution défavorable et à des taux de rechute élevés (Bachas *et al.*, 2012 ; Pollard *et al.*, 2006). Malgré la diversité des marqueurs de surface, rendant leur ciblage thérapeutique complexe, des antigènes comme CD123 émergent comme des cibles prometteuses pour des traitements spécifiques aux CSL, offrant ainsi une voie potentielle pour améliorer les résultats cliniques chez les patients atteints de LAM (van der Lee *et al.*, 2019).

Pour détecter et surveiller la MRD dans les LAM, plusieurs technologies ont été développées, chacune avec ses avantages et ses limites.

b. Détection de la MRD

i. Par cytométrie en flux multiparamétrique

La cytométrie en flux multiparamétrique est une méthode privilégiée pour détecter la MRD chez les patients atteints de LAM, surtout en l'absence de marqueurs moléculaires fiables. En combinant l'analyse des immunophénotypes associés à la leucémie et une approche comparative avec des cellules normales, cette technique permet d'identifier les cellules leucémiques résiduelles avec une sensibilité de 0,1 %

à 0,01 % (1 cellule leucémique parmi 1 000 à 10 000 cellules nucléées). Bien que la sensibilité de la méthode dépende de la qualité des échantillons et de l'expertise technique, l'analyse des marqueurs des cellules souches leucémiques (comme CLL1, CD45RA, CD123 et CD200) peut améliorer cette sensibilité et offrir des informations pronostiques complémentaires (Bradbury *et al.*, 2015 ; Zeijlemaker *et al.*, 2019). Un seuil de MRD $\geq 0,1$ % est souvent utilisé pour déterminer la positivité, bien que des études récentes suggèrent qu'une détection à des niveaux inférieurs pourrait également avoir une valeur pronostique (Rodríguez-Arbolí *et al.*, 2024). Malgré sa rapidité d'exécution et son coût relativement modeste, un des principaux défis de la cytométrie en flux multiparamétrique réside dans la variabilité des résultats entre laboratoires, due aux difficultés de standardisation et à l'expertise requise. De plus, la plupart des études sur la MRD par cytométrie en flux se concentrent sur des échantillons de moelle osseuse, rendant son utilisation sur le sang périphérique moins répandue et moins sensible. Néanmoins, cette méthode reste un outil incontournable pour la surveillance de la MRD dans les LAM, grâce à son adaptabilité à presque tous les cas.

ii. Par RT-qPCR

En parallèle, la détection de la MRD dans les LAM repose souvent sur des techniques moléculaires ciblant des anomalies génétiques spécifiques à la leucémie, telles que les réarrangements chromosomiques et les mutations somatiques. Les transcrits de fusion issus de réarrangements géniques, comme *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* ou encore les réarrangements de *KMT2A*, sont détectés via la RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR). Cette méthode, qui utilise l'ARN plutôt

que l'ADN en raison des points de rupture souvent situés dans des régions introniques, est particulièrement sensible et spécifique pour certains transcrits de fusion, atteignant des taux de détection allant jusqu'à 0,001 %. L'expression élevée du gène muté *NPM1* peut atteindre un taux de détection de 0,0001 %. Bien que la PCR basée sur l'ADN soit une alternative, elle est généralement moins sensible. La qualité de l'échantillon est primordiale pour garantir de bons résultats, notamment en raison de la nécessité d'utiliser une quantité suffisante d'ARN ou d'ADN. Cependant, la PCR présente des limites : elle peut être longue, nécessite un transport rapide des échantillons pour éviter toute dégradation, et demande des contrôles rigoureux pour minimiser les erreurs. De plus, l'analyse des échantillons de moelle osseuse offre une meilleure sensibilité que celle des échantillons de sang périphérique, avec des implications pronostiques distinctes (Short et Dillon, 2024).

iii. Par NGS

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) permet également l'analyse des mutations somatiques présentes dans les LAM, bien que sa sensibilité soit limitée par le taux d'erreurs de fond inhérent aux méthodes de séquençage actuelles. La majorité des techniques reposent sur l'amplification PCR de quelques gènes ciblés, et les erreurs induites par la polymérase lors de cette amplification peuvent affecter la précision des résultats. En général, les panels NGS ciblés atteignent une sensibilité d'environ 1 à 2 % pour les mutations cliniquement pertinentes. Des méthodes ont été développées pour améliorer cette sensibilité, comme l'incorporation d'identifiants moléculaires uniques (UMI) ou le séquençage duplex, qui étiquettent les deux brins d'ADN et permettent de corriger bioinformatiquement les erreurs de PCR ou de

séquençage (Heuser *et al.*, 2021 ; Dillon *et al.*, 2024). Bien que la sensibilité puisse varier en fonction du type de mutation et du contexte génomique, un seuil conservateur de 0,1 % est généralement recommandé. Les mutations de type insertion-délétion (InDel), comme celles de *NPM1* et *FLT3*, peuvent être détectées avec une sensibilité 10 à 100 fois supérieure. Un obstacle à l'utilisation courante du NGS pour la MRD est la persistance de certaines mutations liées à la leucémie, même en rémission complète, ce qui reflète souvent un retour à une hématopoïèse clonale de signification clinique incertaine. Pour mieux interpréter ces résultats, il est conseillé d'exclure les mutations couramment associées à l'hématopoïèse clonale, comme celles des gènes *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1*. Après exclusion, la persistance de la MRD moléculaire détectée par NGS est corrélée à un risque de rechute nettement accru. Les techniques NGS pour la MRD peuvent être appliquées à des échantillons de sang périphérique ou de moelle osseuse, mais aucune comparaison détaillée entre ces types d'échantillons n'a encore été réalisée. De plus, il n'existe pas encore de données robustes comparant l'efficacité de la détection de la MRD *NPM1* par RT-qPCR et par NGS, ce qui pose des difficultés dans la prise de décision clinique, car la majorité des études influençant les décisions de traitement reposent sur la RT-qPCR. La sensibilité inférieure des analyses NGS pourrait, en effet, manquer certains patients à haut risque ou des rechutes précoces de MRD (Short et Dillon, 2024).

En conclusion, la détection de la MRD dans les LAM est un outil crucial pour évaluer le pronostic et ajuster les décisions thérapeutiques, telles que l'indication d'une greffe allogénique de cellules souches ou l'inclusion dans des essais cliniques. Cependant, la définition d'une réponse « MRD négative » varie selon la maladie, le traitement et les méthodes utilisées, ce qui complique l'uniformisation des stratégies

cliniques basées sur la MRD. Les efforts de l'ELN pour standardiser ces tests représentent un progrès, mais leur application dans d'autres contextes cliniques reste complexe. La MRD pourrait également devenir un critère précoce pour évaluer de nouvelles thérapies en LAM, facilitant l'approbation accélérée d'agents prometteurs. Bien que la FDA ait validé l'utilisation de la MRD comme critère de substitution dans d'autres hémopathies malignes, son adoption en LAM reste limitée. Des données supplémentaires sont nécessaires pour prouver que l'amélioration de la MRD se traduit par une meilleure survie, ce qui est essentiel pour son intégration dans les futurs essais cliniques randomisés.

II) Le mélanome cutané

A) Description de la pathologie

Le mélanome est un cancer résultant de transformations malignes de cellules pigmentaires, les mélanocytes, présentes dans la couche basale de l'épiderme. S'il ne représente que 3% des cancers de la peau, le mélanome cutané en est la forme la plus redoutable, étant responsable de plus de 65% des décès causés par ces pathologies. L'incidence et la morbidité du mélanome cutané connaissent une augmentation constante à l'échelle mondiale. Pour autant, la détection précoce d'un mélanome naissant permet un taux de guérison de plus de 90% (Orzan *et al.*, 2015).

L'examen anatomopathologique permet de définir quatre types de mélanomes (Elder *et al.*, 1995) : le mélanome superficiel extensif (SSM, *superficial spreading melanoma*), le mélanome nodulaire (NMM, *nodular malignant melanoma*), le mélanome de Dubreuilh (LMM, *lentigo malignant melanoma*) et le mélanome acrolentigineux (ALM, *acral lentiginous melanoma*).

Dans le système de classification clinique actuel du mélanome cutané établi par l'American Joint Committee on Cancer (Keung et Gershenwald, 2018), ces sous-types ne sont pas considérés comme des facteurs pronostiques. En effet, les cliniciens privilégient plutôt des critères tels que le degré d'invasion (niveau de Clark, figure 12) ou encore l'épaisseur verticale de la tumeur (profondeur de Breslow) (Scatena, Murtas et Tomei, 2021).

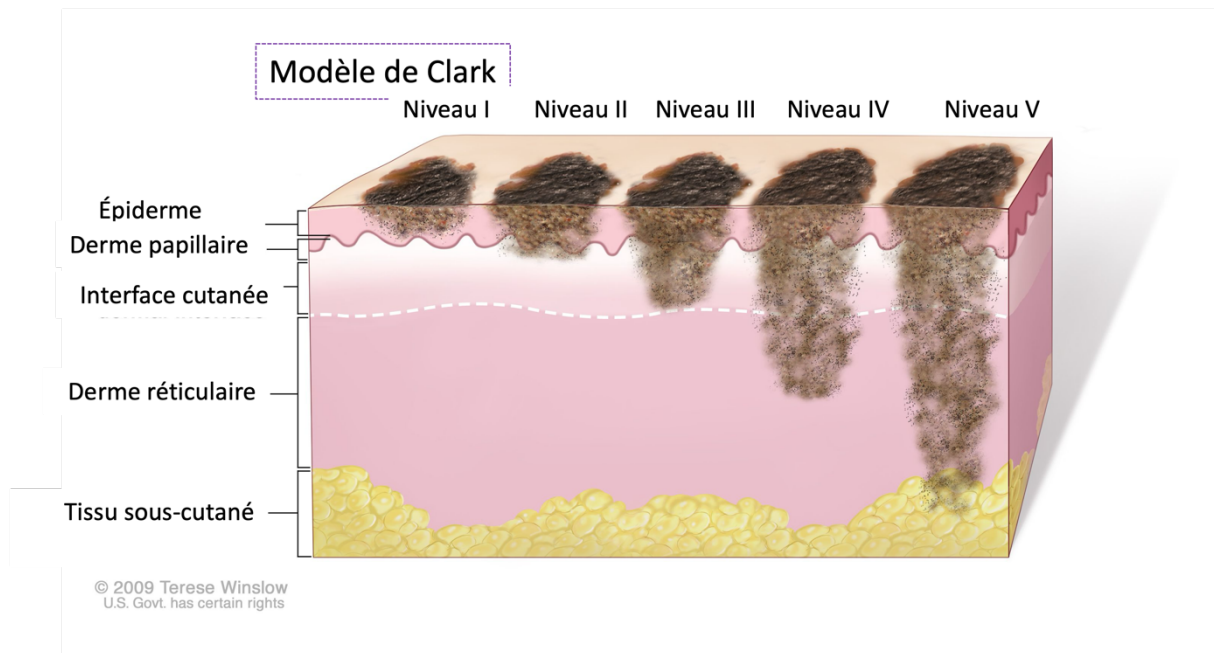


Figure 12 : Modèle de Clark de la progression du mélanome
(Adapté du NCI Dictionary of Cancer Terms)

L'Organisation Mondiale de la Santé propose quant à elle de classifier le mélanome cutané en fonction de son origine, selon une exposition chronique au soleil (on parle de mélanome CSD, *chronically sun-damaged*) ou non (non-CSD, *non-chronically sun-damaged*). Les altérations génomiques sont également incluses dans les critères (Elder *et al.*, 2020 ; Yeh et Bastian, 2021). Les mélanomes CSD, alors caractérisés par une forte charge mutationnelle induite par les UV, se forment principalement sur des zones comme la tête, le cou et les membres dorsaux, et toucheraient principalement les personnes âgées. À l'inverse, les mélanomes non-CSD, présentant moins de mutations liées aux UV, se développent sur des zones moins exposées, telles que le tronc et les membres proximaux, et toucheraient plutôt les personnes de moins de 55 ans. (Shain et Bastian, 2016).

B) Développement de la pathologie

1) *Le mélanome in situ*

Le mélanome *in situ* est caractérisé par une prolifération anormale des mélanocytes, limitée à l'épiderme. Dans le cadre du modèle de progression de Clark (Figure 12), cette étape est désignée comme la "phase de croissance radiale". À ce stade, les cellules échappent à la sénescence et prolifèrent de manière continue, sans pour autant avoir la capacité d'envahir les tissus profonds en traversant la jonction dermo-épidermique (Hall et LeBoit, 2014). Ce type de lésions peut provenir de naevus préexistant, ou apparaître spontanément. Sur le plan génétique, ces lésions sont souvent associées à des mutations stimulant l'activation de la voie des MAPK, ainsi que des mutations du promoteur de TERT (Shain *et al.*, 2015).

À un stade plus avancé, la tumeur peut devenir plus hétérogène, donnant lieu à l'émergence de divers sous-clones cellulaires issus de trajectoires évolutives distinctes. Cette diversification permet la coexistence de sous-populations cellulaires activant différentes voies génétiques (Hodis *et al.*, 2022).

2) *Le stade invasif*

La croissance invasive du mélanome débute lorsque des cellules cancéreuses traversent la membrane basale de l'épiderme pour s'étendre dans le derme, tissu conjonctif sous-jacent. La tumeur prend alors un aspect tridimensionnel caractéristique. La profondeur de cette invasion est essentielle pour

évaluer la gravité de la maladie, ainsi que pour estimer le pronostic des patients et les risques de métastases (Balch *et al.*, 2009). Les mélanomes invasifs sont donc classés selon leur épaisseur en trois catégories : fins (moins de 1 mm), intermédiaires (entre 1 et 4 mm) et épais (plus de 4 mm). Ces derniers pénètrent dans les tissus graisseux sous-cutanés et présentent un risque élevé de propagation, et une forte diminution du taux de survie à 5 ans (50%) (Montagnani *et al.*, 2016 ; Bozsanyi *et al.*, 2022).

En comparaison avec le mélanome *in situ* décrit précédemment, la forme invasive de cette maladie arbore une charge mutationnelle accrue. Plus la tumeur pénètre profondément dans les couches de la peau, plus l'exposition aux rayonnements UV diminue. Cela rend les mutations induites par ces derniers moins fréquentes, laissant place à des réarrangements chromosomiques et des variations dans le nombre de copies (CNV) qui vont se produire plus fréquemment (Bauer et Bastian, 2006 ; Montagnani *et al.*, 2016). Ces altérations, souvent observées dans les mélanomes avancés, peuvent faire suite à des mutations inactivant des gènes essentiels à la régulation du cycle cellulaire. En particulier, les mutations touchant le gène *CDKN2A*, qui code pour la protéine p16, et le gène *RB1*, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, sont notables. Ces changements entraînent un dysfonctionnement du cycle cellulaire et provoquent des anomalies chromosomiques (Pavey *et al.*, 2002). On observe également des mutations dans des gènes liés à la structure de la chromatine, comme ceux du complexe SWI/SNF (dont *ARID1A*, *ARID1B*, *ARID2* et *SMARCA4*) augmentant ainsi l'instabilité génomique (Wang, Haswell et Roberts, 2014). Ce dérèglement du complexe SWI/SNF induit une reconfiguration de la chromatine qui rappelle le comportement des cellules souches, impliquant les complexes de remodelage PRC2 (Wilson *et al.*, 2010 ; Shain *et al.*,

2018) (Figure 13). À un stade avancé, on observe également des mutations dans des voies de signalisation clés, telles que MAPK, amplifiant ainsi l'activation oncogénique (Shain *et al.*, 2018). La ressemblance avec les cellules souches est d'autant plus marquée que les cellules de mélanome invasif diminuent l'expression de marqueurs de différenciation comme MITF, et commencent à produire des facteurs de transcription impliqués dans le développement de la crête neurale, comme SLUG, SOX9 ou encore SNAIL (Pedri *et al.*, 2022).

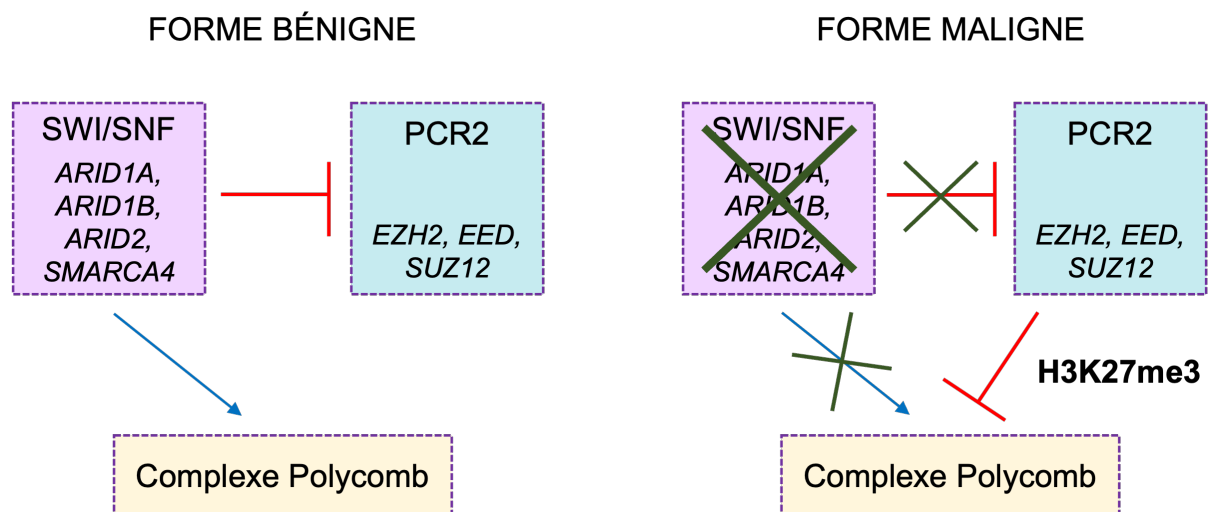


Figure 13 : Schématisation de la balance entre SWI/SNF et PCR durant l'évolution du mélanome.

(Inspiré de Shain *et al.*, 2018)

3) Le stade métastatique

Le stade métastatique est atteint lorsque les cellules cancéreuses quittent le site tumoral et s'évadent par les systèmes circulatoire et lymphatique, afin de se répandre dans d'autres tissus pour former des tumeurs secondaires. Cette phase de progression de la pathologie est la plus mortelle et est décrite pour présenter un taux

mutationnel très élevé, un grand nombre d'altérations génomiques (Paluncic *et al.*, 2016 ; Thompson, Mozzillo et Ross, 2020). Le mélanome métastatique présente alors une hétérogénéité génétique et épigénétique (Vergara *et al.*, 2021).

Le mode de dissémination tumorale est discuté, sachant que des cellules de mélanome circulant dans le sang ont été retrouvées chez des patients qui n'avaient pas de métastase ganglionnaire (Keller et Pantel, 2019). Cela suggère qu'il pourrait y avoir une dissémination parallèle entre les ganglions lymphatiques et le système sanguin (Werner-Klein *et al.*, 2018) (Figure 14).

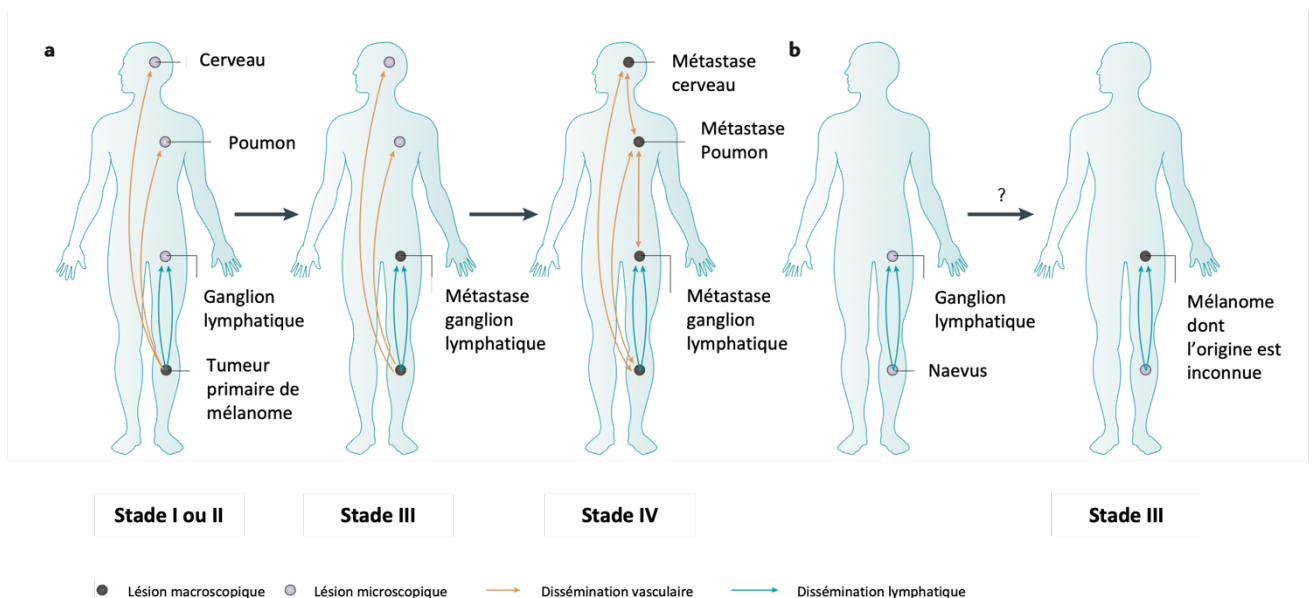


Figure 14 : Évolution métastatique du mélanome.

(a) Les cellules de la tumeur primaire de mélanome se disséminent en parallèle vers des sites locaux et distants à travers le corps. Des cellules tumorales circulantes peuvent former de nouvelles métastases dans différentes tumeurs existantes ainsi que dans la tumeur primaire. (b) Une petite proportion de métastases se trouve sans tumeur primaire déterminée. L'histoire évolutive de ces mélanomes d'origine inconnue reste mal comprise, mais il est possible que certains d'entre eux représentent des mélanomes primaires issus de cellules qui se sont disséminées à partir de précurseurs bénins tels que des nævi, et qui auraient alors acquis leurs altérations oncogéniques secondaires et tertiaires après avoir colonisé d'autres sites. (Adapté de Shain et Bastian, 2016)

C) Facteurs de risque

1) *Facteurs endogènes*

a. Épidémiologie

Si l'incidence du mélanome augmente avec l'âge des patients, elle reste similaire entre les hommes et les femmes. Cependant, la survenue de ce cancer est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes après 40 ans. Chez les jeunes âgés de 15 à 24 ans, le mélanome est le quatrième cancer le plus courant (Ferlay *et al.*, 2015 ; Desandes *et al.*, 2013 ; Watson *et al.*, 2016).

Le phototype des individus, défini par la couleur de peau, est un fort indicateur de risque de développement de la pathologie. L'échelle de Fitzpatrick, établie dans les années 1970, classe les phototypes selon leur réactivité à l'exposition solaire. Ainsi, plus la peau est claire, et plus le risque de développer un mélanome est élevé. Cet aspect est corrélé à l'augmentation de l'activité de la voie des phéomélanines chez les individus à peau claire. En effet, cela entraîne un stress oxydatif accru, augmentant le risque d'endommager l'ADN et favorisant la survenue de mutations. (Fitzpatrick, 1998 ; Mitra *et al.*, 2012).

Enfin, dans près de 25% des mélanomes, on note la préexistence d'au moins un naevi (Bevona *et al.*, 2003). De plus, la taille (>7mm) et le nombre de naevi (>100) favorisent grandement le risque de développement d'un mélanome (Gandini *et al.*, 2005).

b. Mutations génétiques

Le mélanome est associé à de multiples mutations génétiques qui favorisent son développement.

La mutation du promoteur du gène de la télomérase *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*) est retrouvée dans près de 80% des mélanomes *in situ* (Shain *et al.*, 2018). Elle permet aux mélanocytes d'échapper à la sénescence et à l'arrêt de croissance dépendant des télomères, ce qui favorise le développement du mélanome (Bennett, 2016).

Les mutations activatrices du proto-oncogène B-raf (*BRAF*), telles que la substitution de la valine en acide glutamique au niveau du codon 600 (V600E) sont présentes dans plus de la moitié des cas de mélanomes cutanés (Davies *et al.*, 2002). De même, les mutations du gène *NRAS* (*neuroblastoma proto-oncogene*) sont détectées dans 15 à 20% des mélanomes (Hawryluk and Tsao, 2014). On note également la survenue des mutations perte de fonction du gène de la neurofibromine (*NF1*) dans 10 à 15% des mélanomes cutanés (Nissan *et al.*, 2014). Ces trois types de mutations ont pour conséquence commune l'activation constitutive des voies de signalisation des MAPK, à l'origine de l'augmentation drastique de la prolifération cellulaire.

Les mélanomes héréditaires concernent 10% des cas de mélanome (Thompson *et al.*, 2009). Dans 20 à 40% des cas, il s'agit de mutations germinales dans le gène *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) codant pour la protéine p16INK4A (Nelson et Tsao, 2009). L'initiation tumorale peut également survenir suite à une mutation du gène de *CDK4* induisant son activation constitutive (Zuo *et al.*, 1996).

2) Facteurs exogènes

a. Rayonnements ultraviolets

L'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV) représente le principal facteur exogène au développement du mélanome. En effet, une exposition intense peut provoquer des brûlures cutanées, et induire des mutations génétiques, notamment lorsqu'elle est chronique (Dennis *et al.*, 2008).

b. Obésité

L'obésité résulte de l'accumulation de tissu adipeux et se caractérise par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30. Si elle augmente le risque de survenue du mélanome, l'obésité est également reconnue comme marqueur de mauvais pronostic. En effet, les cellules adipeuses ont la capacité de communiquer avec les cellules tumorales de mélanome via des vésicules extracellulaires. Ces vésicules transmettent des acides gras et des enzymes aux cellules tumorales, ce qui favorise leur migration et la survenue de métastases. Dans un contexte d'obésité, la disponibilité accrue d'acides gras amplifie l'action de ces vésicules et donc l'agressivité du mélanome. (Clement *et al.*, 2020).

D) Classification : du niveau de Clark à la classification de l'OMS

En 1969, les travaux de Clark et son équipe ont permis de définir les stades de progression du mélanome en fonction du nombre de couches de la peau qui ont été envahies (Clark *et al.*, 1969). Cette classification a été complétée par les travaux de McGovern et Breslow ainsi que leurs équipes (Breslow *et al.*, 1970), en prenant en compte l'épaisseur maximale de la tumeur inversement corrélée à la survie des patients. Le développement progressif des connaissances cliniques et moléculaires a permis l'évolution de la classification, jusqu'à l'édition de la classification multidimensionnelle proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé qui souligne ainsi la progression tumorale corrélée à l'apparition d'anomalies génétiques (Ferrara et Argenziano, 2021) (Tableau 2).

Pathway	Low UV Radiation Exposure/CSD			High UV Radiation Exposure/CSD		
	I			II		III
Endpoint of pathway	Low-CSD melanoma/SSM			High-CSD melanoma/LMM		Desmoplastic melanoma
Benign neoplasms (nevi)	Nevus			? IMP		? IMP
Intermediate/low-grade dysplasias and melanocytomas	Low-grade dysplasia	BIN	DPN	? IAMP/dysplasia		? IAMP/dysplasia
Intermediate/high-grade dysplasias and melanocytomas	High-grade dysplasia/MIS	<i>BAP1</i> -inactivated melanocytoma/MELTUMP	Deep penetrating melanocytoma/MELTUMP	PEM/MELTUMP	Lentigo maligna (MIS)	MIS
Malignant neoplasms	Low-CSD melanoma/SSM (VGP)	Melanoma in BIN (rare)	Melanoma in DPN (rare)	Melanoma in PEM (rare)	LMM (VGP)	Desmoplastic melanoma
Common mutations	<i>BRAF</i> p.V600E^b or <i>NRAS</i> ^b <i>TERT</i> ^d ; <i>CDKN2A</i> ^a ; <i>TP53</i> ^c ; <i>PTEN</i> ^a	<i>BRAF</i>^b or <i>NRAS</i>^b + <i>BAP1</i>^a	<i>BRAF</i>^b; <i>MAP2K1</i>^b or <i>NRAS</i>^b + <i>CTNNB1</i>^b or <i>APC</i>^c	<i>BRAF</i>^b + <i>PRKAR1A</i>^a or <i>PRKCA</i>^a	<i>NRAS</i>^b; <i>BRAF</i> (non-p.V600E)^b; <i>KIT</i>^b; or <i>NF1</i>^a <i>TERT</i> ^d ; <i>CDKN2A</i> ^a ; <i>TP53</i> ^c ; <i>PTEN</i> ^a ; <i>RAC1</i> ^b	<i>NF1</i>^a; <i>ERBB2</i>^a; <i>MAP2K1</i>^b; <i>MAP3K1</i>^b; <i>BRAF</i>^b; <i>EGFR</i>^b; <i>MET</i>^b <i>TERT</i> ^d ; <i>NFKB1</i> ^b ; <i>NRAS</i> ^b ; <i>PIK3CA</i> ^a ; <i>PTPN11</i> ^b

Abbreviations: BIN, *BAP1*-inactivated nevus; CSD, cumulative solar damage; DPN, deep penetrating nevus; IAMP, intraepidermal atypical melanocytic proliferation of uncertain significance; LMM, lentigo maligna melanoma; low/high-CSD melanoma, melanoma in skin with a low/high degree of cumulative sun/solar damage; MELTUMP, melanocytic tumor of uncertain malignant potential; MIS, melanoma in situ; PEM, pigmented epithelioid melanocytoma; SSM, superficial spreading melanoma; UV, ultraviolet; VGP, vertical growth phase (tumorigenic and/or mitogenic melanoma).

Reprinted from Bastian et al.³⁷ with permission. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R, eds. 2018. *WHO Classification of Skin Tumours*. 4th ed. Lyon, France: IARC; 2018. Common mutations in each pathway are listed; mutations already identified in benign or borderline lesions are shown in bold.

^a For example, *CDKN2A*, loss-of-function mutation.

^b For example, *BRAF*, gain-of-function mutation.

^c For example, *PRKCA*, rearrangement.

^d For example, *TERT*, promoter mutation.

^e For example, *ERBB2*, amplification.

Pathway	Low to No (or Variable/Incidental) UV Radiation Exposure/CSD				
	IV	V	VI	VII	VIII
Endpoint of pathway	Malignant Spitz tumor/ Spitz melanoma	Acral melanoma	Mucosal melanoma	Melanoma in CN	Melanoma in BN
Benign neoplasms (nevi)	Spitz nevus	? Acral nevus	? Melanosis	CN	BN
Intermediate/low-grade dysplasias/ melanocytomas	Atypical Spitz tumor (melanocytoma)	IAMPUS/dysplasia	Atypical melanosis/dysplasia/ IAMPUS	Nodule in CN (melanocytoma)	(Atypical) cellular BN (melanocytoma)
Intermediate/high-grade dysplasias	STUMP/MELTUMP	Acral MIS	Mucosal MIS	MIS in CN	Atypical CBN
Malignant neoplasms	Malignant Spitz tumor/ Spitz melanoma (tumorigenic)	Acral melanoma (VGP)	Mucosal lentiginous melanoma (VGP)	Melanoma in CN (tumorigenic)	Melanoma in blue nevus (tumorigenic)
Mutations	<i>HRAS</i>^b; <i>ALK</i>^c; <i>ROSI</i>^c; <i>RET</i>^c; <i>NTRK1</i>^c; <i>NTRK3</i>^c; <i>BRAF</i>^b; or <i>MET</i>^e <i>CDKN2A</i> ^a	<i>KIT</i>^b; <i>NRAS</i>^b; <i>BRAF</i>^b; <i>HRAS</i>^b; <i>KRAS</i>^b; <i>NTRK3</i>^c; <i>ALK</i>^c; or <i>NF1</i>^a <i>CDKN2A</i> ^a ; <i>TERT</i> ^d ; <i>CCND1</i> ^d ; <i>GAB2</i> ^d	<i>KIT</i>^b; <i>NRAS</i>^b; <i>KRAS</i>^b; or <i>BRAF</i>^b <i>NF1</i> ^a ; <i>CDKN2A</i> ^a ; <i>SF3B1</i> ^d ; <i>CCND1</i> ^d ; <i>CDK4</i> ^d ; <i>MDM2</i> ^d	<i>NRAS</i>^b; <i>BRAF</i> p.V600E^b (small lesions); or <i>BRAF</i> ^c	<i>GNAQ</i>^b; <i>GNAI1</i>^b; or <i>CYSLTR2</i>^b <i>BAP1</i> ^a ; <i>EIF1AX</i> ^c ; <i>SF3B1</i> ^d

Abbreviations: BN, blue nevus; CBN, cellular blue nevus; CN, congenital nevus; CSD, cumulative solar damage; IAMPUS, intraepidermal atypical melanocytic proliferation of uncertain significance; MELTUMP, melanocytic tumor of uncertain malignant potential; MIS, melanoma in situ; STUMP, spitzoid tumor of uncertain malignant potential; UV, ultraviolet; VGP, vertical growth phase (tumorigenic and/or mitogenic melanoma).

Reprinted from Bastian et al.³⁷ with permission. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R, eds. 2018. *WHO Classification of Skin Tumours*. 4th ed. Lyon, France: IARC; 2018.

Common mutations in each pathway are listed; mutations already identified in benign or borderline low lesions are shown in bold.

^a For example, *CDKN2A*, loss-of-function mutation.

^b For example, *BRAF*, gain-of-function mutation.

^c For example, *SF3B1*, change-of-function mutation.

^d For example, *CCND1*, amplification.

^e For example, *ALK*, rearrangement.

^f For example, *TERT*, promoter mutation.

Tableau 2 : Classification de l'OMS 2018 des mélanomes, d'après The 2018 WHO Classification of Melanoma—Elder *et al.*

E) Diagnostic du mélanome cutané

Le diagnostic du mélanome cutané est initié par un examen clinique des lésions cutanées ou naevi. L'analyse suit le protocole ABCDE (Friedman *et al.*, 1985) et observe alors les critères d'asymétrie (A), de bords irréguliers (B), de couleur hétérogène (C), d'augmentation de diamètre (D) et d'évolution (E). Les technologies modernes emploient également l'intelligence artificielle (Barata *et al.*, 2023) (Figure 15). L'examen anatomopathologique réalisé par exérèse complète de la lésion permet à son tour de confirmer la nature mélanocytaire de la tumeur, d'évaluer l'éventuelle présence de mutations et de caractériser l'agressivité tumorale grâce à la classification TNM couplée à la huitième édition de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC).

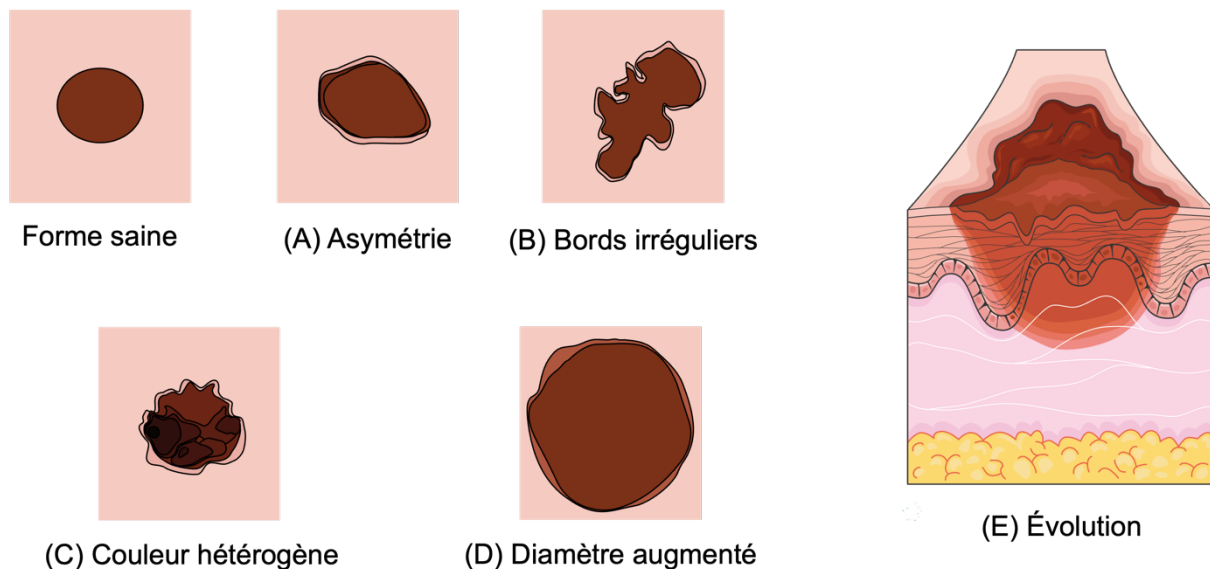


Figure 15 : Schématisation du protocole ABCDE.

F) Thérapies

Plus la tumeur est détectée tôt, plus le pronostic sera favorable. Le stade pathologique va influencer le choix thérapeutique, ainsi que les antécédents médicaux et l'âge du patient.

1) *Stades précoces*

Lorsque le mélanome cutané est localisé, donc non métastatique, la seule exérèse chirurgicale peut être proposée au patient. Selon l'épaisseur de la lésion cutanée, il est possible qu'une seconde exérèse soit réalisée en faveur d'une ablation plus importante autour de la lésion initiale, si toutefois la zone est accessible. Dans le cas contraire, le risque de récurrence est accru (Ross and Gershenwald, 2011).

2) *Stades métastatiques*

La survenue de métastases est fréquente en cas de mélanome cutané, de par son agressivité. Il est alors nécessaire de compléter la stratégie thérapeutique.

a. Chimiothérapie

La chimiothérapie à base de dacarbazine (DTIC), témozolomide, cisplatine ou encore vinblastine a été proposée comme traitement du mélanome cutané, faute d'autre stratégie thérapeutique performante. Pour autant, en raison de sa faible

efficacité, elle n'est aujourd'hui proposée qu'en cas de non réponse aux autres traitements (Michielin, O. *et al.*, 2019).

b. Thérapies ciblées

Les avancées technologiques modernes facilitent l'identification de mutations spécifiques, ce qui permet d'affiner la stratégie thérapeutique en ciblant les profils mutationnels. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de BRAF – comme le vemurafenib et le dabrafenib – a révélé une efficacité notable chez les patients atteints de mélanome portant des mutations BRAFV600E (Chapman *et al.*, 2011 ; Hauschild *et al.*, 2012). Pour ces mêmes patients, l'utilisation combinée d'inhibiteurs de BRAF et de MEK (*mitogen-activated protein kinase*) – comme le cobimétinib – est aujourd'hui préconisée pour ses résultats prometteurs tout en réduisant le risque d'effets secondaires (Larkin *et al.*, 2014). Cependant, ces thérapies ne suffisent plus quand le patient développe une résistance au traitement.

c. Inhibiteurs de points de contrôle immunitaire et stratégies combinatoires

Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICP, *immune check-point*) ont profondément fait évoluer l'immunothérapie du cancer, en particulier dans le mélanome métastatique, en améliorant significativement les taux de survie des patients (Younis *et al.*, 2024). Ces traitements ciblent des ICP tels que CTLA-4 et PD-1, qui sont essentiels à l'activation des cellules T et pour maintenir la tolérance immunologique (Buchbinder *et al.*, 2016). Malgré leurs succès notables, les ICP

posent des défis considérables, tels que la résistance au traitement, des événements indésirables liés à l'immunité, ainsi qu'un manque de données sécurisantes pour les patients pédiatriques (Choi *et al.*, 2020). Les inhibiteurs de CTLA-4, particulièrement à des doses élevées, sont souvent associés à des événements indésirables plus graves, tandis que les inhibiteurs de PD-1/PD-L1 ont tendance à entraîner des toxicités plus légères, avec la fatigue étant l'effet secondaire le plus rapporté (Spiers *et al.*, 2019).

Les recherches actuelles explorent de nouvelles combinaisons d'ICP avec d'autres thérapies, telles que la chimiothérapie, la radiothérapie, les agents ciblés, et les traitements basés sur les cellules T. L'objectif est d'améliorer les résultats chez les patients qui ne répondent pas bien à la monothérapie par ICP (Qiu *et al.*, 2024). Le microenvironnement tumoral est par ailleurs décrit comme un acteur crucial dans la réponse au traitement, ce qui complexifie un peu plus l'optimisation des thérapies. Cela ouvre le champ des possibles et pose de nouvelles problématiques de recherche. Ainsi, la combinaison de la radiothérapie et de l'immunothérapie pourrait renforcer leur efficacité par des mécanismes synergiques, offrant de l'espoir face aux cancers résistants aux traitements conventionnels (Dagar *et al.*, 2024). La thérapie photodynamique, qui perturbe la vasculature tumorale tout en stimulant le système immunitaire, est également prometteuse, bien qu'elle nécessite des photosensibilisateurs soigneusement élaborés pour fonctionner efficacement dans le microenvironnement tumoral, notamment sous des conditions hypoxiques (Warszynska *et al.*, 2023).

Le microbiote intestinal émerge alors comme un biomarqueur essentiel influençant la réponse thérapeutique aux ICP dans les cancers solides. Des études

récentes montrent que le microbiote peut renforcer les réponses immunitaires contre les tumeurs en activant les cellules T et en augmentant la production de cytokines comme l'IFN- γ et l'IL-2, ce qui améliore l'efficacité des ICP. Cependant, un déséquilibre du microbiote intestinal, appelé dysbiose, peut entraîner des résultats thérapeutiques moins favorables. Certaines espèces bactériennes, telles que les *Bifidobacterium* ou encore les *Akkermansia muciniphila*, sont associées à des réponses plus favorables aux ICP, tandis que d'autres entraînent davantage d'effets négatifs. La composition du microbiote intestinal peut alors prédire le pronostic des patients dès les premières étapes du traitement. En modulant le microbiote, les probiotiques ont montré un potentiel d'optimisation de l'efficacité des ICP. Cela souligne l'importance du microbiote dans l'immunothérapie du cancer (Profir *et al.*, 2024).

G) Mélanome et MRD

1) *Acquisition d'un état dormant*

Comme évoqué précédemment, les changements épigénétiques, tels que le passage à un phénotype de type EMT (transition épithélio-mésenchymateuse), entraînent la formation de cellules plus invasives ressemblant à des cellules souches et dédifférenciées. Ces cellules présentent une expression modifiée des métalloprotéinases matricielles (MMP) et des molécules d'adhésion cellulaire, ce qui est essentiel pour le processus métastatique (Huang *et al.*, 2021).

Deux théories émergent concernant le rôle des cellules de mélanome dans le processus d'intravasation et de formation de métastases.

La première théorie suggère que les cellules de mélanome différenciées peuvent rejoindre passivement la circulation, tandis que les cellules dédifférenciées font l'objet d'une intravasation active. Une fois dans le sang, ces deux types de cellules peuvent alors collaborer pour migrer vers des environnements propices à l'établissement de tumeurs secondaires. Les cellules différenciées bénéficient alors des cellules dédifférenciées (Bockhorn, Jain et Munn, 2007 ; Tsuji, Ibaragi et Hu, 2009). Des clusters hétérotypiques de ces deux états cellulaires ont été identifiés et semblent proliférer rapidement dans des niches favorables (Campbell *et al.*, 2021).

La deuxième théorie propose que les cellules dédifférenciées aient la capacité de revenir à un état différencié par un commutateur phénotypique de type mésenchymateux à épithélial (MET), ce qui favoriserait la formation de croissances secondaires (Yao, Dai et Peng, 2011 ; Brabletz *et al.*, 2018). Ce modèle suggère que les métastases pourraient davantage provenir d'une cellule unique que d'un cluster cellulaire (Vandyck *et al.*, 2021).

Il est probable que ces deux théories soient interconnectées (Rowling *et al.*, 2020).

Parmi les cellules de mélanome dédifférenciées, un sous-ensemble présente des caractéristiques assimilables aux cellules souches de la crête neurale, notamment leur capacité à demeurer inactives pendant de longues périodes (Rambow, Marine et Goding, 2019). Parmi ces cellules, certaines sont même capable de retourner à un état quiescent, ce qui leur permettrait de perdurer dans l'organisme en restant dormantes

dans la niche intravasculaire, et pourrait alors expliquer les cas métastatiques lents, voire même les rechutes de la pathologie (Li *et al.*, 2020).

Cet état de dormance peut être acquis via divers mécanismes. D'une part, ces cellules peuvent exprimer des gènes suppresseurs de tumeurs, à l'origine d'une dormance cellulaire (Sosa, Bragado et Aguirre-Ghiso, 2014 ; Triana-Martínez, Loza et Domínguez, 2020). D'autre part, la dormance peut être consécutive à une réaction immunitaire, par induction de cytotase par exemple (Senft et Ronai, 2016).

Les cellules endothéliales de mélanome peuvent également former des réseaux pseudo-vasculaires afin d'améliorer l'afflux sanguin vers les tumeurs, et faciliter la dissémination des cellules cancéreuses : on parle de mimétisme vasculogénique. Ce phénomène favorise la mise en place d'une niche vasculaire dormante (Fernández-Cortés, Delgado-Bellido et Oliver, 2019).

L'état de dormance de ces cellules de mélanome est réversible ; elles peuvent alors rejoindre des niches métastatiques en se différenciant vers un profil mésenchymateux (Giancotti, 2013).

2) Détection de la MRD dans le mélanome

Si le suivi de la MRD est bien établi dans les cancers hématologiques, il reste à développer pour les tumeurs solides telles que le mélanome.

Les biopsies répétées pour évaluer la MRD dans ces cas ne sont pas pratiques en raison de leur caractère invasif, de l'hétérogénéité intra-tumorale et des difficultés liées aux métastases distantes. En revanche, le suivi de la MRD basé sur le sang offre des perspectives prometteuses. En effet, les biomarqueurs tumoraux, tels que les cellules tumorales circulantes (CTC) et les acides nucléiques libres dans le sang (comme l'ADN libre circulant et les microARN), pourraient permettre de surveiller à la fois les cancers à un stade précoce et avancé. Le suivi de la MRD par des méthodes sanguines peut contribuer à évaluer l'efficacité thérapeutique et à détecter précocement les rechutes, offrant ainsi aux cliniciens des informations sur l'hétérogénéité intratumorale et l'évolution tumorale. Cela devient d'autant plus crucial avec l'approbation récente de plusieurs thérapies ciblées et d'immunothérapies pour le mélanome, qui impliquent souvent des traitements combinés.

Actuellement, le système de classification du stade du American Joint Committee on Cancer (AJCC), qui utilise la biopsie du ganglion sentinelle pour évaluer les métastases, montre des limites en raison de la variabilité pronostique et des taux de récurrence élevés chez les patients ayant déjà métastasé (Morton *et al.*, 2014). De plus, bien qu'il n'existe pas de biomarqueurs sanguins spécifiques pour le mélanome à un stade précoce, la lactate déshydrogénase (LDH) sérique est actuellement le seul biomarqueur approuvé pour le pronostic des mélanomes de stade IV. En intégrant le suivi de la MRD dans la pratique clinique, il serait possible d'améliorer significativement les résultats des patients en facilitant la détection précoce des récurrences et en permettant une gestion proactive de la maladie (Lin *et al.*, 2024).

La biopsie du ganglion sentinelle (SLN) est essentielle pour la stadification du mélanome cutané et permet d'évaluer le degré de métastase. Bien qu'elle soit la norme pour prédire la récurrence et la survie des patients, cette procédure invasive ne prend pas en compte les cellules tumorales isolées (ITC) ou les petits groupes de cellules (<2 mm), bien que leur détection ait été associée à un pronostic défavorable. Les ITC, souvent dormantes, peuvent se réactiver des années après, contribuant à la dissémination du mélanome et aux métastases, même en l'absence de cellules tumorales détectables lors du diagnostic. Environ 13 % des patients ayant une biopsie SLN négative développent des métastases à distance, soulignant l'importance d'un suivi rigoureux pour surveiller ces cellules résiduelles. Une détection plus sensible de la MRD pourrait donc améliorer la gestion des patients et prévenir le développement d'un mélanome métastatique (Faries *et al.*, 2017).

a. Cellules Tumorales Circulantes (CTC)

L'analyse moléculaire du sang permet d'étudier et d'identifier la MRD de manière peu invasive. La détection de biomarqueurs exploitables cliniquement et l'étude de la latence du mélanome durant le suivi sans maladie permettraient des interventions précoces pour un traitement curatif. Les biomarqueurs sanguins les plus étudiés dans le mélanome impliquent les CTC et les acides nucléiques libres dans le sang (cfNA). Les CTC, représentant le génome intact de la tumeur, sont souvent responsables de la récurrence métastatique. Leur détection peut révéler la MRD dans le sang des patients atteints de mélanome. Les approches d'analyse des CTC incluent des méthodes indirectes, comme la PCR quantitative (qRT-PCR) de cellules isolées, et des méthodes sans anticorps, telles que l'enrichissement par microfluidique. Ces

dernières ont permis de détecter la MRD chez des patients traités par immunothérapie avec des biomarqueurs mRNA et ADN. Bien que l'énumération des CTC et leur caractérisation phénotypique fournissent des informations pronostiques utiles, leur standardisation et l'hétérogénéité des CTC demeurent des défis majeurs. La surveillance des CTC par profilage moléculaire permettrait une détection précoce de la récurrence et informerait les régimes thérapeutiques (Lin *et al.*, 2024).

b. ADN libre circulant (cfDNA)

L'ADN libre circulant (cfDNA) contenant des biomarqueurs tumoraux est plus facile à isoler du sang que les CTC. Ce cfDNA se compose généralement d'ADN fragmenté (environ 150 pb) dérivant à la fois de cellules normales et tumorales (Lee *et al.*, 2017). Des mutations d'ADN et des modifications épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN, ont été étudiées en mélanome et peuvent compléter la détection des CTC pour identifier la MRD (Mori *et al.*, 2005). La détection de biomarqueurs uniques tels que les mutations BRAF ou NRAS a montré son utilité pour prédire la réponse à l'immunothérapie (Lee *et al.*, 2017). Cependant, tout comme les tests CTC, ceux de cfDNA doivent améliorer leur sensibilité pour détecter les biomarqueurs chez les patients atteints de mélanome à un stade précoce, où l'hétérogénéité tumorale est élevée. L'utilisation de tests multigènes à haute sensibilité et la surveillance fréquente des biomarqueurs cfDNA pourraient permettre une détection précoce des récurrences. Pour que le cfDNA soit un outil utile dans la surveillance de la MRD, il est crucial d'augmenter la sensibilité des tests et d'implémenter une analyse sérielle, en particulier étant donné que 90 % des métastases surviennent dans les cinq premières années suivant le diagnostic (Lin *et al.*, 2024).

CHAPITRE 3 – Approches omiques dans l'étude des cancers

l) Les approches multi-omiques : vers une exploration holistique des cancers et une connaissance approfondie de la maladie résiduelle minimale

L'oncogenèse résulte souvent de l'interaction de multiples voies moléculaires, où les gènes s'inscrivent dans des réseaux complexes dont la dynamique dépend de facteurs environnementaux (Boyle *et al.*, 2017). Grâce aux technologies omiques, il est possible de modéliser ces interactions aussi bien au niveau des gènes, de l'ARN ou des protéines.

L'objectif de ces méthodes réside également dans l'identification de caractéristiques biologiques de sous-populations de patients. Ces approches permettent de concevoir des modèles prédictifs pertinents, en vue de mieux comprendre la physiopathologie du cancer et d'élaborer de nouvelles thérapies (Heo *et al.*, 2021).

Dans le contexte de la MRD, où l'objectif est de détecter et de quantifier les cellules tumorales restantes après le traitement, ces technologies sont d'une importance cruciale :

D'une part, les approches multi-omiques permettent la détection des altérations biologiques avec une grande précision. Cette **sensibilité accrue** représente un

avantage majeur dans l'étude de la maladie résiduelle, puisqu'elle permet sa détection plus précoce et donc la planification personnalisée de la thérapie proposée au patient.

D'autre part, il est désormais possible de caractériser la **diversité tumorale** due à la présence de cellules tumorales hétérogènes aux propriétés biologiques diverses. Par l'identification de sous-populations résistantes aux traitements, il est possible d'optimiser les thérapies ciblées au cours de la MRD.

L'intérêt majeur des approches multi-omiques réside cependant dans l'identification de **signatures moléculaires spécifiques**. Appliquées à la maladie résiduelle, elles peuvent favoriser son diagnostic, prédire la progression tumorale et participer au choix de la stratégie thérapeutique. Plus encore, l'évolution au fil du temps des profils omiques pourrait définir la réponse au traitement et permettre la détection plus rapide de la rechute.

Enfin, par l'identification de **nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques** à la dormance tumorale, le développement de nouvelles thérapies ciblées ouvre la voie à de nouvelles stratégies innovantes.

En résumé, les technologies multi-omiques offrent un aperçu holistique pour explorer le génome, l'épigénome, le transcriptome et le protéome dans un contexte de cancer (Chakraborty *et al.*, 2024) (Figure 16). Elles sont alors cruciales pour mieux appréhender la MRD.

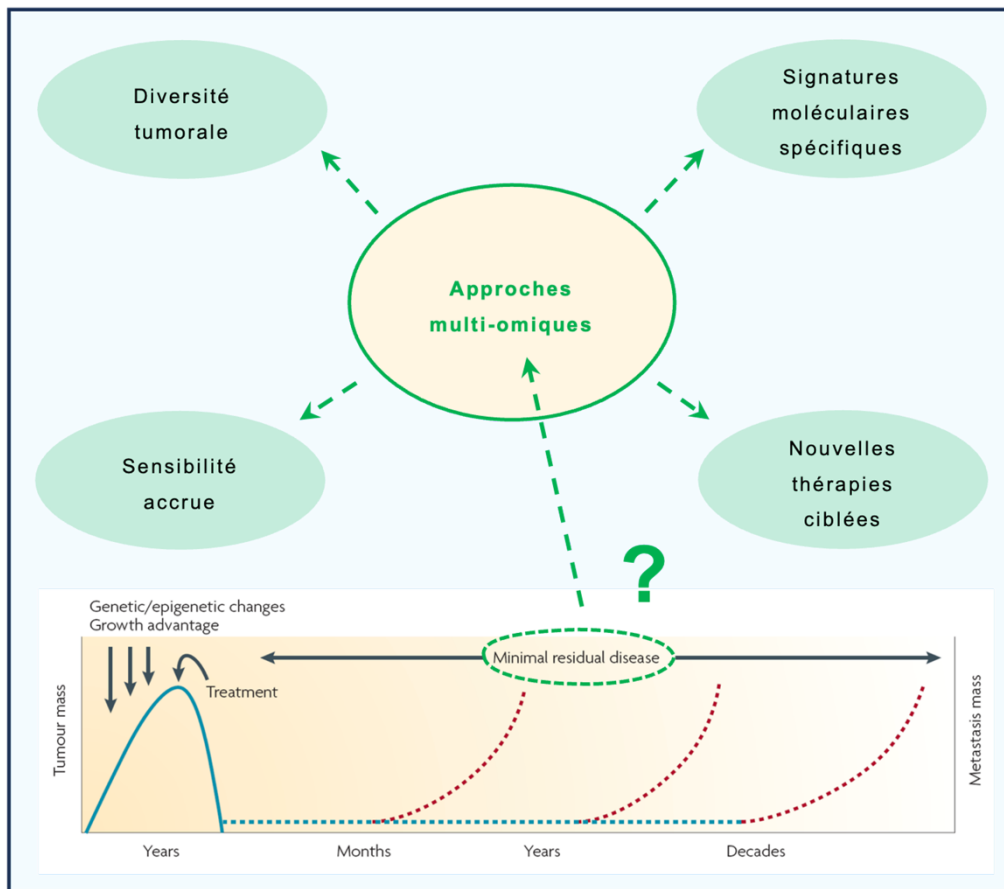


Figure 16 : Apport des approches multi-omiques dans l'étude de la MRD.

(adapté de Aguirre-Ghiso, 2007) En permettant une détection des altérations biologiques avec une grande précision, les approches multi-omiques permettent de caractériser la diversité tumorale et d'identifier des signatures moléculaires spécifiques. Elles favorisent l'élaboration de nouvelles thérapies ciblées.

II) Génomique

A) Importance de la génomique dans les cancers

La complexité du cancer réside notamment dans l'apparition d'altérations génétiques. Les mutations somatiques, comprenant notamment les altérations du nombre de copies de gènes et les variants structuraux, jouent un rôle crucial dans le

développement du cancer et sa progression (Stratton *et al.*, 2009). De nombreuses études ont aujourd'hui identifié plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que des oncogènes impliqués dans divers types de cancer. Des mutations spécifiques et récurrentes de ces acteurs sont désormais prises en compte dans l'adaptation de la stratégie thérapeutique afin de définir la sensibilité aux thérapies, le pronostic ainsi que la détection de la MRD (Garraway et Landers, 2013).

Dans le processus cancéreux, les mutations somatiques sont le résultat de divers processus comprenant l'instabilité de la réplication de l'ADN ainsi que les expositions à des agents mutagènes. L'identification de signatures mutationnelles propres à des cancers spécifiques permet de mieux caractériser l'étiologie des pathologies (Alexandrov *et al.*, 2013).

De plus, l'analyse du séquençage du génome entier a mis en évidence un mécanisme d'instabilité génomique appelé chromothripsis, où un ou plusieurs chromosomes subissent un réarrangement structural impliquant l'apparition de mutations et des défauts de réparation de l'ADN. Un remaniement chromosomique peut alors induire la formation de gènes de fusion, la dérégulation des gènes suppresseurs de tumeurs et l'amplification des oncogènes. Le chromothripsis est décrit dans divers génomes cancéreux, dont le mélanome et la leucémie myéloïde aiguë (Kloosterman *et al.*, 2014 ; Nazaryan-Petersen *et al.*, 2020).

B) Approches génomiques

La génomique analyse la séquence génomique et ses variations, notamment les variations du nombre de copies (CNV), les insertions et délétions (INDEL) et les variantes nucléotidiques uniques (SNV), qui sont étroitement liées au cancer (Stratton *et al.*, 2009). Les avancées technologiques de criblage du génome, telles que le séquençage du génome entier (WGS) (Figure 17) et le séquençage de l'exome entier (WES), ont permis d'identifier ces variations avec une précision accrue. Le WGS permet une analyse complète de l'ADN, y compris des mutations présentes dans les régions non codantes. En revanche, le WES se concentre sur les régions codantes, représentant environ 1-2 % du génome, et est particulièrement utile pour détecter les mutations dans les gènes associés au cancer, qui peuvent avoir des implications cliniques significatives, comme le développement de thérapies ciblées.

Le génotypage est principalement réalisé à l'aide de technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS), qui permettent d'identifier les variations génétiques à l'échelle du génome. Ce processus comprend une étape de capture de séquences suivie de l'alignement des données sur un génome de référence, ce qui permet d'effectuer des analyses détaillées des variations (Roy *et al.*, 2018).

Les plateformes de NGS, telles que les séquenceurs Illumina, Roche 454 et Ion Torrent, présentent des caractéristiques spécifiques qui les rendent adaptées à divers types d'analyses. Par exemple, le séquenceur Illumina, réputé pour sa précision et son coût abordable, est largement utilisé pour des études de mutations dans des gènes

clés comme *BRAF* et *NRAS*, fréquemment impliqués dans des cancers tels que le mélanome (Shuikan *et al.*, 2019).

Un aspect crucial des approches génomiques est leur capacité à exposer l'hétérogénéité tumorale. Les tumeurs contiennent souvent des sous-clones cellulaires avec des profils génétiques distincts, ce qui peut influencer la progression de la maladie et la réponse aux traitements. Cette diversité rend la gestion des cancers particulièrement complexe, car des sous-clones résistants peuvent émerger au sein de la tumeur, échappant aux thérapies ciblées et compromettant l'efficacité du traitement.

Le séquençage ciblé représente également une stratégie importante pour explorer les gènes d'intérêt, permettant d'identifier des variations génétiques associées à des sous-types spécifiques de cancer. Cette méthode est essentielle pour orienter les choix thérapeutiques, en adaptant les traitements aux caractéristiques génétiques individuelles des patients.

Enfin, le séquençage de l'ADN contribue à la détection des anomalies chromosomiques, telles que les translocations et les duplications, qui sont cruciales dans la pathogenèse de nombreux cancers. Par exemple, dans le cas des LAM, la translocation $t(8;21)$ constitue un marqueur diagnostique clé, influençant non seulement le pronostic mais également les décisions thérapeutiques (Döhner *et al.*, 2017).

Les approches génomiques, notamment le séquençage de nouvelle génération et le séquençage ciblé, sont essentielles pour une compréhension approfondie des cancers. Elles permettent d'identifier des mutations spécifiques et des anomalies chromosomiques, tout en offrant une perspective sur l'hétérogénéité tumorale et l'évolution clonale.

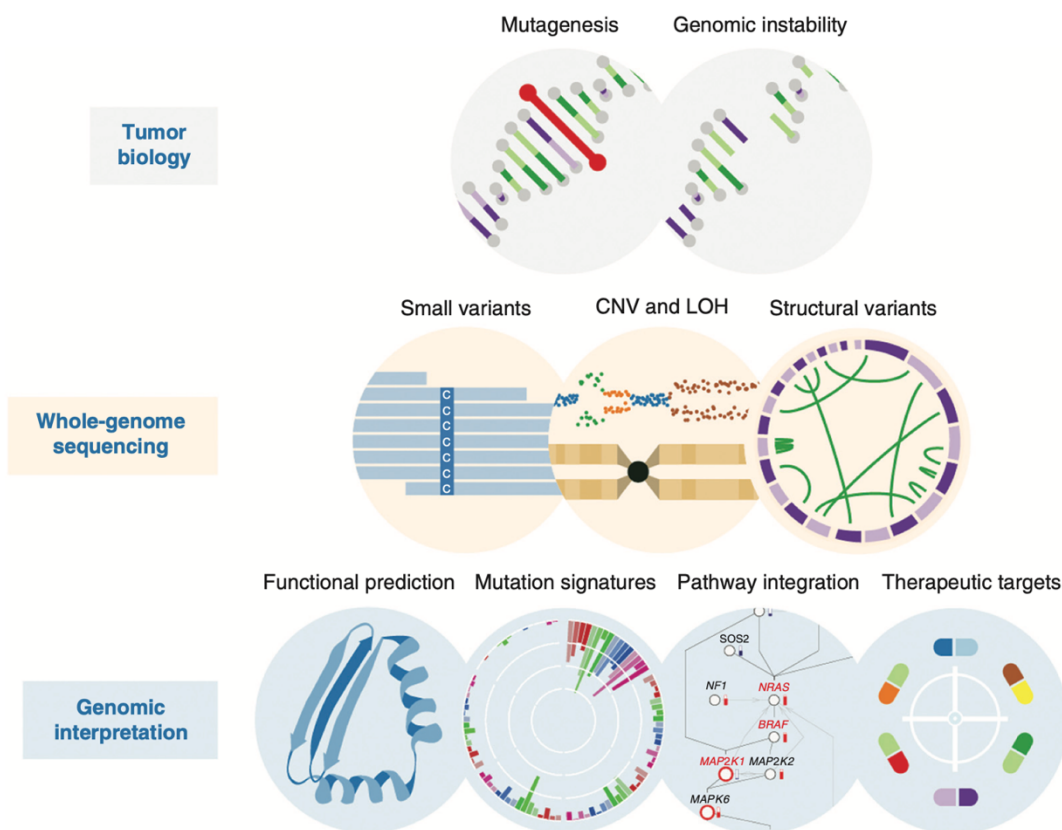


Figure 17 : Whole Genome Sequencing (WGS).

Les données de WGS permettent l'identification d'altérations génomiques, ce qui permet une meilleure compréhension de la pathologie et l'identification de cibles thérapeutiques (Zhao *et al.*, 2019).

III) Épigénétique

A) Importance de l'épigénétique dans les cancers

Les cancers résultent entre autres de perturbations génétiques et épigénétiques affectant la régulation de l'expression de gènes. L'épigénétique se caractérise par les changements stables dans l'expression génique qui ne sont pas dus à des altérations de la séquence d'ADN (Berger *et al.*, 2009). Parmi ces changements épigénétiques, on retrouve la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, les ARN non codants et le remodelage de la chromatine. Ces altérations peuvent mener à une transcription anormale des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, contribuant alors au développement et à la progression tumorale.

Dans les cancers, les modifications épigénétiques peuvent entraîner un **dysfonctionnement des éléments régulateurs** de l'expression génique. Cette dérégulation de la transcription des gènes est souvent associée à l'activation d'oncogènes ou à la désactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Cao et Shilatifard, 2019). De plus, des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN, le remodelage de la chromatine et les modifications des histones peuvent jouer un rôle crucial dans le développement du cancer en modifiant la structure de l'ADN et en régulant l'accessibilité des gènes (Baylin et Jones, 2011). Si l'hyperméthylation des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs favorise la prolifération cellulaire incontrôlée, l'hypométhylation globale du génome participe à l'instabilité génomique et à l'activation inappropriée de proto-oncogènes.

Cependant, les changements épigénétiques associés aux cancers peuvent être **réversibles**. En ce sens, l'inhibiteur EPZ5676 (Pinometostat) de l'histone H3K79 méthyltransférase de type DOT1 (*Disruptor of telomeric silencing 1-like, DOT1L*) est actuellement en phase d'essais clinique et a été validé par la FDA pour le traitement de plusieurs formes de leucémie (Cao *et al.*, 2021).

Ainsi, l'usage de médicaments ciblant les enzymes impliquées dans les processus épigénétiques contribuant à la progression tumorale ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces pour traiter ces pathologies.

B) Les modifications des histones, actrices phares de la régulation de l'expression génique

Les histones sont des composants essentiels de la chromatine, formant des structures semblables à des bobines autour desquelles l'ADN s'enroule (Luger *et al.*, 1997). Dans les organismes eucaryotes, les histones se présentent sous la forme d'octamères composés de deux copies de quatre histones : H2A, H2B, H3 et H4. Chaque octamère est associé à 147 paires de bases d'ADN pour former un nucléosome, unité fondamentale de la chromatine (Kornberg et Lorch, 1999) (Figure 18).

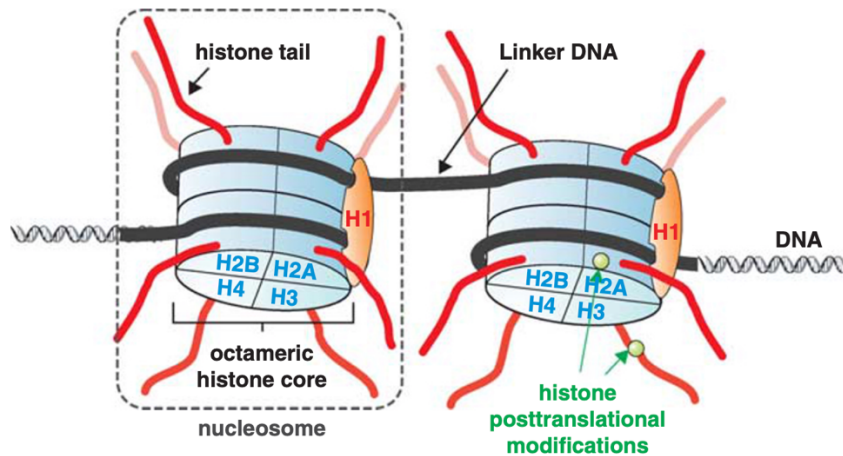


Figure 18 : Structure chromatinienne (Fullgrabe *et al.*, 2011).

Le nucléosome, unité de base de la chromatine, est composé d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3, H4), autour duquel l'ADN est enroulé. Près du nucléosome, l'histone H1 se lie à l'ADN pour stabiliser la fibre chromatinienne.

Le remodelage de la chromatine comprend un ensemble de modifications des histones, dont la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination et la méthylation (Jenuwein, 2001). Elles peuvent réguler finement l'état transcriptionnel grâce à des complexes protéiques associés à la chromatine. Certains résidus spécifiques des histones jouent un rôle critique dans le maintien de l'intégrité du génome et la régulation de l'expression des gènes. En particulier, l'équilibre de la méthylation des histones est essentiel pour ces processus (Chi *et al.*, 2010).

Ce sont les régions N-terminales des histones nucléaires (en particulier H3 et H4) qui sont riches en sites de modifications post-traductionnelles dont la méthylation (Jenuwein, 2001), la phosphorylation (Peterson et Laniel, 2004), l'ubiquitination (Shilatifard, 2006), l'acétylation (Wade *et al.*, 1997), la sumoylation (Shilo et Eisenman, 2003) et l'ADP-ribosylation (Messner et Hottiger, 2011). Deux mécanismes distincts sont suggérés pour décrire l'impact des modifications des histones sur la fonction chromosomique. D'une part, ces modifications pourraient détériorer la charge

électrostatique des histones en appliquant un changement structural qui affecte leur liaison à l'ADN. D'autre part, elles peuvent s'associer à des modules de reconnaissances de protéines tels que les chromodomaines ou les bromodomaines, qui reconnaissent spécifiquement les lysines méthylées ou acétylées (Füllgrabe *et al.*, 2011).

Chaque modification post-traductionnelle d'histone est associée à l'ajout de marque spécifique apposée par une enzyme dédiée : il s'agit des histones méthyltransférases, acétyltransférases, désacétylases et déméthylases (Allis *et al.*, 2007 ; Füllgrabe *et al.*, 2010). Les enzymes qui modifient les histones sont souvent dérégulées dans les cancers, indiquant leur rôle potentiel et spécifique dans le développement tumoral (Ozdogan *et al.*, 2006).

Les méthylations des lysines des histones activent ou répriment la transcription selon leur position ainsi que leur degré de méthylation. Ainsi, les méthylations H3K4, H3K36 et H3K79 sont généralement associées à une activation de la transcription, tandis que les méthylations H3K9, H3K27 et H4K20 jouent plutôt sur la répression de la transcription (Black *et al.*, 2012).

1) H3K4me3

La méthylation des résidus de lysine des histones, comme H3K4me1, H3K4me2 et H3K4me3 impactent différemment la transcription des gènes.

Les mutations des enzymes responsables de la méthylation et la déméthylation de H3K4 sont associées à un risque accru de cancer. Par exemple, les translocations chromosomiques impliquant le gène *MLL1* (aussi appelé *KMT2A*, *lysine methyltransferase 2A*) sont fréquemment observées dans diverses hémopathies malignes (leucémie lymphoblastique, leucémie aiguë myéloïde) et entraînent une méthylation aberrante de H3K4. Cela a pour conséquence une activation inappropriée des gènes associées à la croissance tumorale (Tenney *et al.*, 2005). De même, des mutations dans les déméthylases de H3K4, telles que les protéines de la famille *JARID1* (*jumonji*, *AT rich interactive domain 1*), sont associées à la survenue de différents cancers dont la leucémie et le cancer du sein (de Rooij *et al.*, 2013 ; Yamane *et al.*, 2007). Ces découvertes soulignent le rôle crucial de la régulation de la méthylation de H3K4 dans la progression tumorale.

2) H3K9me3

La méthylation de H3K9 est une modification épigénétique couramment associée à l'inhibition de la transcription et à la formation de la structure d'hétérochromatine (Barski *et al.*, 2007).

Les méthylations H3K9 sont souvent liées au cancer (Kramer, 2016). En effet, G9a, autrement appelée EHMT2 (*euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2*), est une enzyme responsable de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9). La surexpression de G9a induit une méthylation exacerbée de H3K9 sur les gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui réprime leur expression. Ce phénomène est décrit dans le cancer du sein et le cancer de l'ovaire (Wozniak *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2013).

Dans le cancer du sein, une diminution du niveau de H3K9me3 est associée à la surexpression de nombreux ICP dont PD-1, CTLA-4, TIM-3 (*hepatitis A virus cellular receptor 2*) et LAG-3 (Sasidharan *et al.*, 2018). Le même constat est observé dans les leucémies myéloïdes concernant la méthylation H3K9me3 (Monaghan *et al.*, 2019). Ceci suggère que les méthylations H3K9me3 pourraient être une bonne piste thérapeutique.

3) H3K27me3

La triméthylation de H3K27 est associée à la répression transcriptionnelle et est régulée par l'enzyme EZH2 au sein du complexe PRC2 (Cao *et al.*, 2002).

Des mutations spécifiques d'*EZH2* peuvent augmenter les niveaux de H3K27me3, contribuant ainsi à la pathogenèse de certains lymphomes (Yap *et al.*, 2011). C'est pourquoi des inhibiteurs d'*EZH2* ont été développés afin de réduire la méthylation de H3K27me3 tout en réactivant les gènes cibles du PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) (Song *et al.*, 2016). De plus, des protéines contenant des domaines chromodomaine, comme CBX7 (*chromobox 7*), reconnaissent la H3K27me3 et sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire ainsi que dans la différenciation et le renouvellement des cellules souches. Des composés chimiques ciblant CBX7 (tel que MS377452) ont montré des effets inhibiteurs sur la croissance tumorale dans le cancer de la prostate, faisant de cette méthylation une cible thérapeutique intéressante (Ren *et al.*, 2015).

C) Approches épigénétiques

L'analyse la plus courante de l'épigénome repose sur le ChIP-Seq (*chromatin immunoprecipitation followed by sequencing*). Cette technologie biomoléculaire permet l'étude de l'interaction entre les protéines et l'ADN à l'échelle génomique. Le ChIP-seq capture soit les histones avec des modifications spécifiques, soit les protéines se liant à l'ADN, et séquence l'ADN du locus où elles étaient attachées. Les différentes modifications des histones, ainsi que leurs combinaisons, indiquent des états variés de la chromatine, offrant ainsi un aperçu du paysage régulateur d'une identité cellulaire spécifique (Knowles et Hurst, 2015).

L'ATAC-seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing*), une méthode de séquençage de NGS pour évaluer l'accessibilité de la chromatine à l'échelle du génome, peut être utilisée pour estimer l'accessibilité globale de la chromatine. Contrairement à d'autres méthodes telles que le DNase-seq, l'ATAC-seq offre un examen plus rapide et plus sensible de l'accessibilité de la chromatine en raison de son design biochimique unique basé sur l'utilisation de la transposase Tn5 qui a une affinité accrue pour les régions accessibles de l'ADN (Buenrostro *et al.*, 2015). En plus de l'ATAC-seq, d'autres méthodes couramment utilisées pour étudier l'épigénomique en oncologie incluent l'analyse de la méthylation de l'ADN, souvent réalisée par séquençage au bisulfite, et l'étude des modifications des histones.

IV) Transcriptomique

A) Importance de la transcriptomique dans l'étude des cancers

L'analyse de l'expression génique différentielle est l'une des applications les plus courantes du séquençage de l'ARN (RNA-Seq). Elle permet l'identification de gènes exprimés de manière différentielle entre différentes conditions. Ceci facilite la discrimination des mécanismes moléculaires et donc l'identification des biomarqueurs du cancer, y compris des ARN messagers circulaires ou encore des microARN (Liu *et al.*, 2019). L'étude de la transcriptomique est nécessaire pour compléter et améliorer la détection de mutations et autres altérations géniques par rapport au seul séquençage de l'ADN (Davies *et al.*, 2019).

L'hétérogénéité tumorale et l'évolution du cancer sont deux aspects essentiels à la compréhension de la pathologie. En effet, la diversité des cellules cancéreuses est présente dès leur apparition, et continue à évoluer au cours de l'oncogenèse (Guo *et al.*, 2019). L'analyse transcriptomique permet la détection de l'ensemble des transcrits d'un échantillon, tandis que le séquençage de l'ARN sur cellule unique optimise cette stratégie en fournissant une résolution à l'échelle de la cellule individuelle. Cela permet de documenter la diversité cellulaire intra tumorale (Suvà *et Tirosh*, 2019). Cette technique a notamment fait ses preuves pour l'étude du mélanome (Tirosh *et al.*, 2016). Certaines technologies plus émergentes, dont le séquençage transcriptomique spatial et le séquençage de l'ARN single-nuclei, offrent une analyse encore plus poussée, en informant sur la localisation spatiale des cellules

cancéreuses à l'échelle tissulaire et en permettant la détection de tous types cellulaires au sein d'un tissu donné (Stahl *et al.*, 2016 ; Selewa *et al.*, 2020).

La résistance aux traitements est l'une des principales causes d'échec thérapeutique, et ses mécanismes sous-jacents sont encore mal compris (Lim *et al.*, 2019). Dans ce contexte, l'étude du transcriptome s'avère cruciale puisqu'elle permet notamment de mieux appréhender la maladie résiduelle minimale. En ce sens, cette méthodologie a révélé que les cellules cancéreuses en sortie de dormance produisent le facteur de transcription BORIS (*Brother of the regulator of imprinted sites*) en quantité élevée, ce qui induit la régulation de l'expression de gènes de survie dans des cellules neuroblastiques réfractaires au traitement (Debruyne *et al.*, 2019). De plus, l'étude transcriptomique permet l'étude plus spécifique de sous populations cellulaires à travers l'hétérogénéité intra tumorale afin de mieux appréhender la résistance aux traitements (Sharma *et al.*, 2018).

Grâce aux études transcriptomiques, il est également possible de profiler de façon plus exhaustive les acteurs impliqués dans le microenvironnement tumoral en identifiant leurs interactions et les voies de signalisation. Le séquençage de l'ARN à cellule unique a permis la mise en évidence dans le mélanome du rôle du facteur de transcription NFATC1 (*nuclear factor of activated T cells 1*) dans l'épuisement des LT a pu être identifié (Tirosh *et al.*, 2016). Concernant la leucémie myéloïde aiguë, le rôle des ARN non codants et des gènes de fusion ont été décrits par séquençage de l'ARN, ainsi que divers gènes immunomodulateurs de la fonction des LT (van Galen *et al.*, 2019 ; Ren *et al.*, 2020).

B) Approches transcriptomiques

L'analyse de la quantité d'ARN à travers une étude transcriptomique est essentielle pour évaluer l'expression génique, notamment grâce au **séquençage de l'ARN** (RNA-seq), qui permet de quantifier l'expression des gènes à l'échelle du transcriptome.

Une avancée significative est le **séquençage sur cellule unique** (scRNA-seq), qui offre une résolution inégalée en analysant les transcriptomes de cellules individuelles au sein d'un échantillon. Cette méthode innovante surmonte les limites des techniques de séquençage traditionnelles, qui, en se basant sur des moyennes de données provenant de plusieurs cellules, entraînent souvent une perte d'informations cruciales sur les profils d'expression génique uniques. Le scRNA-seq favorise une caractérisation approfondie de l'hétérogénéité tumorale en mettant en lumière les variations transcriptomiques au sein de populations cellulaires hétérogènes.

Cela permet de révéler la diversité et la complexité des réponses cellulaires au sein d'un même type cellulaire ou d'un tissu. Les applications de cette technologie sont vastes et incluent l'étude des mécanismes de différenciation cellulaire ainsi que l'identification de sous-populations cellulaires spécifiques dans des contextes pathologiques tels que le cancer (Lee *et al.*, 2021). (Figure 19)

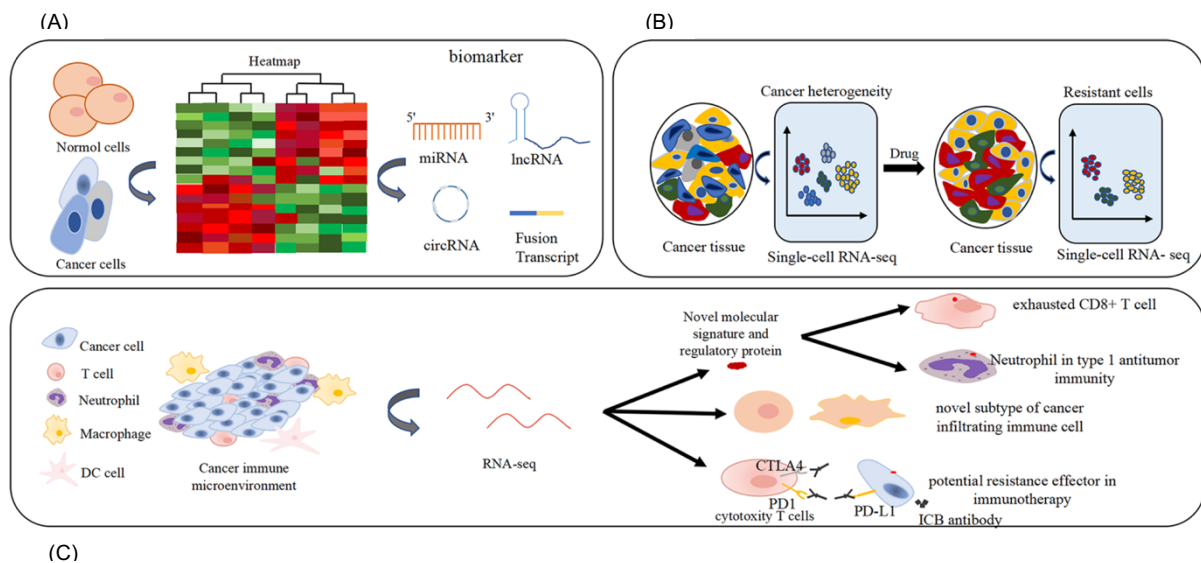


Figure 19 : Applications de la technologie RNA-seq dans l'analyse de l'expression génique des biomarqueurs cancéreux.

(A) Le RNA-seq permet l'identification de biomarqueurs potentiels mis en évidence par différentiel d'expression ($\log_2(\text{fold change})$). (B) La diversité des mécanismes de résistance aux traitements peut être élucidée par le RNA-seq pour caractériser des sous-populations du tissu tumoral. (C) L'enrichissement des gènes exprimés informe sur les voies de signalisations immunitaires. (Hong *et al.*, 2020)

V) Protéomique

A) Apport de la protéomique dans l'appréhension des processus oncogéniques

L'étude protéomique est essentielle pour analyser les altérations associées au cancer, car le protéome - l'ensemble des protéines exprimées à un moment donné et dans des conditions spécifiques - reflète de manière plus directe le phénotype cellulaire que les approches génomiques ou transcriptomiques. En effet, l'expression génique n'est pas toujours corrélée à l'expression protéique, ce qui souligne l'importance d'une analyse protéomique approfondie.

Les **biomarqueurs protéiques** du cancer incluent des protéines surexprimées, des protéines mutées, ainsi que des protéines présentant des modifications post-traductionnelles spécifiques aux tumeurs. Parmi ces biomarqueurs, on retrouve des antigènes, des hormones et des enzymes, mais aussi des modifications de glycosylation, caractéristiques des cellules cancéreuses. Par exemple, les glycanes, qui sont des polymères de monosaccharides, peuvent se conjuguer à des protéines pour former des glycoprotéines dont l'expression diffère dans le cadre des processus oncogéniques.

Dans le domaine thérapeutique, le profilage immunitaire à l'aide de biomarqueurs ARN/protéines permet de définir le pronostic des patients et d'identifier les traitements les plus compatibles avec leurs caractéristiques tumorales (Sarhadi *et al.*, 2022). Ainsi, la protéomique ouvre la voie à des approches personnalisées en oncologie.

B) Approches protéomiques

Les techniques couramment utilisées pour étudier les protéines dans les tissus tumoraux incluent l'immunohistochimie (IHC), qui permet une analyse directe des échantillons, ainsi que l'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) pour la détection de biomarqueurs dans les fluides corporels. Toutefois, les récents progrès en **spectrométrie de masse** ont considérablement amélioré notre capacité à détecter et quantifier un grand nombre de protéines avec une grande précision (Lai *et al.*, 2018).

Parmi ces avancées, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) se distingue en permettant d'obtenir des données protéomiques à haut débit à partir d'échantillons pour lesquels les informations sur le transcriptome et les altérations du nombre de copies ont déjà été collectées. Cette technologie permet non seulement d'identifier les protéines présentes, mais également d'explorer leurs modifications post-traductionnelles, qui jouent un rôle crucial dans la régulation de leur fonction (Sinha *et al.*, 2020).

En oncologie, la protéomique permet de distinguer les schémas d'expression génique et protéique entre cellules normales et cancéreuses, mettant ainsi en lumière les mécanismes moléculaires intrinsèques aux processus oncogéniques. De plus, la protéomique s'intègre souvent dans des études multi-omiques, qui combinent différentes techniques pour dresser un portrait moléculaire holistique des tumeurs. Le Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC), par exemple, illustre cette approche intégrative, mettant à profit des techniques protéomiques pour enrichir la recherche oncologique.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE THÈSE

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE THÈSE

La maladie résiduelle minimale (MRD) est documentée à la fois dans des tumeurs solides et des hémopathies malignes (Aguirre-Ghiso, 2007 ; Aguirre-Ghiso, 2021). Cette persistance de cellules tumorales malgré le traitement initial peut avoir un impact significatif sur le devenir des patients, en influençant la réponse aux traitements et le pronostic. L'hétérogénéité tumorale intra- et inter patients est souvent associée à la présence de mutations génétiques qui peuvent influencer leurs réponses aux différentes stratégies thérapeutiques. Cependant, l'effet spécifique de ces mutations sur la dormance tumorale et la MRD reste encore largement incompris.

Les études sur la MRD sont souvent limitées par le manque de modèles expérimentaux adéquats pour étudier ce phénomène (Min HY *et al.*, 2023), et ne permettent pas la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans la dormance des cellules tumorales. Même si certaines recherches ont identifié des signatures spécifiques des cellules dormantes ou résiduelles, ces données sont souvent restreintes au séquençage de l'ADN et/ou de l'ARN, ne prenant pas en compte l'interaction entre le processus de MRD et le système immunitaire (Farge *et al.*, 2017 ; Patton *et al.*, 2021 ; Rambow *et al.*, 2018).

Mon projet de thèse vise à explorer les caractéristiques génétiques et non génétiques des cellules tumorales dormantes en utilisant une approche multi-omique. En combinant des méthodes de séquençage de l'ADN et de l'ARN avec des analyses fonctionnelles, l'objectif est d'examiner les mécanismes régissant la dormance tumorale et la MRD.

Ce travail repose sur l'utilisation combinée de nombreuses données, et l'utilisation de technologies disponibles au sein du laboratoire et en collaboration. Le cœur du projet consiste à traiter et analyser une grande quantité de données de natures variées, incluant des données transcriptomiques, protéiques, d'exome, de CGH (hybridation génomique comparative), épigénétiques et des data provenant de banques de données chez l'homme. Face à l'abondance de données générées, et en l'absence de technologies spatiales dans notre laboratoire, nous avons orienté notre étude vers une analyse multi-omique en maximisant l'exploitation des données en notre possession. Grâce à nos modèles murins syngéniques de MRD qui n'excluent pas le rôle du système immunitaire, et par comparaison avec les banques de données chez l'homme, l'objectif est de décrypter au mieux les mécanismes génétiques et non génétiques sous-jacents à la MRD.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MÉTHODOLOGIE

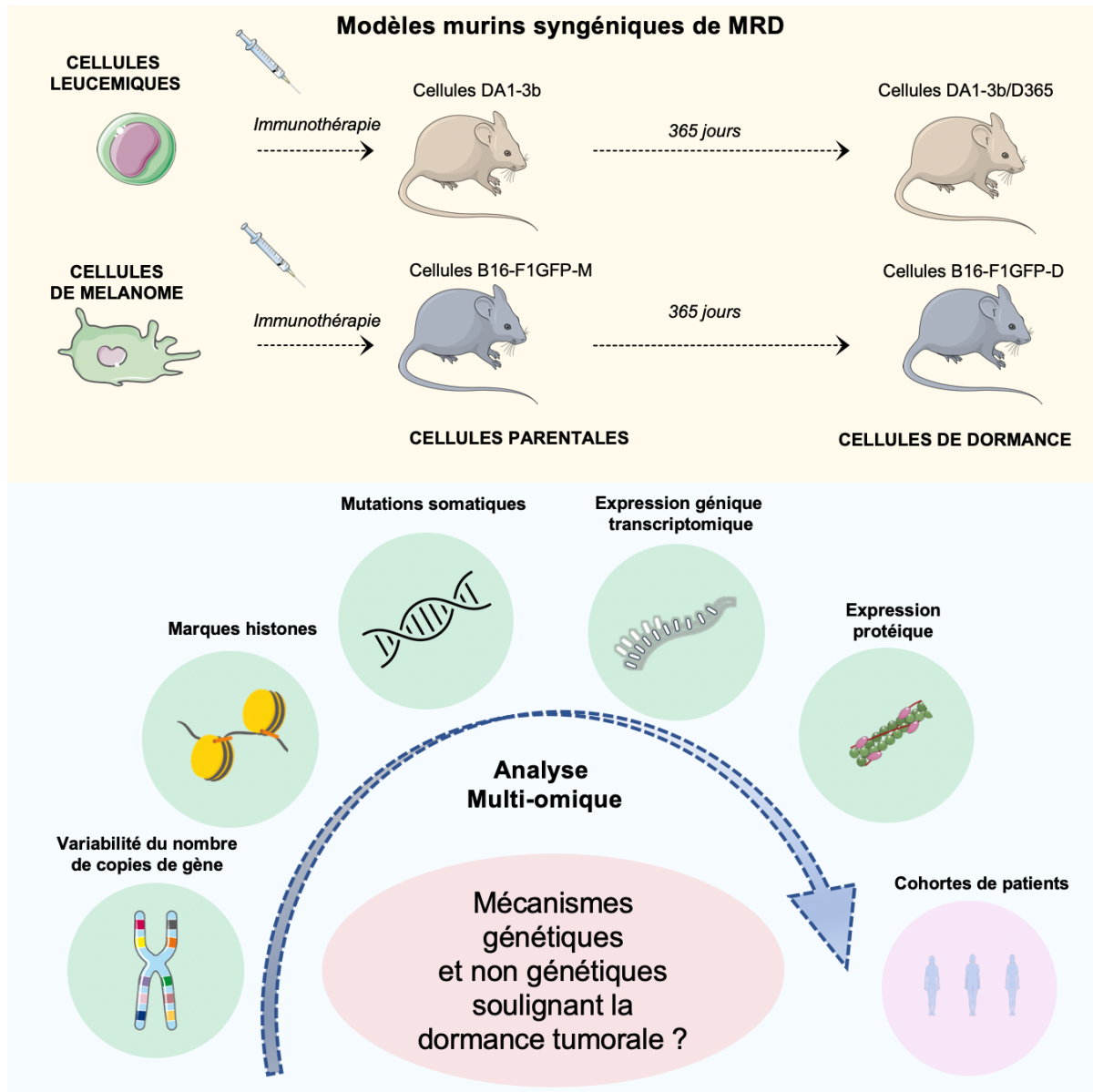


Figure 20 : Schéma méthodologique synthétique de la démarche expérimentale. Le panel du haut (jaune) décrit l'élaboration des deux modèles cellulaires par immunothérapie à différents stades de dormance. Le panel du bas (bleu) récapitule la démarche multi-omique adoptée afin de décrire les mécanismes génétiques et non génétiques soulignant la MRD dans nos modèles d'étude. Cela comprend l'analyse de la variabilité du nombre de copies de gènes, les marques d'histones, les mutations somatiques, l'expression génique transcriptomique, l'expression protéique. Les résultats sont comparés avec les data publiées dans des cohortes de patients.

Utilisation de modèles murins syngéniques de leucémie myéloïde et de mélanome

Pour réaliser ces travaux, nous avons utilisé deux modèles cellulaires conçus par le laboratoire (Figure 20).

Les lignées cellulaires de leucémie myéloïde murine incluent la lignée DA1-3b et la lignée de dormance DA1-3b D365. La lignée DA1-3b parentale a été créée à partir de la lignée murine de leucémie myéloïde DA1 par transfection stable avec le gène de fusion humain *BCR-ABL* (chromosome de Philadelphie, *Breakpoint Cluster Region-Abelson*), gène responsable de la leucémie myéloïde chronique. Ce modèle murin syngénique de leucémie est indépendant de l'IL-3 et récapitule le tableau clinique de la leucémie myéloïde aiguë humaine (Vereecque, 1999). Les cellules de mélanomes incluent la lignée parentale B16-F1GFP-M, ainsi que les lignées de dormance B16-F1GFP-DB#1, B16-F1GFP-DB#2 et B16-F1GFP-DB#3 (Touil *et al.*, 2016).

Dans les deux modèles, les cellules de dormance proviennent donc de modèles murins syngéniques de MRD induite par vaccination cellulaire, à différents stades de dormance (Jour 60 et Jour 365 pour le modèle leucémique, et Jour 365 ainsi que la "2ème génération au site cérébral" pour le modèle de mélanome). Cette étape comprend l'implication de l'IL-12 et du GM-CSF (*colony stimulating factor 2*) pour la leucémie et le mélanome, respectivement. Après isolation, elles ont été amplifiées *in vitro* et stockées dans de l'azote liquide pour des analyses ultérieures.

Ces lignées cellulaires sont cultivées en conditions stériles à une densité de 0,5 million de cellules par ml dans des flasques de 75 cm² en milieu DMEM (Dulbecco's

Modified Eagle Medium, 1X) avec GlutaMAX 1X (D-Glucose, pyruvate, Gibco), supplémenté de sérum de veau foetal décomplémenté (10%, Sigma-Aldrich), d'acides aminés non essentiels (1%, MEM NEAA 100X, Gibco) et de pénicilline/streptomycine (1%, Gibco). Les flasques sont maintenues dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO2 en atmosphère humide, et le milieu est renouvelé toutes les 48-72 heures. Le nombre de cellules est déterminé par comptage sur cellule de Kova, leur viabilité étant évaluée par dilution avec du bleu Trypan (Gibco).

Analyse par hybridation génomique comparative sur puce

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir d'échantillons congelés selon les recommandations du fabricant (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen). La quantité et la qualité de l'ADN extrait ont été évaluées sur une plateforme NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) et par électrophorèse sur gel.

L'analyse CGH sur puce a été effectuée en utilisant des puces pangénomiques d'oligonucléotides de 60-mer (version de design 027411_D_F_20150623, Mouse Genome 180K CGH array, Agilent Technologies). Les puces ont été scannées sur un scanner Agilent G2505B, et les images ont été quantifiées à l'aide du logiciel Agilent Feature Extraction (v10.7.3.1) avec le génome de souris mm9 (mm9 : NCBI37).

Les données de l'analyse sur puce sont accessibles publiquement via le numéro d'accession de la série Gene Expression Omnibus (GEO) GSE250172. Les variations du nombre de copies (CNV) ont été identifiées en utilisant l'algorithme de détection des aberrations 2 (ADM2). Une CNV a été qualifiée de gain ou de perte selon la distribution du ratio log2 dans le logiciel Genomic Workbench (v5.0.14).

Analyse du séquençage whole-exome

L'extraction d'ADN a été réalisée comme décrit dans la section précédente. La préparation de la bibliothèque a été réalisée en utilisant le système d'enrichissement de cibles SureSelect (Agilent Technologies, USA), avec 1 µg d'ADN génomique fragmenté. La bibliothèque a été purifiée et sélectionnée en taille à l'aide des billes AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, USA). Après ligature des codes-barres Ion Xpress et des adaptateurs P1, les bibliothèques ont été amplifiées. Les fragments d'ADN amplifiés ont été hybridés à des sondes d'ARN biotinylés et capturés à l'aide de billes magnétiques recouvertes de streptavidine. L'évaluation de la qualité des fragments de bibliothèque capturés a été effectuée sur un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA).

Nous avons préparé les modèles en utilisant la chimie Ion PI™ Hi-Q™ (Life Technologies, USA), avec 50 pM de chaque bibliothèque chargée sur un instrument Ion Chef™ (Life Technologies, USA) pour l'enrichissement des matrices. L'efficacité du templating des sphères Ion a été évaluée en utilisant un fluoromètre Qubit™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). Les bibliothèques préparées ont été chargées sur des puces Proton PI v3 (deux échantillons/puce) et séquencées sur un Ion Proton en utilisant la chimie de séquençage PI™ Hi-Q™ 200 (Life Technologies, USA) avec une longueur de lecture de 260 pb et 520 cycles de flux. Le logiciel de pipeline spécifique à la plateforme Ion Torrent (Torrent Suite v4.0) a été utilisé pour séparer les lectures avec codes-barres, générer un alignement de séquence avec la référence du génome de la souris mm10, effectuer une analyse de couverture des régions cibles, et filtrer et supprimer les lectures de mauvais signal.

Les données de séquençage de l'exome sont accessibles publiquement via l'archive Sequence Read Archive (SRA) sous le numéro de bioproject PRJNA1103364. Le fichier d'alignement de Torrent Suite a été transféré à Ion Reporter (Ion Reporter v4.0) pour la génération du fichier de variantes en utilisant les paramètres par défaut. Un total de 218 914 variants (insertions/délétions/SNPs) ont été détectés dans l'ensemble des échantillons.

Analyse du séquençage ciblé

L'extraction d'ADN a été réalisée comme décrit dans la section « analyse par hybridation génomique comparative sur puce ». Les bibliothèques AmpliSeq ont été préparées en utilisant un kit de bibliothèque ion AmpliSeq 2.0 et un panel personnalisé ion AmpliSeq (Life Technologies). Les technologies AmpliSeq ont été utilisées pour concevoir une bibliothèque NGS personnalisée comprenant 190 amplicons répartis en deux pools, couvrant tous les cibles d'intérêt (30,6 kb couverts à 100%). Les cibles d'intérêt ont été sélectionnées à partir des résultats du séquençage de l'exome complet et filtrées selon les effets des variantes sur les gènes, les transcrits, les séquences protéiques et les régions régulatrices. Ces effets ont été calculés en utilisant les outils Ensembl VEP et SIFT (<https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>).

Les échantillons d'ADN (10 ng) ont été utilisés comme modèle pour préparer la bibliothèque. Le contrôle qualité de toutes les bibliothèques a été réalisé avec un Bioanalyzer Agilent en utilisant des puces à haute sensibilité. Les dilutions des modèles ont été calculées après que les concentrations des bibliothèques ont été normalisées à environ 100 pM en utilisant un kit Ion Library Equalizer Kit (Life Technologies). Les modèles de bibliothèque ont été amplifiés de manière clonale en

utilisant un système Ion OneTouch 2™, selon le protocole du fabricant. Les particules de sphère ioniques positives récupérées ont été enrichies selon les instructions du fabricant. Les échantillons ont été séquencés en utilisant des puces Ion 318 v2 sur le système Ion PGM ou des puces Ion 530 sur le système Ion S5XL (Thermo Fisher Scientific).

Les données ont été analysées avec le logiciel Torrent Suite v.5.2.2 (Thermo Fisher Scientific) en utilisant le génome de la souris mm10. L'appel de variantes a été effectué avec des paramètres optimisés et nous avons atteint une profondeur moyenne de 5000 pour chaque échantillon.

Séquençage ChIP-Seq

A) Préparation des échantillons pour le séquençage

Les cellules ont été traitées avec 1% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante pour réticuler les protéines et l'ADN. La réaction a été stoppée avec 125 mM de glycine pendant cinq minutes. Les cellules ont été collectées et lysées dans un tampon de lyse [HEPES/KOH 10mM pH 7.9, KCl 10mM, MgCl₂ 1,5mM, et cocktail d'inhibiteurs de protéase 1× (Sigma-Aldrich)]. Après centrifugation à 10 000×g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant contenant la chromatine a été récupéré. La chromatine a été fragmentée par sonication à 4°C à l'aide d'un Bioruptor 300 pour obtenir des fragments d'environ 200-400 pb, avec quinze cycles de 30 s ON/OFF au réglage le plus élevé.

Pour l'immunoprécipitation, 100 µL du surnageant de chromatine ont été incubés toute la nuit à 4°C sur une roue rotative avec des anticorps spécifiques contre les triméthylations H3K9 (Diagenode), H3K27 (Active Motif) ou H3K4 (Diagenode), en utilisant 0,25 µg d'anticorps pour une densité optique de 0,1 à 260 nm. Les expériences de contrôle incluaient l'utilisation d'une quantité équivalente d'IgGs de contrôle non spécifiques (Millipore). Un aliquot de la même quantité a été conservé comme échantillon d'entrée et stocké à -20°C jusqu'à purification.

Le lendemain, les complexes immuns ont été incubés avec 100 µL de billes magnétiques pendant trois heures à 4°C sous rotation. Les billes ont été lavées successivement avec un tampon de lavage à faible teneur en sel, un tampon de lavage à haute teneur en sel, et un tampon TE 1X pH 8,0. Après chaque lavage, les billes ont été centrifugées à 960×g pendant trois minutes à température ambiante. Après élimination du surnageant, les complexes immuns ont été élués avec 210 µL de tampon d'éluion (100 mM NaHCO₃, 1% SDS) et incubés pendant 15 minutes à 65°C avec agitation. Le matériel élué a été récupéré par centrifugation à 16 000×g pendant une minute à température ambiante.

Le matériel immunoprécipité a été élué à température ambiante dans le tampon d'éluion (100 mM NaHCO₃, 1% SDS), et les réactions de réticulation ont été inversées en ajoutant 100 mM de NaCl et en incubant à 65°C toute la nuit. Le matériel élué a ensuite été traité avec de la Q-Protéase (Qiagen) et de la RNase H pour éliminer les protéines et l'ARN, respectivement, et les fragments d'ADN génomique enrichis ont été purifiés selon le protocole Macherey Nagel (Kit Nucleospin Gel and PCR Clean up), élués dans 35 µL d'eau stérile et stockés jusqu'au séquençage.

B) Analyse ChIP-Seq

Les échantillons d'ADN ont été envoyés à GATC (Eurofins Genomics) pour le séquençage. Les bibliothèques de séquençage Illumina ont été préparées conformément aux normes ISO 17025, et appliquées sur une plateforme Illumina HiSeq 2500 pour un séquençage à double lecture de 50 pb garantissant un minimum de 30 Mb par échantillon. Les données de ChIP-Seq (fastq) sont accessibles publiquement via l'archive Sequence Read Archive (SRA) sous le numéro de bioproject PRJNA1054015.

L'analyse des données alignées a été réalisée en utilisant le workflow ChIP-Seq de Partek Genomics Suite (version PGS7.20.0831 pour Windows). Des méthodes standards ont été utilisées pour l'importation des données et l'évaluation du contrôle de qualité. La détection des pics a permis d'identifier des régions enrichies, englobant à la fois des loci génomiques nouveaux et connus, conduisant à l'identification de cibles potentielles.

1. Analyse sur puce de l'expression génique

L'extraction de l'ARN total a été réalisée à l'aide du kit RNeasy Mini (QIAGEN, Courtaboeuf, France) selon le protocole du fabricant, incluant un traitement supplémentaire à la DNase. Le rendement et la qualité de l'ARN total ont été évalués sur un Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies).

L'analyse de l'expression génique a été effectuée en utilisant des microarrays monocouleur Mouse 8x60k (074809_D_F_20150624, Agilent Technologies). Le marquage des cRNA, l'hybridation et la détection ont suivi les protocoles standards fournis par Agilent Technologies. Le cRNA marqué à la cyanine 3 a été synthétisé à partir de 50 ng d'ARN total en utilisant un kit de marquage QuickAmp pour faibles quantités, avec le RNA Spike-In servant de contrôle positif pour les étapes de marquage et d'amplification. Les cRNA marqués purifiés (600 ng chacun) ont été hybridés et lavés selon les instructions du fabricant, puis scannés sur un scanner Agilent G2505C.

L'extraction des données a été réalisée avec le logiciel Agilent Feature Extraction (FE version 10.7.3.1). Les données de microarray sont accessibles publiquement via le Gene Expression Omnibus (GEO) sous le numéro d'accèsion GSE250145. L'analyse statistique et le filtrage ont été effectués à l'aide du logiciel Genespring® version GX13.0 (Agilent Technologies).

2. Spectrométrie de masse (MS)

A) Préparation des échantillons

L'acétonitrile (ACN) de qualité *high-performance liquid chromatography* (HPLC), l'eau et l'acide trifluoroacétique (TFA) de qualité réactif analytique (AR) proviennent de Biosolve B.V. Le bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3), le DL-dithiothreitol (DTT), l'iodoacétamide (IAA), l'urée, l'acide trishydrochlorique (Tris-HCl) et le chlorure de sodium (NaCl) ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich. Le dodécylsulfate de sodium (SDS) a été acheté chez Bio-Rad, et l'acide formique (FA) de qualité AR a été acheté

chez Fluka. La thiourée a été obtenue chez Fluka, et l'urée provient de chez Euromedex. La trypsine modifiée de qualité séquençage de porc a été obtenue auprès de Promega (Trypsin Gold, Mass Spectrometry).

L'extraction et la digestion des protéines ont été réalisées selon des protocoles établis (Duhamel *et al.*, 2022). Les cellules ont été lysées dans un tampon contenant 4% de SDS et 100 mM de DTT dans 100 mM de Tris-HCl (pH 7,6), suivies de trois cycles de sonication de 30 secondes à 500 W et 20 kHz. Une centrifugation à 14 000×g pendant 10 minutes à température ambiante a ensuite été effectuée pour précipiter les débris cellulaires, et le surnageant contenant les protéines a été récupéré.

La méthode de préparation d'échantillons assistée par filtre (FASP, *Filter-Aided Sample Preparation*) a été utilisée en utilisant des filtres Amicon Ultra-0.5 mL de 10 kDa, suivant le protocole précédemment établi (Duhamel *et al.*, 2022). La digestion des protéines a été réalisée avec de la trypsine (Promega, Gold MS, qualité spectrométrie de masse) à une concentration de 20 µg/mL dans 50 mM de NH₄HCO₃, avec une incubation de nuit à 37°C. Les digests peptidiques ont ensuite été collectés par centrifugation, et les filtres ont été rincés avec 50 µL de NaCl 0,5M. Après ajout de 5% de TFA, les digests ont été désalinisés à l'aide de dispositifs Millipore ZipTip C18. La solution désalinisée a été séchée et reconstituée dans de l'eau contenant 0,1% d'acide formique et 2% d'acétonitrile, prête pour l'analyse LC-MS/MS.

B) Analyse LC-MS/MS

Les échantillons ont été analysés par chromatographie en phase inverse en ligne à l'aide d'un système Thermo Scientific Proxeon EASYnLC 1000. Le système était équipé d'une colonne de préconditionnement (Acclaim Pepmap, 75 μ m ID \times 2 cm, Thermo Scientific) et d'une colonne à pointe C18 (Acclaim PepMap, 75 μ m ID \times 50 cm, Thermo Scientific). La séparation des peptides a été réalisée avec un gradient d'acétonitrile (ACN) allant de 5% à 35% sur 120 minutes à un débit de 300 nL/min. L'éluent de la LC a été ionisé par électronébuliseur, directement depuis la colonne analytique, avec une tension appliquée à la source de nanospray de 1,7 à 2,6 kV.

Le système chromatographique était connecté à un spectromètre de masse Thermo Scientific Q Exactive, réglé pour fonctionner en mode d'acquisition dépendante des données, visant les 10 ions les plus intenses. Les scans de surveillance ont été effectués avec une résolution de 70 000 FWHM (m/z 400) en mode positif, avec un contrôle automatique du gain (AGC) cible de $3e6$. L'état de charge par défaut était réglé sur 2, avec les états non assignés et les états à charge unique exclus, et l'exclusion dynamique activée pour 20 secondes. La gamme de scan pour les scans de surveillance était de 300 à 1600 m/z . Pour l'analyse MS/MS dépendante des données (ddMS2), la gamme de scan était réglée de 200 à 2000 m/z , avec un microscan acquis à 17 500 Full width at half maximum (FWHM). Une fenêtre d'isolement de 4,0 m/z a été utilisée pour la sélection des ions précurseurs.

C) Analyse des data de MS

Toutes les données de MS ont été traitées avec le logiciel MaxQuant (version 1.5.6.5) en utilisant le moteur de recherche Andromeda. Les protéines ont été identifiées en recherchant les données de MS et de MS/MS contre la base de données *Mus musculus* (50306 séquences). La spécificité de la trypsine a été utilisée pour le mode de digestion, avec l'acétylation N-terminale et l'oxydation de la méthionine sélectionnées comme variables. La carbamidométhylation des cystéines a été définie comme une modification fixe, avec la possibilité de deux clivages manqués.

Pour les spectres de MS, une précision de masse initiale de six ppm a été sélectionnée, avec un minimum de deux peptides et au moins un peptide unique par protéine. La tolérance MS/MS a été réglée à 20 ppm pour les données HCD. Le taux de fausses découvertes (FDR, *false discovery rate*) pour les correspondances spectre-peptide (PSM, *peptide-spectrum match*) et l'identification des protéines a été fixé à 0,01. La quantification sans étiquetage (LFQ) des protéines a été effectuée en utilisant l'algorithme MaxLFQ intégré à MaxQuant avec les paramètres par défaut.

Les protéines identifiées ont été analysées plus en détail à l'aide du logiciel Perseus (version 15.6.0). Le fichier de données contenant les informations d'identification a été filtré pour éliminer les hits de la base de données inverse, les protéines identifiées uniquement avec des peptides modifiés et les contaminants potentiels. Les valeurs d'intensité LFQ ont été transformées logarithmiquement ($\log_2[x]$). L'annotation catégorique des lignes a été utilisée pour définir différents groupes de réplicats. Pour

l'analyse statistique, seules les protéines significatives selon le test de Student ont été considérées.

3. Analyse de l'enrichissement des voies Gene-Ontology (GO)

Le réseau d'interaction protéine-protéine (PPI) et les analyses de l'ontologie génique (GO) des protéines différentielles et des protéines associées aux gènes mutés ont été réalisés à l'aide de STRING version 10.0 (<http://string-db.org/>). Les analyses d'enrichissement des voies ont été visualisées sous forme de graphiques en bulles générés avec GraphPad Prism version 10.2.0.

4. Approches expérimentales fonctionnelles : mesures des propriétés physiques et modulation potentielle du cytosquelette

Les mesures d'impédance électrique ont été réalisées à l'aide d'un dispositif hybride micro-électromécanique (MEMS)/microfluidique fabriqué sur un wafer en silicium sur isolant, avec un processus à deux masques (Takayama *et al.*, 2018). Ce dispositif comprenait un canal microfluidique intégré avec des électrodes 3D en face de chaque côté pour les mesures électriques. Les propriétés électriques des cellules influençaient le courant passant entre les électrodes lorsqu'elles circulaient à travers le canal (Rezard *et al.*, 2021). Les mesures ont été effectuées avec un amplificateur à verrouillage de phase (HF2LI, Zurich Instruments) et un amplificateur transimpédance (gain de 1k, HF2TA, Zurich Instruments) utilisant un signal de conduite de 1-V_{rms}. Le débit était réglé à 3 µL/min, contrôlé par une pompe à pression (LineUpTM Push-Pull, Fluigent) connectée à la sortie.

Les variations des composants réel et imaginaire du courant, amplifiées pour obtenir une différence de potentiel, ont été enregistrées à mesure que chaque cellule passait entre les électrodes. Le traitement des données a été réalisé à l'aide d'un script Python personnalisé pour extraire la réponse de chaque cellule.

Pour tenir compte des variations potentielles des caractéristiques du dispositif, les réponses des cellules ont été normalisées par rapport à la réponse médiane des cellules parentales. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de tests t de Student.

5. Analyse de data publiques humaines

Les ensembles de données de séquençage d'ADN, de séquençage d'ARN et de CNV des échantillons de LAM humaine et de mélanome (Genomic Classification of Cutaneous Melanoma, 2015 ; Tyner *et al.*, 2018 ; Bottomly *et al.*, 2022 ; Ley *et al.*, 2013) sont disponibles dans les domaines publics cBioPortal (Cerami *et al.*, 2012 ; de Bruijn *et al.*, 2023 ; Gao *et al.*, 2013) et le portail de données « NIH National Cancer Institute GDC Data portal » Version 1.0.

RÉSULTATS

RESULTATS

I) Identification de gènes mutés significativement dans deux modèles murins de dormance tumorale de leucémie myéloïde et de mélanome

Afin de déterminer si la résistance thérapeutique émerge des cellules persistantes ou des cellules résiduelles de maladie minimale résiduelle (MRD) par le biais de mécanismes génétiques, nous avons d'abord comparé les résultats de séquençage complet de l'exome (WES) des cellules murines de dormance de mélanome et de leucémie (B16-F1GFP-D et DA1-3b/D365, respectivement) à ceux de leurs cellules parentales (B16-F1GFP-M et DA1-3b). Ce séquençage a mis en évidence 218 914 variants dans l'ensemble des échantillons, dont 22 602 variants après filtrage qualitatif de l'arrière-plan génétique normal.

L'utilisation de l'algorithme de prédiction Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) a permis d'identifier 190 gènes mutés de manière significative (SMG) (fichier supplémentaire 1 ; Tableau S1-a : accessible en ligne). Les SMG identifiés dans nos modèles murins comprenaient des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs bien connus pour le mélanome et la leucémie, à savoir *Muc4* (*mucin 4, cell surface associated*), *Pten* (*phosphatase and tensin homolog*), *Grin2a* (*glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A*) et *Dnmt3a*, *Npm1*, *Flt3* (Döhner *et al.*, 2022 ; Tazi *et al.*, 2022 ; Genomic Classification of Cutaneous Melanoma, 2015). Cela renforce les résultats obtenus par le WES.

Pour valider les SMG et suivre l'évolution des gènes porteurs de mutations pendant le processus de MRD, un séquençage ciblé a été réalisé à différents stades de la période de dormance, et ce dans les deux modèles. Dans le modèle murin de leucémie, le suivi des mutations a été effectué aux jours 60 et 365 de la dormance (cellules DA1-3b/D60 et DA1-3b/D365, respectivement). De même, les cellules de dormance de mélanome B16-F1 ont été analysées au jour 365 de la dormance (B16-F1GFP-D) et pendant la "génération" ultérieure dans un site cérébral dérivé des cellules (cellules B16-F1GFP-DB#1, #2 et #3).

À l'aide de diagrammes de Venn, nous avons représenté le nombre de gènes mutés partagés ou exclusifs en fonction de l'état de dormance ou de l'état parental, ainsi que du type de tumeur (Figure 21A). Bien qu'un nombre restreint de gènes portant des mutations (six gènes) sont communs entre les modèles de dormance du mélanome et de la leucémie (Figure 21A, B), un nombre significatif de mutations ont été découvertes dans les cellules de dormance des deux modèles de façon exclusive (Figure 21A, B).

Dans les cellules de dormance DA1-3b/D365, parmi les gènes mutés exclusivement dans l'état de dormance, nous avons observé 42 mutations résultant potentiellement de changements d'acides aminés (AA). Une mutation décalée d'une base et trois mutations non-sens ont été détectées dans les gènes *Pcpc1* (*Paraspeckle Protein 1*) (mutation M443X), *Tcf7l2* (*transcription factor 7 like 2*) (mutation R442*), *Chrm2* (*cholinergic receptor muscarinic 2*) (mutation Q358*) et *Atn1* (*atrophin 1*) (mutation Q153*). En ce qui concerne les gènes mutés exclusivement dans les cellules de dormance du mélanome B16-F1GFP-D, nous avons observé 34 mutations pouvant

entraîner des changements d'acides aminés, tandis que deux mutations non-sens ont été observées dans les gènes *Cars* (*cysteinyl-tRNA synthetase*) (mutation W416*) et *Stk40* (*serine/threonine kinase 40*) (mutation Q386*) (fichier supplémentaire 1, Tableau S1-a : accessible en ligne).

Plus précisément, environ 48% contre 6% des gènes séquencés présentaient exclusivement des mutations dans les cellules de dormance par rapport aux cellules parentales dans le mélanome. Dans les cellules leucémiques, ce ratio était d'environ 34% contre 17%. L'identification de divers gènes communs présentant des mutations à la fois dans les états de dormance et parental au sein de chaque modèle indique des caractéristiques moléculaires partagées (Figure 21B). Malgré cela, le statut de MRD pourrait préférentiellement sélectionner des clones avec des gènes mutés spécifiques (distincts entre nos deux modèles de dormance), ce qui confère une résistance potentielle contre le microenvironnement ou les thérapies. La présence de mutations géniques exclusives dans les cellules parentales dans les deux modèles suggère l'existence potentielle des clones dormants originaux parmi les homologues parentaux. En revanche, les mutations géniques exclusives dans les cellules de dormance peuvent indiquer deux scénarios potentiels : l'acquisition de mutations supplémentaires pendant le processus de MRD et/ou l'existence de mutations initiales dans les clones dormants préexistants qui n'ont pas été détectées techniquement par séquençage ciblé parmi les clones parentaux hétérogènes.

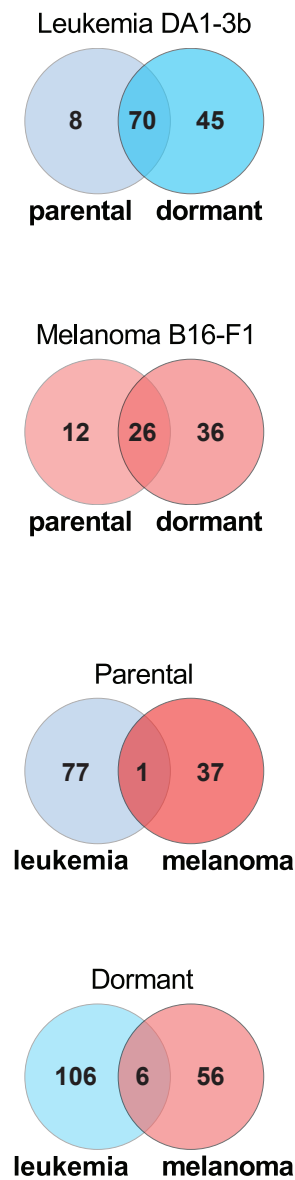
Pour évaluer la clonalité des mutations, la fréquence allélique (VAF) sert de mesure représentant la fraction d'allèles portant une altération génétique spécifique, agissant ainsi comme un marqueur de la clonalité des mutations (Boscolo Bielo *et al.*,

2023). La plupart des mutations détectées au sein des cellules dormantes dans les deux modèles présentaient des valeurs de VAF élevées (>50-100%), indiquant qu'une portion conséquente des cellules hébergeait des altérations génétiques ou des mutations spécifiques.

Lorsque nous avons examiné l'évolution génétique de la MRD, nous avons constaté que les cellules de dormance du mélanome B16-F1GFP-D présentaient des caractéristiques génétiques conservées, indépendamment de la durée de dormance/MRD. Les signatures de mutations génétiques dans la deuxième génération de cellules de dormance du mélanome (B16-F1GFP-DB#1, B16-F1GFP-DB#2 et B16-F1GFP-DB#3) étaient similaires à celles observées lors de l'analyse initiale de la dormance (B16-F1GFP-D). En revanche, dans le modèle de leucémie murine, des différences subtiles mais perceptibles dans le nombre de mutations géniques (neuf gènes) ont été identifiées entre le jour 60 et le jour 365 du processus de dormance (Figure 8B).

D'un point de vue évolutif génétique, il semble que la MRD dans le modèle de mélanome pourrait émerger d'une sélection de clones préexistants, tandis que dans le modèle de leucémie, les mutations pourraient survenir pendant la période de dormance.

A



B

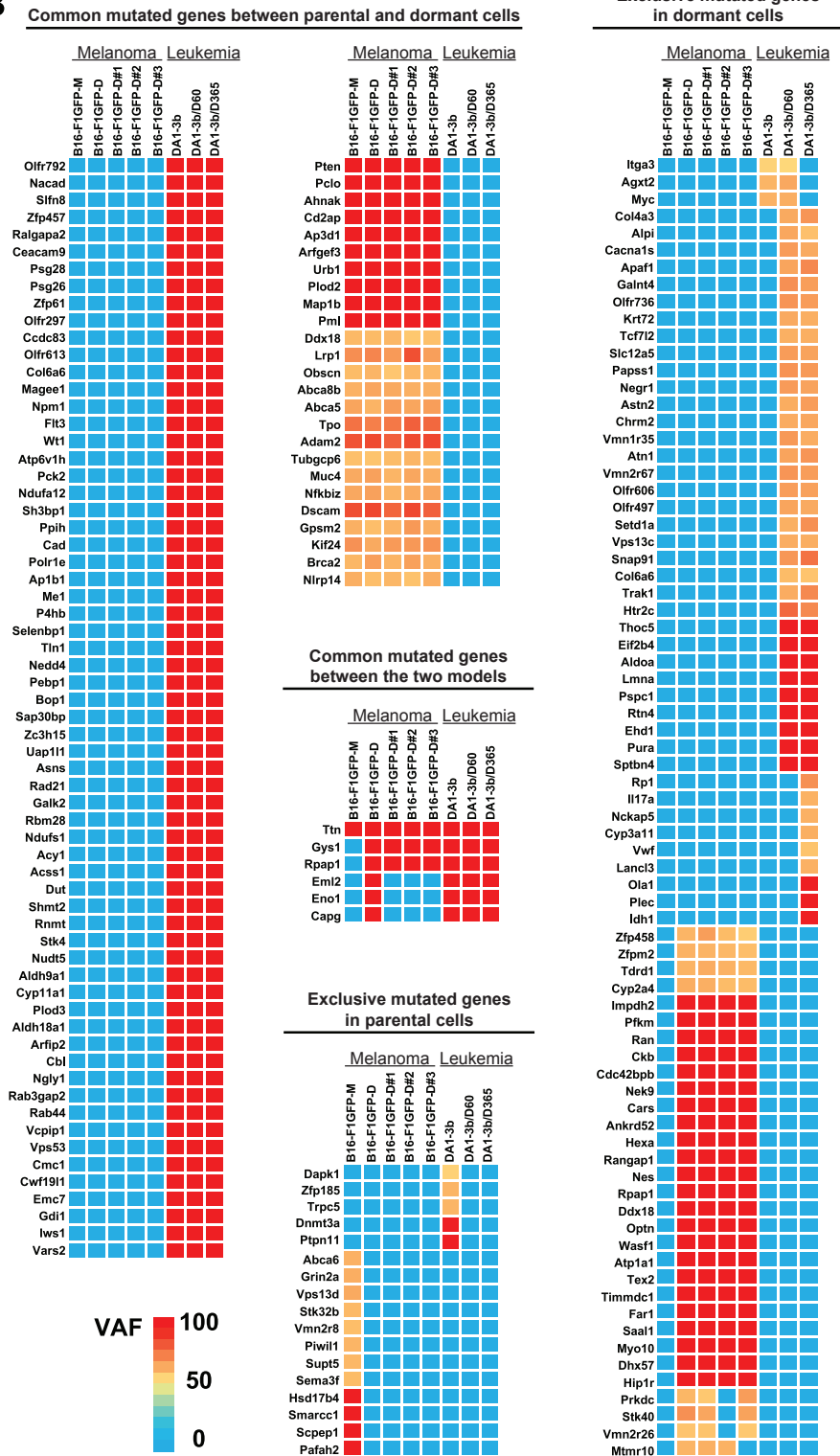


Figure 21 : Signatures génétiques des cellules parentales et de dormance du mélanome B16-F1 et des cellules leucémiques DA1-3b.

(A) Diagrammes de Venn illustrant le nombre de gènes communs ou exclusivement mutés selon l'état de dormance, l'état parental ou le modèle de tumeur. (B) Heatmaps montrant les gènes porteurs de mutations dans les cellules parentales et de dormance des modèles murins

de mélanome B16-F1 et de leucémie DA1-3b. Les couleurs dans les heatmaps correspondent à la fréquence allélique variant (VAF).

VI) L'analyse multi-omique des gènes mutés a révélé des implications génétiques potentielles pour le phénotype de dormance dans les modèles de leucémie et de mélanome.

Afin de mieux définir les signatures génétiques des cellules de dormance de nos deux modèles de MRD, nous avons analysé et intégré les résultats des analyses CGH (CNV), de CHIP-seq (modifications post-traductionnelles des histones) et des données d'expression génique transcriptomique (Figure 22 ; fichier supplémentaire 1, Tableau S1-b : accessible en ligne).

Bien que le schéma global de variation du nombre de copies (CNV) au niveau des bras chromosomiques n'ait pas différencié entre les cellules de dormance et parentales dans les deux modèles (Figure S1 en annexe), plusieurs segments focaux contenant des gènes porteurs de mutations ont présenté des amplifications, des suppressions ou aucune altération de CNV différente entre les deux conditions (statut parental et de dormance).

Dans notre analyse du modèle de leucémie DA1-3b, parmi les 70 gènes mutés de manière commune dans les cellules de dormance de leucémie DA1-3b/D365 et les cellules parentales DA1-3b, dix gènes ont été amplifiés dans les deux types cellulaires, à savoir : *Ttc7b* (*Tetratricopeptide Repeat Domain 7B*), *Dnmt3b*, *Ap1b1* (*AP-1 Complex Subunit Beta-1*), *Ne1* (*hybrid necrosis gene 1*), *Nedd4* (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4*), *Acy1* (*aminoacylase 1*), *Cyp11a1*

(*cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1*), *Htr2c* (*5-hydroxytryptamine receptor 2C*), *Magee1* (*MAGE family member E1*) et *Gdi1* (*GDP dissociation inhibitor 1*) (Figure 22A). Par ailleurs, une perte de CNV a été observée pour *Magee1* et *Gdi1*, indépendamment du statut parental ou de dormance des cellules. Pour 55 gènes mutés, aucune amplification ou suppression de CNV n'a été observée dans les cellules de leucémie, qu'elles soient de dormance ou parentales.

Ces observations soulignent l'impact limité de la dormance tumorale sur le CNV pour ces gènes mutés spécifiques.

En revanche, nous avons identifié des altérations de CNV de plusieurs gènes mutés selon le statut de dormance ou parental des cellules leucémiques, ce qui signifie une signature génétique spécifique des cellules de dormance. Par exemple, les gènes fréquemment mutés *Aldh18a1* (*aldehyde dehydrogenase 18 family member A1*) et *Cwf19l1* (*CWF19 like cell cycle control factor 1*) ont montré une amplification de CNV exclusivement dans les cellules parentales, tandis que *Vars2* (*valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial*) et *Eno1* (*enolase 1*) ont montré une amplification exclusive dans les cellules de dormance et une perte de CNV dans les cellules parentales, respectivement. Parmi les gènes exclusivement mutés dans les cellules de dormance DA1-3b/D365, quatre gènes ont été amplifiés, à savoir : *Trak1* (*trafficking kinesin protein 1*), *Prps1l1* (*phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 like 1*), *Thoc5* (*THO complex subunit 5*) et *Ehd1* (*EH domain containing 1*). Trois gènes partagés par les cellules parentales et de dormance ont été délétés : il s'agit de *Lancl3* (*LanC like family member 3*), *Fam3a* (*FAM3 metabolism regulating signaling molecule A*) et *Htr2c* (*5-hydroxytryptamine receptor 2C*). De plus, les gènes *Tcf7l2* et *Aldoa* (*aldolase*) ont présenté une amplification de CNV exclusivement dans les cellules parentales, tandis

que les gènes *Vps13c* (*vacuolar protein sorting 13 homolog C*) et *Snap91* (*synaptosome associated protein 91*) étaient exclusivement amplifiés dans les cellules de dormance. Enfin, pour les gènes exclusivement mutés dans les cellules parentales de DA1-3b, deux gènes (*Zpf185* (*zinc finger protein 185*) et *Trpc5* (*transient receptor potential cation channel subfamily C member 5*)) ont montré des délétions à la fois dans les cellules parentales et de dormance. Dans l'ensemble, l'analyse intégrative de plusieurs gènes mutés de façon commune ou exclusive, avec des altérations de CNV différentielles selon le statut de dormance ou parental des cellules leucémiques, nous a permis de mettre en évidence les processus génétiques (schéma de mutation et CNV) pour un sous-ensemble de gènes dans le contexte de la dormance tumorale ou de la MRD.

Lorsque nous avons réalisé le séquençage complet de l'exome pour identifier les variants, nous avons constaté qu'à l'exception des mutations entraînant un codon stop, les mutations identifiées et filtrées n'étaient pas associées à des séquences régulatrices et n'étaient donc pas directement liées à la régulation de l'expression génique. **En revanche, la description de la signature de CNV des gènes mutés dans les cellules leucémiques de dormance pourrait avoir un impact significatif sur l'expression génique.**

Pour mieux comprendre l'impact fonctionnel de la signature génétique (mutations et CNV) dans le processus de MRD et découvrir les mécanismes régulateurs gouvernant l'expression des gènes mutés, nous avons réalisé des analyses supplémentaires concernant les schémas épigénétiques, combinées aux données d'expression génique transcriptomique. En ce qui concerne la signature

épigénétique parmi les gènes mutés dans le modèle de leucémie, nous nous sommes concentrés sur les modifications post-traductionnelles des histones telles que la triméthylation de H3K4, H3K9 et H3K27 (-me3) qui reflètent respectivement la transcription génique active (H3K4) et répressive (H3K9 et H3K27) (Zaib *et al.*, 2022). Le plus grand enrichissement des modifications épigénétiques de H3K4me3 a été observé pour les gènes mutés partagés par les cellules parentales et de dormance. Parmi les gènes exclusivement mutés dans les cellules de dormance DA1-3b/D365, 40% (18 sur 45) étaient enrichis en modifications de H3K27me3, un motif conservé à la fois dans les cellules de dormance et parentales. En revanche, pour les gènes qui étaient exclusivement mutés dans les cellules parentales DA1-3b, 50% (4 sur 8) affichaient des marques d'histones répressives H3K27me3, tandis que les gènes restants présentaient un motif actif H3K4me3. Comme les marques d'histones sont étroitement liées à la régulation de l'expression génique, nous avons examiné l'expression génique transcriptomique et avons observé sa variabilité parmi les gènes mutés principalement en fonction du motif épigénétique correspondant. Comme prévu, 26 sur 36 et 7 sur 11 des gènes mutés enrichis en H3K27me3 et H3K9me3 respectivement, n'ont montré aucune transcription ARN, tandis que seuls 2 sur 81 des gènes mutés enrichis en marques actives H3K4me3 n'ont montré aucune expression génique transcriptomique (Figure 22A).

De façon remarquable, dans les cellules de dormance DA1-3b/D365, les gènes mutés dont l'expression était la plus forte comparée à celle des cellules parentales incluaient *Nudt5* (*nudix hydrolase 5*), *Shmt2* (*serine hydroxymethyltransferase 2*), *Asns* (*asparagine synthetase*), *Pck2* (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial*), *Eno1*, *Npm1* et *Bop1* (*BOP1 ribosomal biogenesis factor*). Les cinq

premiers gènes sont connus pour leur implication dans les voies métaboliques. Les gènes mutés surexprimés *Thoc5*, *Eif2b4* (*eukaryotic translation initiation factor 2B subunit delta*) et *Ola1* (*Obg like ATPase 1*) ont été trouvés exclusivement dans les cellules de dormance DA1-3b/D365. En revanche, parmi les gènes exclusivement mutés dans les cellules parentales DA1-3b, *Ptpn11* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11*) et *Dapk1* (*death associated protein kinase 1*) étaient les gènes les plus fortement exprimés (Figure 22A). **Bien que l'expression des gènes mutés puisse avoir un impact sans surexpression, ces gènes mutés surexprimés étaient principalement non liés à des gains ou pertes de CNV, mettant en évidence un mécanisme complexe supplémentaire ou des mécanismes combinés non génétiques et génétiques contribuant au phénomène de la maladie résiduelle.**

Une approche multi-omique similaire a été réalisée avec les gènes mutés identifiés dans notre modèle murin de MRD de mélanome. Parmi les 26 gènes mutés partagés dans les cellules B16-F1GFP-D et B16-FGFP-M, deux gènes (à savoir *Ddx18* (*DEAD-box helicase 18*) et *Tubgcp6* (*tubulin gamma complex component 6*)) ont été amplifiés à la fois dans les cellules parentales et de dormance (Figure 22B). Une perte de CNV a été observée pour certains gènes dans les cellules parentales et de dormance ; il s'agit de *Adam2* (*ADAM metallopeptidase domain 2*), *Dscam* (*Down Syndrome cell adhesion molecule*), *Kif24* (*kinesin family member 24*) et *Ahnak* (*desmoyokin*). Aucune altération génomique n'a été révélée dans les cellules de dormance ou parentales du mélanome pour 18 gènes mutés courants, y compris des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *Pten*, *Brca2* (*Breast Cancer 2*) ou *Pml* (*promyelocytic leukemia nuclear body scaffold*). **Comme observé**

pour le modèle de MRD de leucémie, nos résultats ont révélé un impact minimal de la dormance du mélanome sur le CNV pour ces gènes mutés particuliers.

En revanche, les deux gènes mutés *Lrp1* et *Ap3d1* partagés à la fois par les cellules de dormance et parentales ont présenté des délétions de CNV exclusivement dans les cellules de dormance. Parmi les gènes exclusivement mutés dans les cellules de dormance B16-F1GFP-D, huit gènes ont été amplifiés : *Zfpm2* (*zinc finger protein, multitype 2 protein*), *Vmn2r26* (*vomeronasal 2, receptor 26*), *Pfkm* (*phosphofructokinase*), *Ckb* (*creatine kinase B*), *Cdc42bpb* (*CDC42 binding protein kinase beta*), *Capg* (*capping actin protein, gelsolin like*), *Rangap1* (*Ran GTPase activating protein 1*) et *Tex2* (*testis expressed 2*). Trois gènes partagés par les cellules parentales et de dormance ont été délétés : *Stk40*, *Yars* (*tyrosyl-tRNA synthetase*) et *Eno1*. De plus, *Wasp1* (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein 1*) a affiché une délétion de CNV exclusive dans les cellules de dormance. En ce qui concerne les gènes qui étaient exclusivement mutés dans les cellules parentales B16-F1GFP-M, trois gènes ont été délétés à la fois dans les cellules parentales et de dormance : *Vps13d* (*vacuolar protein sorting 13 homolog D*), *Hsd17b4* (*hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4*) et *Pafah2* (*platelet activating factor acetylhydrolase 2*). **Comme observé dans le modèle de leucémie, l'identification de plusieurs gènes mutés, combinée à des altérations de CNV différentielles selon le statut de dormance ou parental, a mis en évidence l'implication génétique sous-jacente au contexte de la MRD.**

Ensuite, nous avons adopté une stratégie similaire pour le modèle de mélanome et avons effectué des analyses supplémentaires concernant les schémas épigénétiques combinés à l'expression génique transcriptomique. Le plus grand

enrichissement des modifications épigénétiques de H3K4me3 a été observé avec 17 gènes mutés partagés par les cellules parentales et de dormance. Parmi les gènes exclusivement mutés dans les cellules de dormance B16-FGFP-D, 8% (3 sur 36) étaient enrichis en modifications de H3K9me3, un schéma conservé dans les deux lignées cellulaires. En revanche, pour les gènes exclusivement mutés dans les cellules parentales DA1-3b, 30% (4 sur 13) présentaient des codes d'histones répressives H3K9me3, tandis que les gènes restants affichaient des marques actives H3K4me3. Comme prévu, 13 des 15 gènes mutés enrichis avec le code épigénétique répressif H3K9me3 ne présentaient aucune expression génique transcriptomique. En comparaison, seul un des 56 gènes mutés enrichis avec la marque active H3K4me3 n'était pas détecté (Figure 22A).

Dans l'ensemble, bien que les profils globaux de CNV et/ou épigénétiques étaient essentiellement identiques entre les cellules de dormance et parentales dans les modèles de leucémie et de mélanome, l'identification de signatures spécifiques de gènes mutés dans les cellules de dormance associées à un schéma de CNV différentiel peut mettre en lumière les mécanismes génétiques sous-jacents au phénomène de MRD. L'impact fonctionnel des gènes mutés identifiés et/ou la régulation de leur expression façonneraient alors le phénotype des cellules de dormance dans les deux modèles de MRD. Si la dormance tumorale implique une implication génétique équivalente dans les deux modèles, c'est-à-dire des gènes mutés non identiques mais plutôt une signature multi-omique similaire, nous avons toutefois observé une différence significative dans le pourcentage de gènes mutés exprimés exclusivement dans

les cellules de dormance : 89% contre 56% respectivement en leucémie et en mélanome.

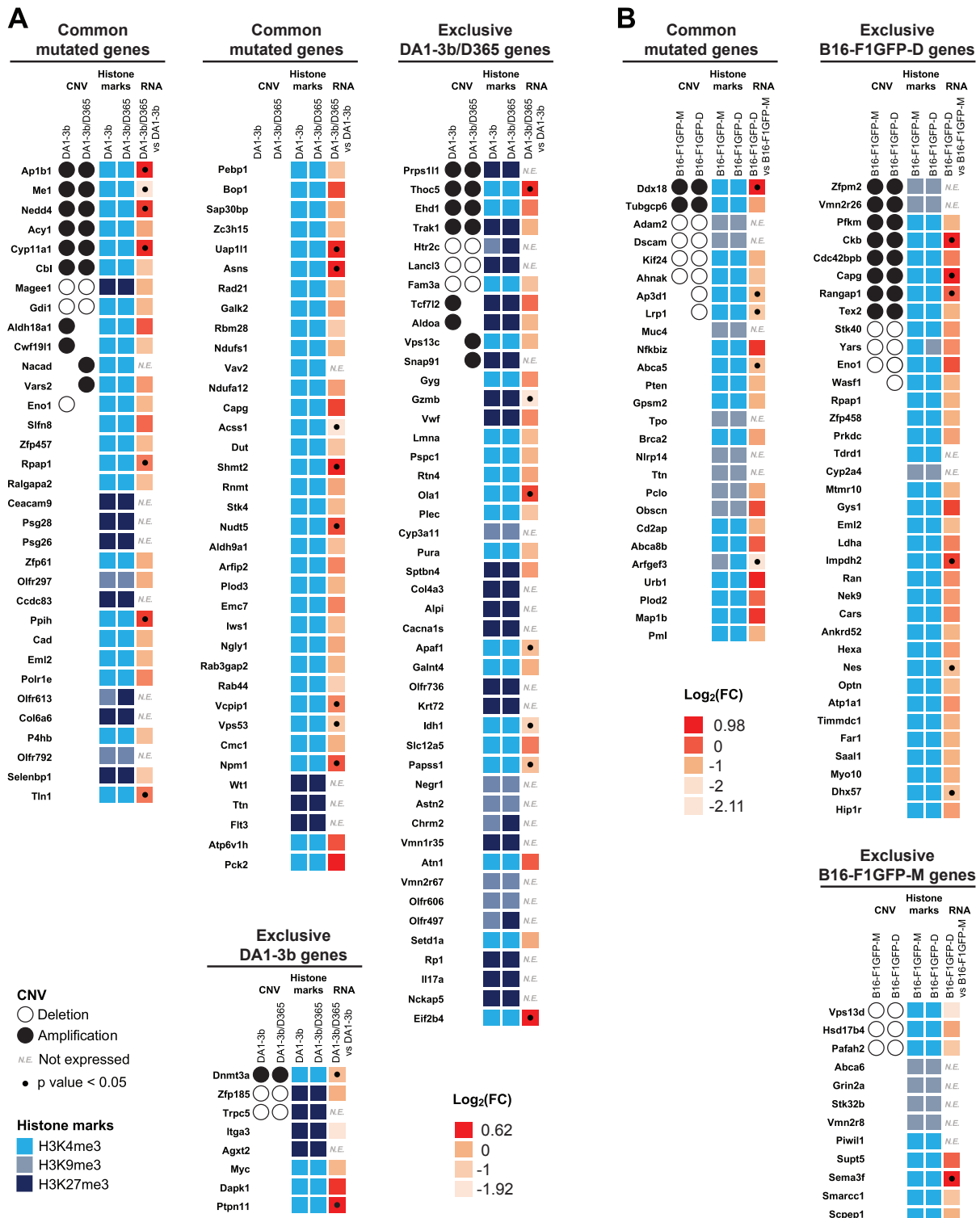


Figure 22 : Heatmaps des résultats des analyses de CNV, de marques d'histone et d'expression transcriptomique des gènes mutés de la MRD.

Les résultats de CGH sont représentés par un cercle noir pour l'amplification ; les suppressions sont indiquées par un cercle vide. Les codes épigénétiques actifs H3K4me3 sont représentés en bleu vif, H3K9me3 en gris-bleu et H3K27me3 en bleu marine. L'expression génique transcriptomique est représentée par un dégradé de couleur relatif à Log₂ (fold change) variant graduellement de l'orange clair au rouge pour une expression plus élevée. Le fold change représente l'expression génique différentielle entre les conditions de cellules de dormance et parentales. Les valeurs transcriptomiques significatives ($p < 0,05$) sont indiquées par un point. Chaque expérience a été répétée 3 fois. (A) Heatmap du modèle leucémique DA1-3b. (B) Heatmap du modèle de mélanome B16-F1.

VII) Les gènes mutés sont impliqués dans des voies de signalisation

Dans nos modèles d'étude, nous avons d'abord défini l'ontologie génique (GO) en fonction des fonctions moléculaires, des voies biologiques et des composants cytologiques associés aux produits géniques. En menant une analyse d'enrichissement GO, nous avons cherché à élucider comment les gènes présentant des mutations dans les cellules parentales et de dormance des modèles de MRD sont fonctionnellement liés.

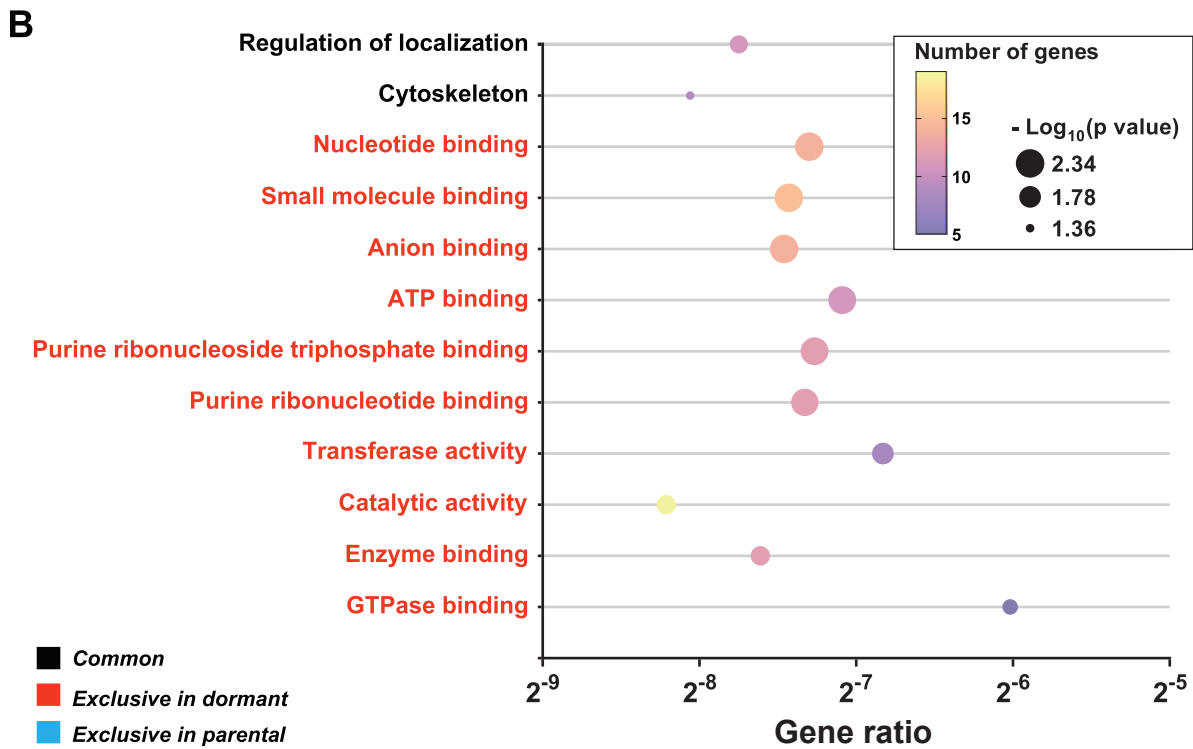
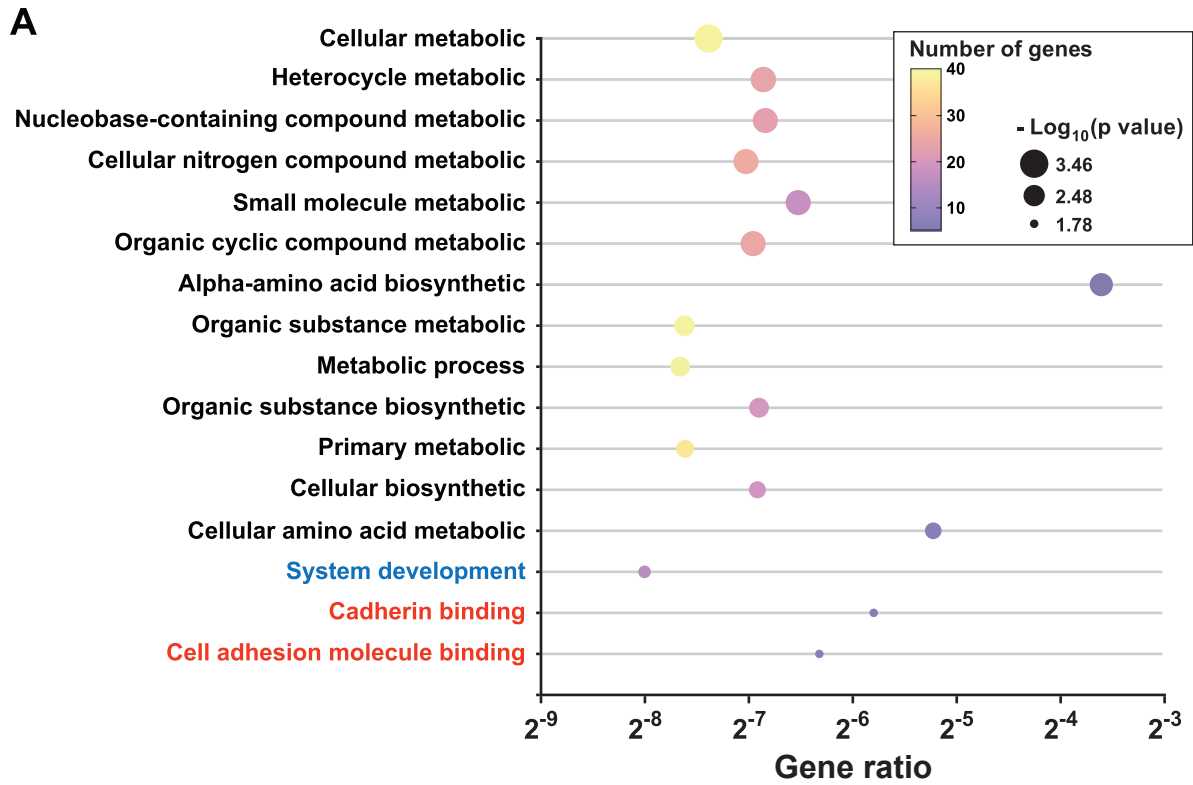
Nos résultats ont révélé 12 termes significativement enrichis pour les gènes mutés couramment dans les cellules leucémiques parentales, et deux dans les cellules de mélanome parentales. De plus, seuls les gènes présentant des mutations dans les cellules de dormance étaient significativement enrichis dans deux et neuf voies dans les modèles DA1-3b/D365 et B16-F1GFP-D, de façon respective. Fait intéressant, aucun enrichissement n'a été observé parmi les gènes exclusivement mutés dans les

cellules parentales de mélanome, à l'exception d'un terme GO significatif dans les cellules homologues de leucémie DA1-3b (Figure 23A, B).

Les gènes exclusivement mutés dans les cellules DA1-3b/D365 étaient enrichis dans des fonctions biologiques telles que "liaison aux cadhérines" et "liaison aux molécules d'adhérence cellulaire". Les gènes exclusivement mutés dans les cellules B16-F1GFP-D étaient enrichis dans diverses fonctions biologiques, notamment "liaison aux petites molécules", "liaison aux nucléotides", "activité catalytique" et "liaison enzymatique".

Figure 23 : Bubble plots de l'analyse d'enrichissement des voies avec les gènes mutés de MRD dans les modèles DA1-3b (A) et B16-F1 (B).

Les voies sont classées (couleurs noir, rouge et bleu) en fonction des gènes mutés communs et exclusifs dans les cellules de dormance et parentales. Le nombre de gènes indique le nombre de gènes mutés enrichis dans la voie (gradient de couleur plasma). Le "Ratio de gènes" indique le ratio de gènes mutés enrichis par rapport aux gènes de fond. La taille de la bulle est proportionnelle à la valeur de p (échelle -Log10) de l'enrichissement de la voie.



VIII) Correspondance entre la « signature génique murine mutée de la MRD » et les pathologies humaines de leucémie et de mélanome

Pour déterminer chez l'homme l'implication possible des gènes mutés à travers nos modèles murins de MRD, nous avons analysé la fréquence des mutations dans ces gènes dans la leucémie myéloïde aiguë (LAM) humaine et les tumeurs de mélanome primaire et métastatique. Les résultats ont été extraits de plusieurs cohortes de patients (n=207 pour les patients atteints de LAM et n=489 pour les patients atteints de mélanome) dans des ensembles de données publiques (portail GDC) combinant des données de séquençage d'exomes. Les fréquences des gènes mutés dans les échantillons humains parmi les gènes trouvés mutés dans les modèles murins de leucémie (Figure 24A) ou de mélanome (Figure 24B) ont été notées (Fichier supplémentaire 1, Tableau 1-c : accessible en ligne).

Seules les données correspondant au diagnostic de LAM ont été documentées. Parmi les gènes exclusivement mutés dans le modèle de dormance, seul le gène *IDH1* était fréquemment muté (10,63%) dans les échantillons humains de LAM, tandis que les autres gènes étaient soit mutés à une faible fréquence (moins de 1,5%), soit pas du tout (Figure 4A). Bien que plusieurs gènes (40 gènes) identifiés parmi les gènes couramment mutés dans les cellules murines de dormance et parentales ne soient pas affectés génétiquement dans la LAM humaine, un nombre conséquent de gènes (21 gènes) présentait des mutations, dont 6 gènes avec des fréquences modérées à élevées. Comme attendu, les gènes les plus fréquemment mutés étaient *DNMT3A* (19,32%) et *NPM1* (20,29%), suivis de *FLT3* (13,53%), ce qui est cohérent avec le

profil des mutations de la LAM (Döhner *et al.*, 2022) comme indiqué dans le fichier supplémentaire 1, (Tableau 1-d), renforçant la pertinence de notre modèle de leucémie DA1-3b pour de futures applications translationnelles chez l'homme. De plus, *PTPN11* (6,76%) était l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans les échantillons de LAM humaine et était également exclusivement muté dans le modèle parental murin. Dans la littérature, *PTPN11* est notamment décrit pour son rôle significatif dans le développement de la leucémie, où ses mutations peuvent entraîner une hyperactivation, provoquant la prolifération des cellules leucémiques, la résistance à la thérapie et la survie (Tartaglia *et al.*, 2006).

De manière intéressante, malgré l'absence de correspondance concernant les mutations dans la LAM humaine, l'analyse des CNV a révélé que plusieurs gènes mutés exclusivement dans les cellules de dormance ou bien dans les deux conditions étaient soit amplifiés, soit supprimés dans la LAM humaine. En effet, *PURA* (*purine rich element binding protein A*) (16,35%), *CHRM2* (*Cholinergic Receptor Muscarinic 2*)(23,08%), *NACAD* (*NAC alpha domain containing*) (16,35%), *PLOD3* (*procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3*) (18,27%), *ASNS* (17,31%), *VPS53* (*vacuolar protein sorting 53*) (13,46%) et *RBM28* (*RNA binding motif protein 28*) (24,04%) étaient particulièrement altérés avec un gain de CNV. En revanche, les gènes *PLEC* (*plectin*) (25,96%), *RP1* (*retinitis pigmentosa 1*) (26,92%), *RAD21* (*kleisin 21*) (27,88%), *BOP1* (*block of proliferation 1 ribosomal biogenesis factor*) (25,96%), *ATP6V1H* (*ATPase H⁺ transporting V1 subunit H*) (26,92%) et *VCPIP1* (*valosin containing protein interacting protein 1*) (26,92%) étaient fortement associés à une perte de CNV. **De façon remarquable, les altérations de CNV de ces gènes particuliers chez les patients**

atteints de LAM humaine – y compris au moment du diagnostic – ont renforcé l'impact de ces signatures géniques de "dormance".

Nous avons ensuite exploré les fréquences de mutation des "gènes MRD murins" dans des échantillons de mélanome humain à toutes les conditions, y compris les stades de tumeur primaire et métastatique. Dans l'ensemble, une tendance similaire a été observée indépendamment de la condition (tumeurs primaires et mélanomes métastatiques). Les gènes les plus fréquemment mutés dans le mélanome humain étaient ceux mutés dans les cellules murines parentales et de dormance (gènes communs), avec des taux de mutation allant jusqu'à 80% pour *TTN (titin)*, suivi de *PCLO (piccolo presynaptic cytomatrix protein)* (> 52%), *DSCAM* (environ 40%) et *OBSCN (obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF)* (environ 34%). *GRIN2A* a suivi parmi les gènes exclusifs des cellules parentales (environ 32%). Ces gènes sont fréquemment mutés dans le mélanome humain, renforçant la pertinence de notre modèle murin B16-F1. De manière intéressante, plusieurs gènes exclusivement mutés dans les cellules de dormance murines présentaient des fréquences de mutation modérées à élevées dans le mélanome humain ; c'est le cas de *ZFPM2*, *PRKDC (protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit)*, *TDRD1 (tudor domain containing 1)*, *NES (nestin)*, *CDC42BPBD (CDC42 binding protein kinase beta)* et *DHX57 (Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57)*.

Bien que la fréquence de mutation n'ait pas varié en fonction du stade de la maladie, les résultats étaient largement similaires pour les gains et les pertes de CNV. Cependant, un nombre substantiel de gènes semblait se démarquer. Dans le contexte des gains de CNV, des gènes exclusivement mutés dans les cellules de dormance tel

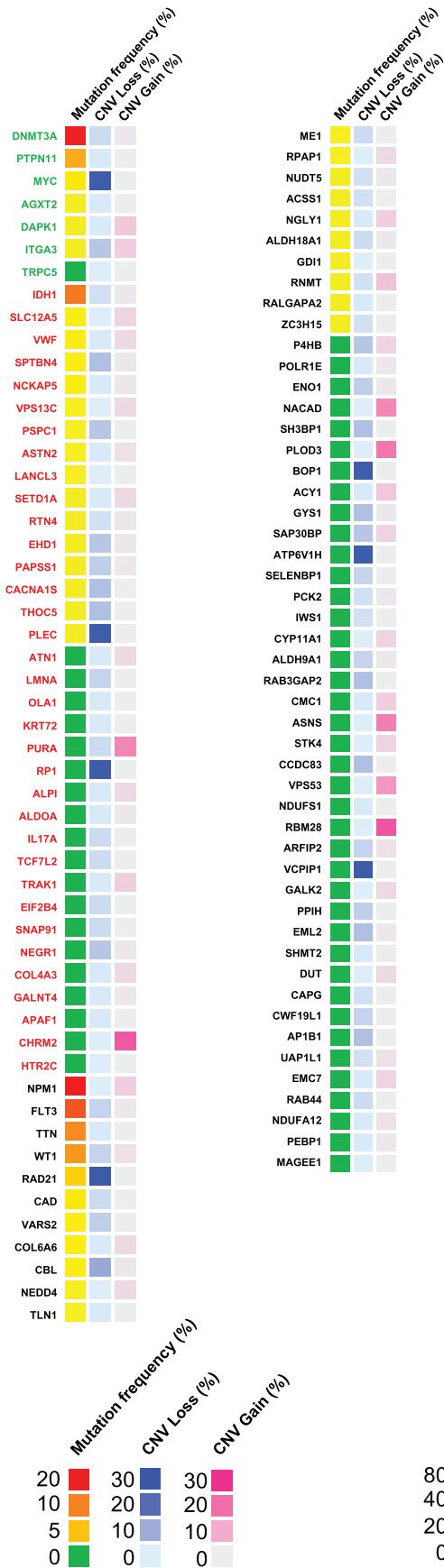
que *TEX2* montraient une diminution des CNV dans le stade métastatique, tout comme *RANGAP1* (perte de 15%). En revanche, *STK40* a montré une fréquence augmentée dans les métastases (30,5%). Des gènes couramment mutés, tels que *AP3D1* (*adaptor related protein complex 3 subunit delta 1*), ont présenté une disparité prononcée, avec un pourcentage nettement plus élevé observé dans les tumeurs primaires (38% vs 8% dans le stade métastatique). Dans le contexte des pertes de CNV, l'analyse a révélé des schémas remarquables pour les "gènes MRD murins". *STK40* a présenté une disparité, en augmentant dans les tumeurs primaires (53,08%), tout comme *RAN* (*RAN, member RAS oncogene family*) (49,66%). En revanche, *ENO1* a montré une augmentation conséquente (51,72%) dans les métastases, tout comme *ANKRD52* (*ankyrin repeat domain 52*) (47,48%). **Ces résultats soulignent la diversité des gains et des pertes de CNV dans les "gènes MRD murins".**

Si l'analyse au stade métastatique ne reproduit pas parfaitement la signature MRD dans le mélanome humain, elle permet de mettre en évidence des schémas génétiques de cellules ayant survécu au traitement anticancéreux et/ou dans différents microenvironnements par rapport à ceux des tumeurs primaires. Bien que la signature de mutation des "gènes MRD murins" ne soit pas clairement enrichie dans les métastases de mélanome humain, **cette analyse a révélé que pour quelques gènes, les altérations de CNV associées étaient corrélées au stade métastatique de la maladie.**

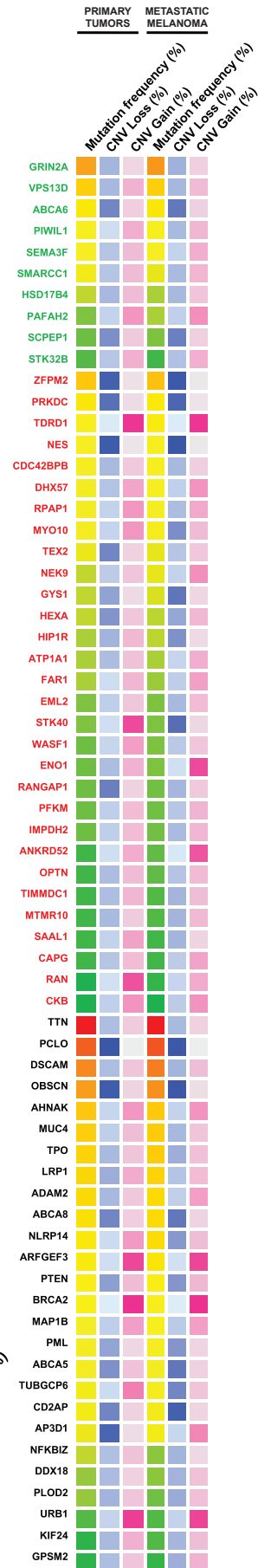
Figure 24 : Heatmaps des "gènes MRD" correspondant aux profils génétiques chez les patients atteints de LAM humaine (A) et de mélanome (B).

Les fréquences des gènes mutés et des CNV associées (perte et gain) sont exprimées en pourcentage et reflètent le nombre de patients affectés parmi l'ensemble des patients des cohortes de patients atteints de LAM et de mélanome correspondantes (n = 207, n = 489 pour la LAM et le mélanome, respectivement). Les valeurs sont représentées par un gradient de couleur distinct. Pour les échantillons de mélanome humain, les résultats sont représentés selon le stade de progression de la maladie, c'est-à-dire les tumeurs primaires ou métastatiques. Les données ont été extraites du portail GDC (Institut NIH) domaine public version 1.0. Dans la liste indiquée, les gènes couramment mutés sont indiqués en lettres noires, les gènes exclusifs aux cellules de dormance sont indiqués en lettres rouges, et les gènes exclusifs aux cellules parentales sont affichés en lettres vertes.

A Acute Myeloid Leukemia Patient cohort



B Melanoma Patient cohort



IX) L'expression protéique différentielle dans les cellules de dormance de leucémie DA1-3b/D365 met en lumière un processus dominant distinct non génétique dans la MRD.

Puisque l'impact fonctionnel de la signature génétique indiquée par l'expression des gènes mutés n'a pas pu définir le phénotype exclusivement dormant des cellules, nous avons mené une analyse de la signature protéomique des cellules leucémiques de dormance pour mettre en évidence une éventuelle expression protéique différentielle et exclusive. Nous nous sommes demandé quelles protéines étaient dérégulées dans les cellules de dormance, et si les gènes mutés identifiés étaient exprimés au niveau protéique de manière différentielle.

La spectrométrie de masse a donc été utilisée pour analyser les variations d'expression protéique dans les cellules de dormance de leucémie DA-1b/D365. Un total de 2182 protéines a été identifié, dont 118 protéines présentaient des différences significatives dans les niveaux d'expression ($p < 0.01$) entre les cellules DA1-3b/D365 et les cellules DA1-3b. 26 protéines étaient exprimées uniquement dans les cellules parentales, tandis que 25 protéines étaient exclusivement détectées dans les cellules de dormance (Figure 25A ; Fichier supplémentaire 1, Tableau S1-e : accessible en ligne). Parmi les 118 protéines présentant une expression altérée, 56 étaient surexprimées, tandis que 63 étaient sous-exprimées spécifiquement dans les cellules de dormance (Figure 25B ; Fichier supplémentaire 1, Tableau S1-e : accessible en ligne).



Figure 25 : Analyse de l'expression protéique différentielle dans les cellules de dormance de leucémie DA1-3b par rapport à leurs cellules parentales.

(A) Diagrammes de Venn illustrant le nombre de protéines communément dérégulées et exclusives selon l'état de dormance ou parental des cellules de leucémie DA1-3b. Un seuil de signification de $p < 0.05$ a été utilisé pour le test t de Student avec le logiciel Perseus. (B) Heatmaps illustrant les protéines surexprimées (gradient de couleur rouge) et sous-exprimées (gradient de couleur verte) dans les cellules de leucémie DA1-3b/D365 par rapport à leurs cellules parentales. Les résultats sont exprimés en quantification sans étiquette (LFQ) des protéines. L'intensité LFQ a été soumise au logarithme 2 ($\log_2[x]$). Trois expériences indépendantes ($n=3$) ont été réalisées, et les LFQ résultantes sont présentées.

Afin de mieux définir la signature protéomique des cellules leucémiques de dormance, nous avons réalisé une analyse multi-omique combinant les données de CGH, de modification épigénétique et d'expression génique transcriptomique. Notre objectif était de déterminer comment les mécanismes génétiques ou non génétiques façonnent les mécanismes sous-jacents conduisant à la signature/phénotype dormant.

Parmi les protéines surexprimées dans les cellules de dormance, 7 des 56 gènes ont montré une amplification à la fois dans les cellules parentales et de dormance, tandis que sept gènes étaient exclusivement amplifiés dans les cellules parentales. Les 42 gènes correspondants restants n'étaient ni amplifiés ni supprimés. De plus, seul *Psdm10* présentait une délétion à la fois dans les cellules parentales et de dormance. En ce qui concerne les protéines sous-exprimées dans les cellules de dormance, huit protéines présentaient une amplification dans les deux lignées cellulaires, avec neuf exclusivement amplifiées dans les cellules parentales et deux uniquement dans les cellules de dormance. Les 53 gènes correspondants restants ne présentaient aucune altération génomique. À l'exception des neuf gènes exclusivement amplifiés dans les cellules parentales, le modèle de variation du CNV entre les cellules de dormance et parentales n'expliquait pas l'expression protéique différentielle.

Ces observations mettent en lumière les possibles mécanismes non génétiques sous-jacents à la signature protéomique dérégulée des cellules de dormance de leucémie (Figure 26A).

Nous avons ensuite réalisé une analyse des modifications épigénétiques H3K4me3, H3K9me3 et H3K27me3. Nous avons constaté une prévalence marquée de la modification H3K4me3 dans les cellules de dormance et parentales. Seulement quatre gènes ont montré un enrichissement du code répressif H3K27me3. Parmi les protéines surexprimées dans les cellules de dormance, 22 ont montré une transcription ARN significativement augmentée. Plus précisément, parmi les protéines surexprimées montrant une expression transcriptomique significativement accrue dans les cellules de dormance, les protéines suivantes étaient remarquables : THOC5, PPIH (*peptidylprolyl isomerase H*), CRYZL1 (*crystallin zeta like 1*), PURB (*purine rich element binding protein B*), AP1B1, TTN1, NEDD4, ABCE1 (*ATP binding cassette subfamily E member 1*), DTYMK (*deoxythymidylate kinase*), UAP1L1 (*UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 like 1*), ASNS, TPM4 (*tropomyosin 4*), ILKAP (*ILK associated serine/threonine phosphatase*), SHMT2, PHPT1 (*phosphohistidine phosphatase 1*), UPF1 (*regulator of nonsense transcripts 1*), PSMG2 (*proteasome assembly chaperone 2*), DNAJA2 (*DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A2*), CYP11A1, NQO2 (*N-ribosyldihydronicotinamide:quinone dehydrogenase 2*) et NUDT5. Parmi ces protéines, DNAJA2, ASNS, SHMT2, DTYMK et NUDT5 sont impliquées dans les mécanismes d'acétylation influençant la structure des protéines et l'expression génique. De plus, DNAJA2, ASNS, DTYMK, NEDD4, ABCE1 et UPF1 sont connues pour leur implication dans les processus cytosoliques (Figure 26A).

En revanche, parmi les protéines sous-exprimées dans les cellules de dormance, sept ont montré une différence significative dans l'expression génique transcriptomique. Trois protéines ont présenté des délétions dans les cellules de dormance et parentales, *Eno1* étant délété uniquement dans les cellules parentales

(Figure 26B). Les protéines détectées exclusivement dans les cellules de dormance DA1-3b/D365 ont montré une amplification de trois gènes correspondants dans les cellules parentales et de dormance. Quatre gènes étaient exclusivement amplifiés dans les cellules parentales, et seul *Ass1* (*argininosuccinate synthase 1*) était amplifié exclusivement dans les cellules de dormance.

Pour les protéines exclusivement exprimées dans le modèle parental DA1-3b, trois gènes étaient amplifiés uniquement dans les cellules parentales, tandis que *Vars2* était amplifié uniquement dans les cellules de dormance. De plus, trois gènes ont présenté des délétions dans les cellules parentales et de dormance. A noter que seul *F13a1* présentait des différences épigénétiques entre les cellules parentales, marquées par H3K9me3, et les cellules de dormance, caractérisées par H3K27me3. L'expression transcriptomique des gènes identifiés par analyse protéomique dans le modèle de leucémie a indiqué une expression généralement uniforme de toutes les protéines, avec une surexpression notable observée pour *Ass1*, qui était exclusive aux cellules de dormance DA1-3b/D365 (Fig S2).

Dans l'ensemble, nos résultats ont montré que les protéines dérégulées dans les cellules leucémiques de dormance étaient principalement sans rapport avec des altérations génétiques/génomiques. De plus, à l'exception d'un petit nombre de gènes, les gènes mutés identifiés n'étaient pas différemment exprimés au niveau protéique.

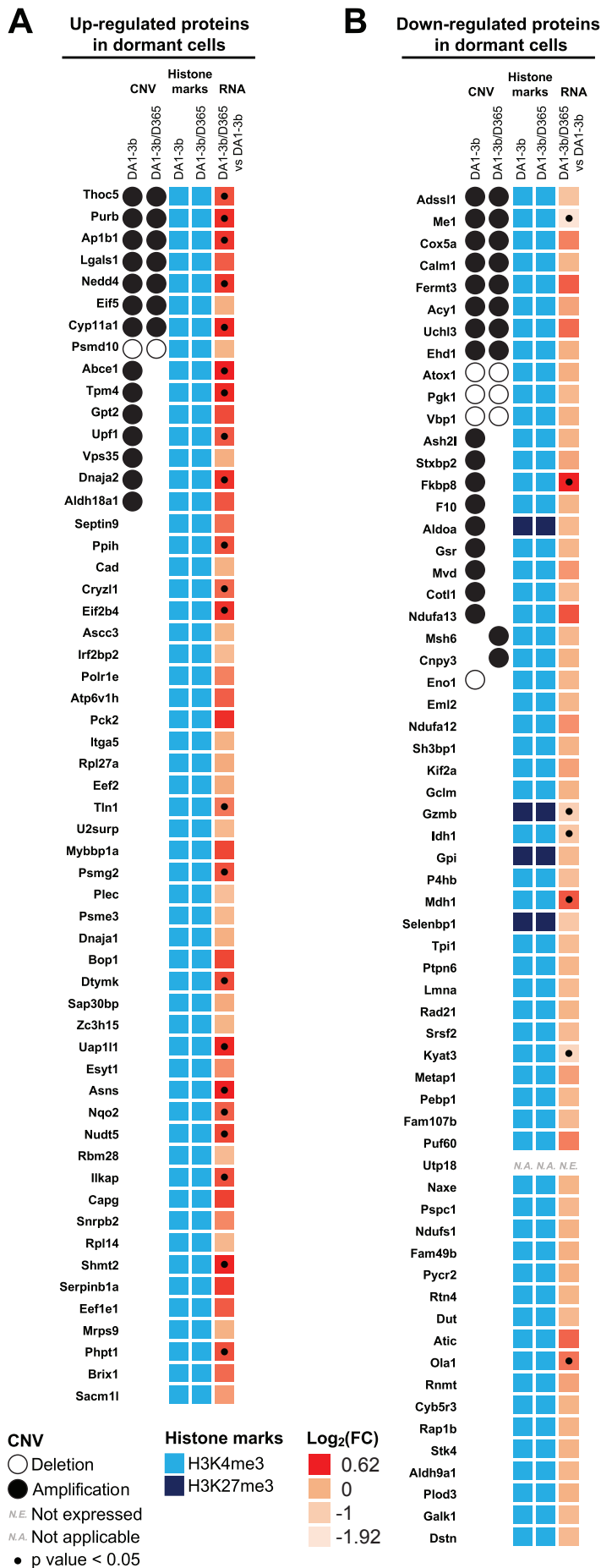


Figure 26 : Heatmaps des résultats des CNV, des marques d'histones et de l'expression génique des protéines dérégulées dans les cellules leucémiques de dormance DA1-3b/D365 par rapport à leurs cellules parentales.

Les résultats CGH sont représentés par un cercle noir pour l'amplification, tandis que les délétions sont indiquées par un cercle vide. Les codes épigénétiques actifs H3K4me3 sont représentés en bleu vif, et H3K27me3 en bleu marine. L'expression génique transcriptomique est représentée par un dégradé de couleurs par rapport à Log₂ (fold change), variant de l'orange clair au rouge pour une expression plus élevée. Le fold change représente l'expression génique différentielle entre les conditions de cellules de dormance et parentales. Les valeurs transcriptomiques significatives (p<0,05) sont indiquées par un point. (A) Heatmap des protéines surexprimées dans les cellules de dormance. (B) Heatmap des protéines sous-exprimées dans les cellules de dormance."

X) L'expression différentielle des protéines dans un modèle murin de leucémie met en évidence son implication dans les voies biologiques.

Comme illustré dans la Figure 27, un Bubble plot montre notre analyse d'enrichissement GO visant à découvrir les rôles fonctionnels des protéines exprimées de manière différentielle dans les cellules de dormance DA1-3B/D365 par rapport à leurs homologues parentaux. Cette analyse a révélé 12 termes significativement enrichis liés aux protéines surexprimées, principalement liés au "métabolisme cellulaire" et à "la biosynthèse des composés organo-azotés". De façon intéressante, **l'analyse d'enrichissement GO a mis en évidence des voies avec un ratio de gènes plus élevé, mettant particulièrement l'accent sur "la traduction", "la biosynthèse des amides" et "le métabolisme cellulaire des amides"**.

En revanche, les protéines sous-régulées étaient enrichies dans 40 termes distincts, avec un accent particulier sur des processus tels que "le processus glycolytique à travers le glucose-6-phosphate" et "la glycolyse canonique". Les voies présentant les ratios de gènes les plus élevés étaient celles liées au "métabolisme cellulaire", au "métabolisme des composés azotés" et à "la biosynthèse des acides aminés modifiés" (Figure 27). Ces découvertes offrent des perspectives précieuses sur les mécanismes moléculaires sous-jacents régissant le comportement des cellules de leucémie de dormance et leurs homologues parentaux.

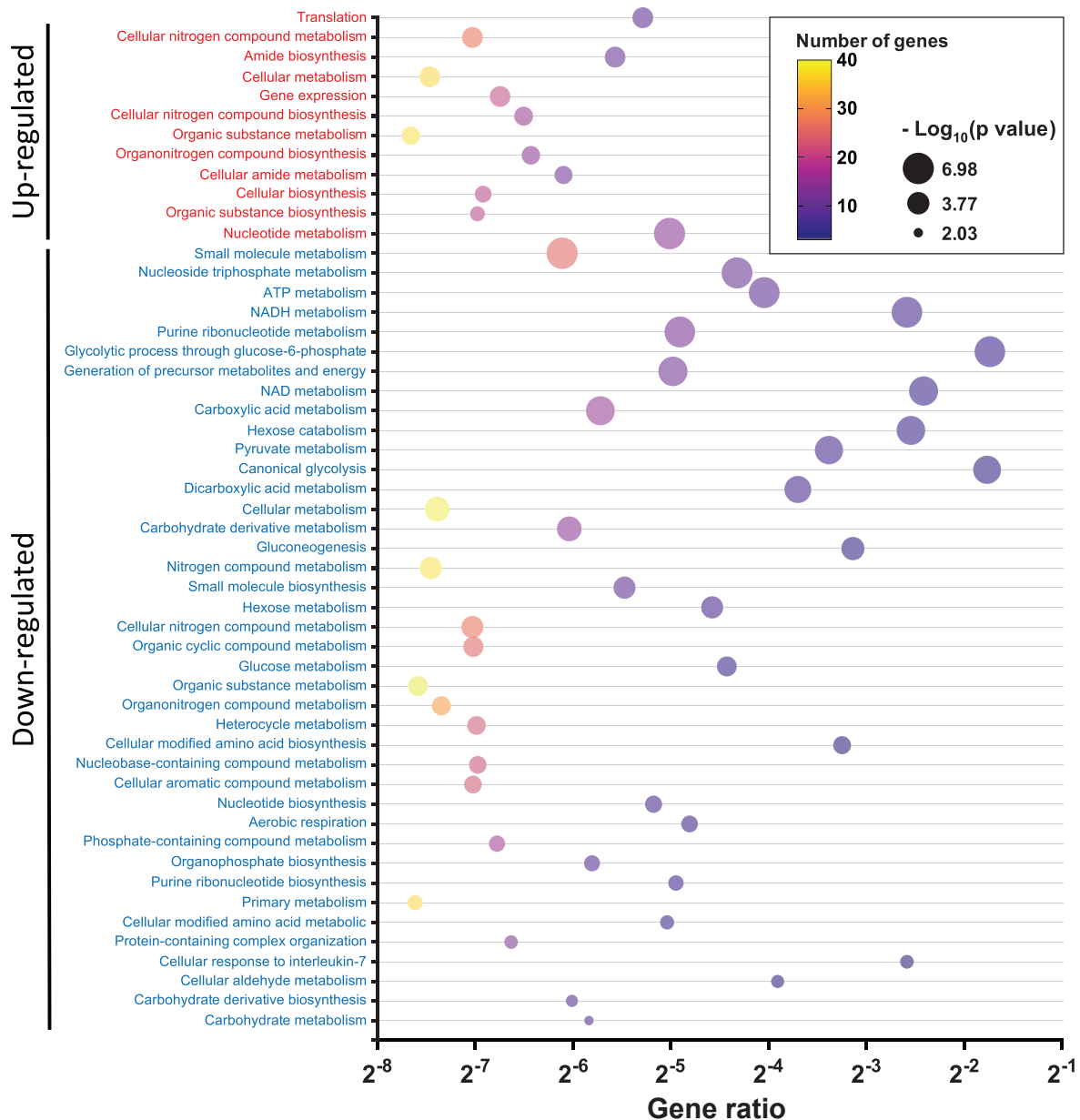


Figure 27 : Bubble plots de l'analyse d'enrichissement des voies GO des protéines exprimées de manière différentielle dans les cellules de dormance de leucémie DA1-3b/D365 par rapport à leurs cellules parentales.

Les voies sont classées selon l'expression protéique surexprimée (rouge) et sous-exprimées (bleu). Le nombre de protéines enrichies dans la voie est indiqué (dégradé de couleur plasma). Le "Ratio de gènes" indique le ratio de protéines enrichies par rapport aux protéines de fond. La taille de la bulle est en fonction de la valeur p (échelle Log10) de l'enrichissement de la voie.

XI) Analyse de l'expression protéique différentielle dans les cellules de dormance de mélanome

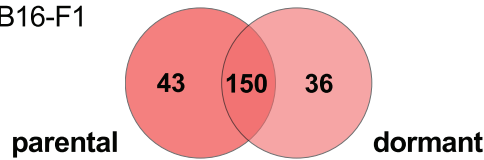
Une analyse des variations de l'expression protéique dans les cellules de dormance du mélanome B16-F1GFP-D a également été réalisée grâce à une investigation protéomique utilisant la spectrométrie de masse. Au total, 2474 protéines ont été identifiées, dont 168 présentaient des différences d'expression ($p < 0,05$) entre les cellules B16-F1GFP-D et B16-F1GFP-M. 43 protéines étaient uniquement exprimées dans les cellules parentales, tandis que 36 protéines étaient exclusivement détectées dans les cellules de dormance (Figure 28A). Parmi les 168 protéines dont l'expression était altérée, 96 étaient surexprimées, tandis que 72 étaient sous-exprimées dans les cellules de dormance du mélanome B16-F1GFP-D (Figure 28B ; fichier supplémentaire 1, Tableau S1-f : accessible en ligne).

Figure 28 : Analyse de l'expression protéique différentielle dans les cellules de dormance du mélanome B16-F1GFP-D comparées à leurs cellules parentales.

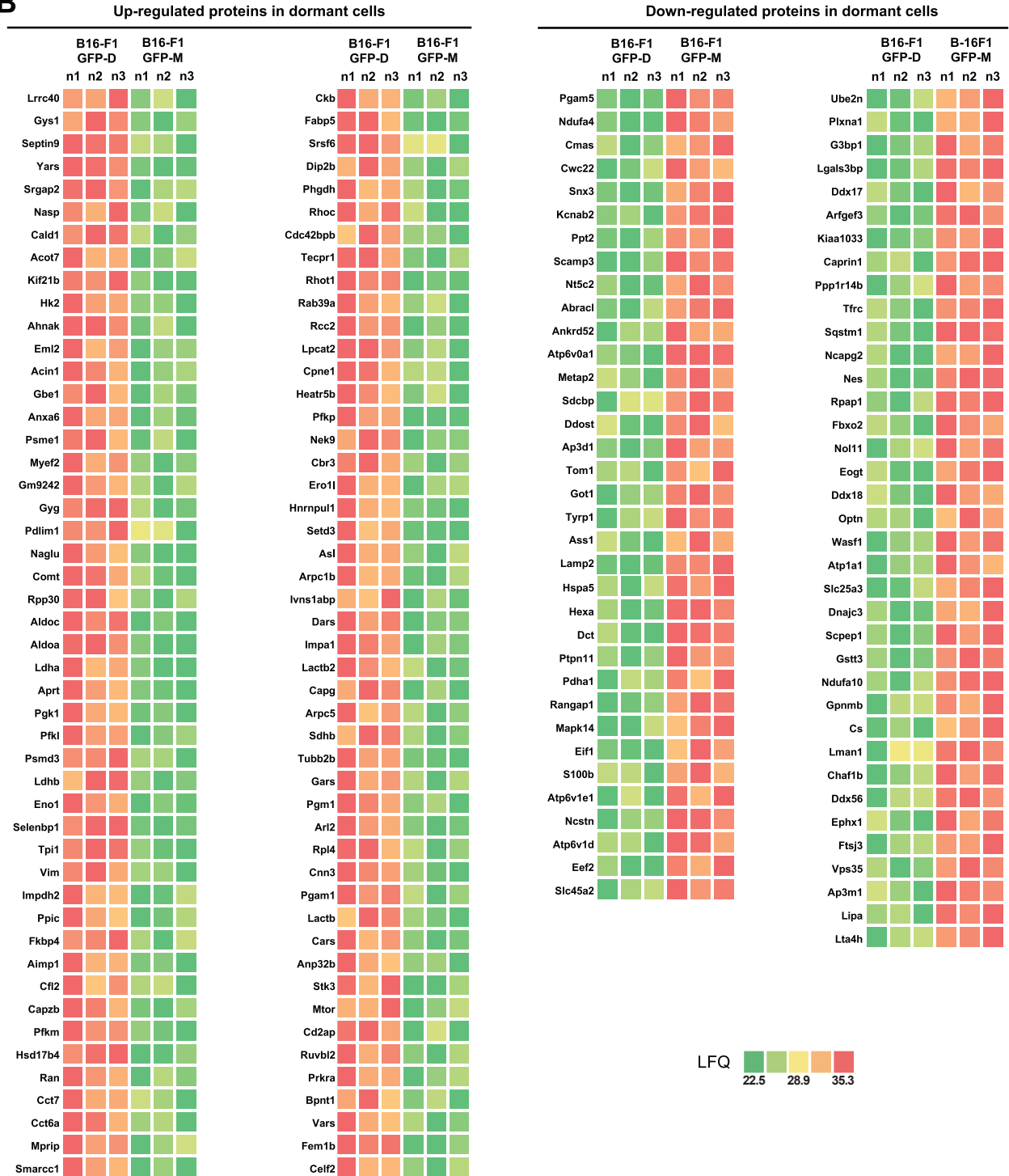
(A) Diagrammes de Venn illustrant le nombre de protéines communes dérégulées et exclusives selon l'état de dormance ou parental des cellules de mélanome B16-F1. Un seuil de significativité de $p < 0,05$ a été utilisé pour le test t de Student avec le logiciel Perseus. (B) Heatmaps illustrant les protéines surexprimées (dégradé de couleur rouge) et sous exprimées (dégradé de couleur verte) dans les cellules de dormance du mélanome B16-F1GFP-D par rapport à leurs homologues parentaux. Les résultats sont exprimés en quantification sans étiquette (LFQ) des protéines. L'intensité LFQ a été soumise au logarithme 2 ($\log_2[x]$). Trois expériences indépendantes ($n=3$) ont été réalisées, et les LFQ résultants sont présentés.

A

Melanoma B16-F1



B



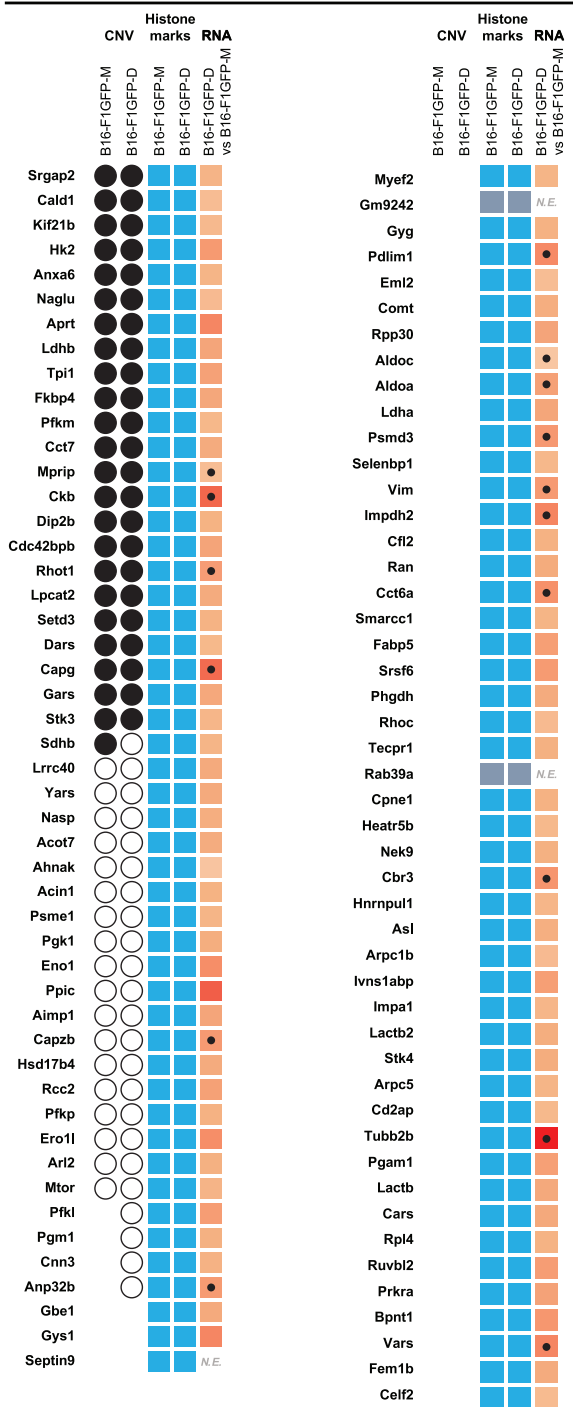
En miroir du modèle de leucémie, nous avons utilisé les mêmes approches pour intégrer l'analyse transcriptomique, la détection des régions de CNV basée sur la CGH, et l'analyse des modifications épigénétiques des protéines identifiées (Figure 29 ; fichier supplémentaire 1, Tableau S1-g : accessible en ligne). Comme attendu, la plupart des gènes correspondants présentaient une marque épigénétique active H3K4me3, c'est-à-dire 94 des 96 gènes surexprimés et 69 des 70 protéines sous-exprimées, indiquant une transcription active. De plus, l'analyse de CGH a révélé que pour la majorité des gènes codant pour des protéines, soit 42 protéines surexprimées et 30 protéines sous exprimées, les schémas d'amplification ou de délétion étaient conservés entre les cellules parentales et celles de dormance. Bien que nous n'ayons observé aucune corrélation entre la différence de profil de CNV et la surexpression des protéines dans les cellules de dormance, des délétions spécifiquement dans le modèle de dormance ont été observées pour neuf protéines parmi celles dérégulées : METAP2 (*methionyl aminopeptidase 2*), ASS1, S100B (*S100 calcium binding protein B*), EEF2 (*eukaryotic translation elongation factor 2*), UBE2N (*ubiquitin conjugating enzyme E2 N*), WASF1 (*WASP family member 1*), SLC25A3 (*solute carrier family 25 member 3*), GSTT3 (*glutathione S-transferase theta 3*) et LTA4H (*leukotriene A4 hydrolase*). Cela suggère que **la dormance tumorale pourrait impacter l'expression de ces gènes par le biais d'une altération génomique.**

Figure 29 : Heatmaps des résultats de CNV, des marques d'histones et de l'expression génique transcriptomique des protéines dérégulées dans les cellules de dormance du mélanome B16-F1GFP-D comparées à leurs cellules parentales.

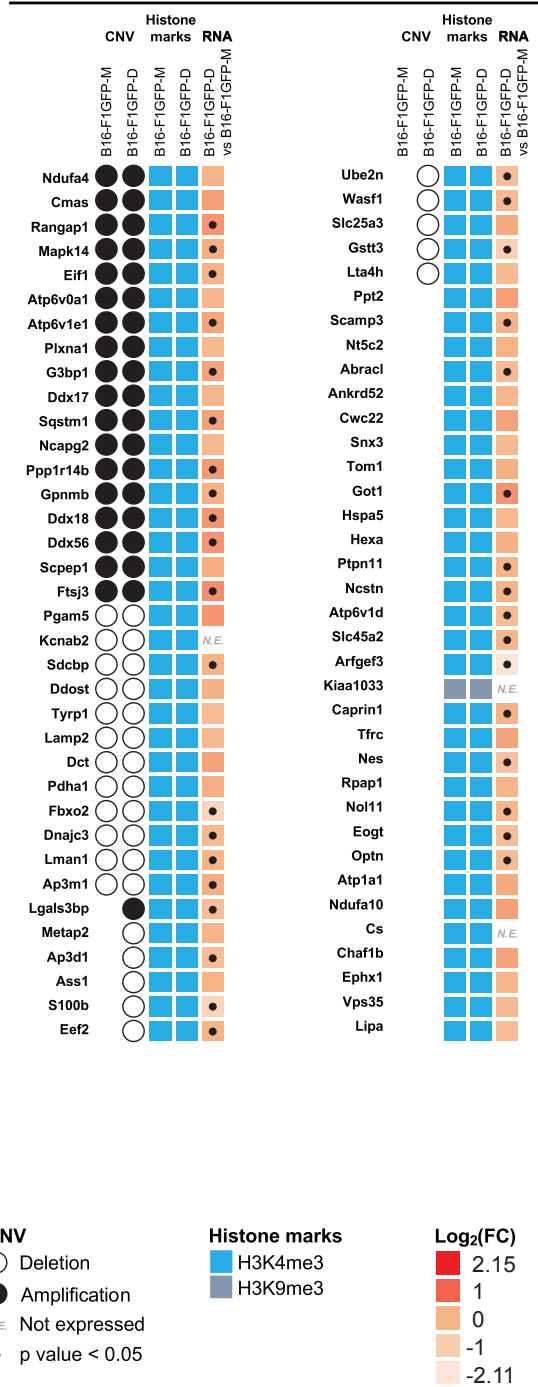
Les résultats de la CGH sont représentés par un cercle noir pour l'amplification, tandis que les délétions sont indiquées par un cercle vide. Les codes actifs épigénétiques H3K4me3 sont représentés en bleu vif, et H3K9me3 en bleu-gris. L'expression génique transcriptomique est représentée par un dégradé de couleur relatif à Log₂ (fold change), variant de l'orange clair,

pour une expression plus faible, au rouge pour une expression plus élevée. Le fold change représente l'expression génique différentielle entre les conditions de cellules de dormance et parentales. Les valeurs transcriptomiques significatives ($p < 0,05$) sont indiquées par des points. Chaque expérience a été répétée 3 fois.

Up-regulated proteins in dormant cells



Down-regulated proteins in dormant cells



En ce qui concerne les protéines détectées exclusivement dans les cellules de dormance, aucune différence de profil de CNV n'était corrélée avec l'analyse protéomique (Figure S2 en annexe). De manière intéressante, nous avons détecté une forte expression transcriptomique de *Adss1* (*adenylosuccinate synthase 1*) dans les cellules de dormance sans aucune variation génomique. Parmi les protéines détectées exclusivement dans les cellules parentales, la plupart des gènes ne présentaient aucune différence de profil de CNV entre les cellules de dormance et parentales, à l'exception des gènes *Stx7* (*syntaxin 7*) et *Wdr18* (*WD repeat domain 18*) qui présentaient des délétions exclusives dans les cellules de dormance (Figure S2 en annexe).

En résumé, nos résultats ont révélé que la dérégulation protéique dans les cellules de dormance de mélanome ne se produisait généralement pas par des mécanismes génétiques, en accord avec ce qui a été observé dans le modèle de MRD de leucémie. De plus, à l'exception de quelques gènes, les gènes mutés identifiés n'ont pas présenté d'expression différentielle au niveau protéique.

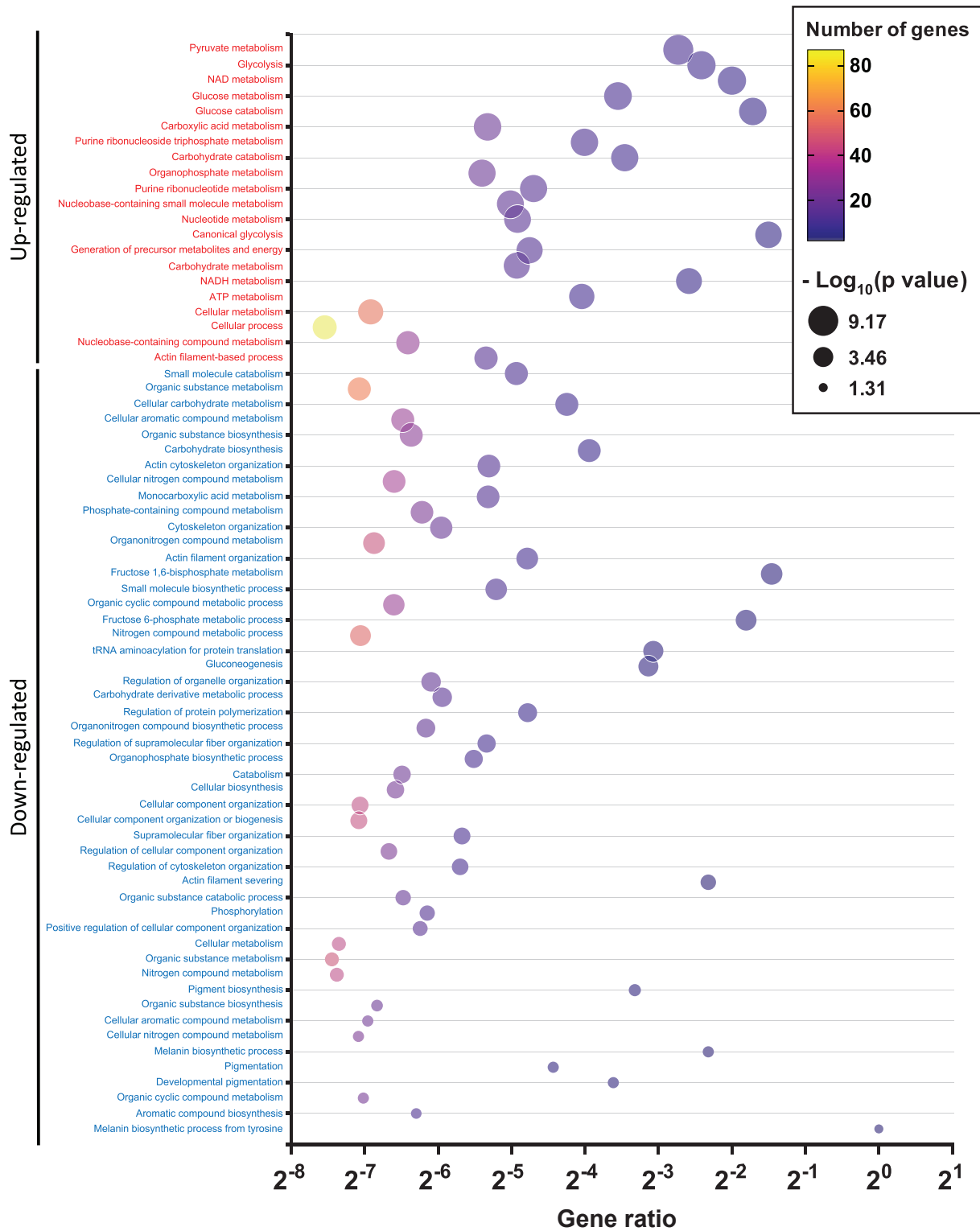
XII) L'expression protéique différentielle dans un modèle murin de mélanome met en lumière l'implication significative de voies biologiques

L'étape suivante a consisté à réaliser une analyse d'enrichissement GO pour explorer les relations fonctionnelles des protéines exprimées de manière différentielle dans les cellules de dormance B16-F1GFP-D par rapport à leurs homologues parentaux. Un total de 21 termes ont présenté un enrichissement significatif pour les

protéines surexprimées, principalement associées aux processus cellulaires et au métabolisme. Parmi ces termes, on trouve en particulier ceux liés au métabolisme du NAD (*nicotinamide adénine dinucléotide*), au catabolisme du glucose, ainsi qu'aux voies de la glycolyse canonique (Figure 30). En revanche, les protéines sous-régulées étaient enrichies dans 51 termes, avec un accent sur divers processus métaboliques, l'organisation de composants cellulaires et la biogenèse. Les principales voies identifiées comprenaient le transport transmembranaire de protons, le clivage des filaments d'actine, la biosynthèse de la mélanine, le métabolisme du fructose et la biogenèse de composants cellulaires (Figure 30).

Figure 30. Bubble plots de l'analyse d'enrichissement des voies GO des protéines exprimées de manière différentielle dans les cellules de dormance du mélanome B16-F1 par rapport à leurs cellules parentales.

Les voies sont classées selon l'expression protéique surexprimée (en rouge) et sous-régulée (en bleu). Le nombre de protéines enrichies dans chaque voie est indiqué par la couleur du dégradé de plasma. Le "Ratio de gènes" indique le ratio de protéines enrichies par rapport aux protéines de fond. La taille des bulles est conforme à la valeur de p (Log10) de l'enrichissement de la voie.



XIII) L'identification de 11 gènes communs exprimés de manière différentielle dans les deux modèles murins de MRD a révélé une possible signature commune de MRD.

Parmi les 11 protéines exprimées de manière différentielle entre les modèles de leucémie et de mélanome, quatre ont montré une augmentation de leur expression dans le modèle de dormance de la leucémie. Neuf protéines ont présenté une augmentation de leur expression dans le modèle de dormance du mélanome. Seules SEPTIN-9 (*septin 9*) et CAPG ont montré une surexpression constante dans les deux pathologies ; **cela suggère une signature protéique distincte entre les deux conditions** (Figure 31A).

Parmi ces 11 protéines, CAPG est communément surexprimée dans les cellules de dormance de la leucémie et du mélanome. SEPTIN9 est connue pour son rôle dans la régulation de la structure cellulaire et de la division cellulaire, tandis que CAPG influence la motilité et la forme cellulaire en modulant la dynamique de l'actine. Ces deux protéines sont donc cruciales pour de nombreux processus cellulaires fondamentaux. Leur augmentation observée dans l'expression protéique dans les modèles de dormance des deux pathologies suggère une altération potentielle de la structure du cytosquelette dans le contexte de la dormance tumorale. De plus, la méthylation du promoteur de *Septin9* a récemment été associée aux phénomènes de récurrence et de métastases du cancer, notamment dans le cancer du sein. Le rôle de CAPG dans la promotion de la leucémie myéloïde aiguë a été décrit (Ma *et al.*, 2023).

L'analyse comparative des CNV dans les deux modèles a révélé une disparité dans l'amplification protéique. Cependant, une délétion partagée entre les cellules parentales et de dormance a été observée dans les deux pathologies, impliquant spécifiquement *Pgk1*. De plus, la délétion parentale de *Eno1* est maintenue dans le modèle parental du mélanome et son modèle de dormance associé. Comme attendu, nous avons observé une prédominance du motif épigénétique actif H3K4me3 dans les deux pathologies ; cependant, le code histone répressif H3K27me3 a été détecté pour les gènes *Aldoa* et *Selenbp1* dans le modèle leucémique (Figure 31B ; fichier supplémentaire 1, Tableau S1-h : accessible en ligne).

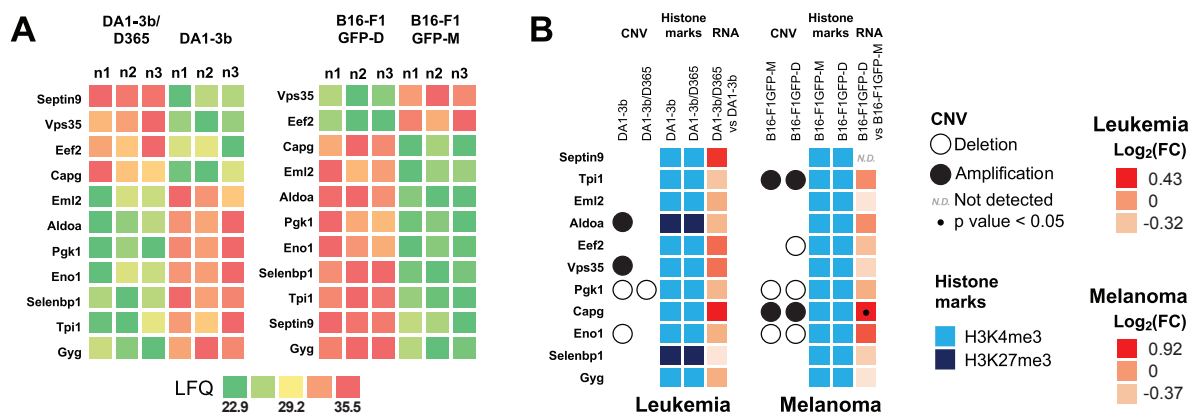


Figure 31 : Signatures protéiques communes entre les 2 modèles de MRD murins.

(A) Heatmaps illustrant les protéines surexprimées et sous-exprimées dans les cellules de dormance du mélanome B16-F1-GFP-D et de la leucémie DA1-3b/D365 par rapport à leurs cellules parentales. Les résultats sont exprimés en quantification sans étiquette (LFQ) des protéines. L'intensité LFQ a été logarithmée ($\log_2[x]$). Trois expériences indépendantes ($n=3$) ont été effectuées, et les LFQ résultantes sont présentées. (B) Heatmaps de l'analyse intégrée des données de CNV, des marques d'histone et de l'expression génique transcriptomique avec les protéines dérégulées dans les cellules de dormance du mélanome B16-F1GFP-D et de la leucémie DA1-3b/D365 par rapport à leurs cellules parentales. Les résultats de CGH sont représentés par un cercle noir pour l'amplification, tandis que les délétions sont indiquées par un cercle vide. Les marques actives H3K4me3 sont représentées en bleu vif, et H3K27me3 en bleu marine. L'expression génique transcriptomique est représentée par un dégradé de couleurs relatif à \log_2 (fold change) variant de l'orange clair pour une expression plus faible

au rouge pour une expression plus élevée. Le fold change représente l'expression génique différentielle entre les conditions de cellules dormantes et parentales. Les valeurs transcriptomiques significatives ($p < 0,05$) sont indiquées par un point. Chaque expérience a été répétée 3 fois.

XIV) Impact génétique et d'expression différentielle de la signature

MRD des 11 protéines dans la LAM et le mélanome humains

Parmi les 11 protéines couramment dérégulées dans les cellules de dormance des deux pathologies (Tableau 3), une analyse de données publiques provenant de cohortes de patients atteints de LAM (Tyner *et al.*, 2018 ; Bottomly *et al.*, 2022) (n=905) a révélé que quatre d'entre elles, à savoir *SELENBP1* (*selenium binding protein 1*), *SEPTIN9*, *GYG* (*glycogenin*) et *ENO1*, présentaient une expression significativement plus élevée chez les patients présentant des pronostics défavorables (classification ELN 2017). En revanche, les autres protéines semblaient être associées à un pronostic intermédiaire. Un pourcentage discret (0,5%) de patients présentant une CNV (délétion) a été observé pour quatre de ces gènes communs, dont *ENO1*, qui présentait également une délétion dans notre modèle myéloïde parental murin. En ce qui concerne la pathologie du mélanome, lors de la comparaison de données publiques de patients entre les stades de diagnostic et de métastase (Genomic Classification of Cutaneous Melanoma, 2015), des fréquences significatives d'amplification (14,5% et 10,0% respectivement) ont été observées pour les gènes *SELENBP1* et *SEPTIN9* au stade métastatique (Tableau 3). Conformément aux résultats de nos modèles murins de mélanome parental et de dormance, une fréquence notable d'amplification de *TPI1* (*triosephosphate isomerase 1*) aux stades diagnostique (4,7%) et métastatique (6,4%) a été observée.

Tableau 3 : Impact des 11 protéines couramment exprimées de manière différentielle dans les modèles de dormance du mélanome B16-F1GFP-D et de la leucémie murine DA1-3b/D365 sur la LAM humaine et le mélanome.

Gene	Acute myeloid leukemia	Melanoma - Primary tumours				Metastatic melanoma	
	ENL	CNV loss and gain frequency (%)					
	Classification (higher expression in)	Deletion	Amplification	Deletion	Amplification	Deletion	
<i>ALDOA</i>	<i>Intermediate*</i>	0.5	4.7	1.6	2.7		
<i>SELENBP1</i>	Adverse*		6.3		14.5	0.9	
<i>SEPTIN9</i>	Adverse*	0.5	7.8	1.6	10.0		
<i>EEF2</i>	<i>Intermediate*</i>						
<i>CAPG</i>	<i>Intermediate*</i>		6.3	1.6	0.9	0.9	
<i>EML2</i>	<i>Intermediate</i>				4.5	2.7	
<i>GYG</i>	Adverse		4.7		1.8		
<i>VPS35</i>	<i>Intermediate</i>	0.5	1.6	3.1		0.9	
<i>TPI1</i>	<i>Intermediate</i>		4.7		6.4	6.4	
<i>ENO1</i>	Adverse	0.5	4.7	6.3	1.8	1.8	
<i>PGK1</i>	<i>Intermediate</i>						

Le Tableau 3 révèle une corrélation entre l'expression la plus élevée (ARN-seq) des 11 gènes et les groupes de classification ENL (c'est-à-dire défavorable, intermédiaire et favorable) dans la LAM (n=905). Un astérisque symbolise un résultat significatif (p<0.05). Le tableau montre la fréquence (%) de perte et de gain de CNV associée au gène indiqué chez les patients atteints de LAM et de mélanome (tumeurs primaires et métastatiques) (n=489). Les données ont été extraites du domaine public cBioportal (Genomic Classification of Cutaneous Melanoma, 2015 ; Tyner *et al.*, 2018 ; Bottomly *et al.*, 2022).

XV) Propriétés fonctionnelles partagées par les cellules de dormance des deux modèles de maladie résiduelle

Nous avons observé une surexpression commune de SEPTIN9 et CAPG au niveau protéique dans les cellules de dormance, et ce quel que soit le type de tumeur. Nous avons donc examiné l'impact fonctionnel potentiel en mesurant les propriétés physiques des cellules de dormance par rapport à leurs homologues parentales dans les deux modèles de MRD. En effet, ces deux protéines sont impliquées dans l'organisation du cytosquelette (Kim *et al.*, 2023 ; Mostowy et Cossart, 2012 ; Zhang *et al.*, 2006), une caractéristique impliquée dans le destin cellulaire et les mécanismes d'adaptation au microenvironnement (Fletcher et Mullins, 2010 ; Wang *et al.*, 2022). De plus, le remodelage du cytosquelette peut relier les propriétés mécaniques à la dormance cellulaire (Fletcher et Mullins, 2010 ; Wang *et al.*, 2022 ; Barkan *et al.*, 2008). Outre les effets mécaniques, de multiples études ont décrit le rôle des principaux composants du cytosquelette tels que les filaments d'actine et les microtubules sur les propriétés électriques des cellules (Gharooni *et al.*, 2019 ; Salmanzadeh *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2018). De manière intéressante, des processus dynamiques tels que la dépolymérisation/polymérisation des microtubules et des filaments d'actine ont été décrits pour avoir un impact sur la signature électrique des cellules cancéreuses (Gharooni *et al.*, 2019 ; Salmanzadeh *et al.*, 2013).

Ainsi, nous avons réalisé des analyses d'impédance pour comparer les propriétés électriques des cellules de nos deux modèles de MRD. Le débit nécessaire pour l'analyse de cellules individuelles a été maintenu en utilisant des mesures d'impédance électrique dans un dispositif microfluidique. Ce cytomètre de flux de

spectroscopie d'impédance micro machiné a obtenu différentes propriétés cellulaires à des fréquences de mesure dédiées, par exemple, la taille à des fréquences comprises entre 0,1 et 1 MHz, la réactance membranaire à des fréquences comprises entre 2 et 5 MHz, et la conductance cytoplasmique à des fréquences supérieures à 20 MHz (Gawad *et al.*, 2001). Par conséquent, nous avons mesuré la réponse de chaque cellule à 30 MHz pour comparer leur conductance cytoplasmique, étant donné que l'expression plus élevée de SEPTIN 9 et de CAPG, protéines de liaison impliquées dans l'organisation du cytosquelette, a été détectée dans les cellules de dormance des deux modèles de MRD. Pour minimiser les erreurs éventuelles dues à l'étalonnage de l'appareil, nous avons normalisé chaque mesure en fonction de la médiane des cellules parentales.

Les cellules de dormance de la leucémie DA1-3b/D365 ($0,90 \pm 0,007$ valeur normalisée \pm erreur standard) et du mélanome B16-F1GFP-D ($0,84 \pm 0,018$ valeur normalisée \pm erreur standard) ont montré une conductance cytoplasmique normalisée inférieure à celle de leurs homologues parentales, c'est-à-dire DA1-3b ($1,00 \pm 0,007$) et B16-F1GFP-M ($1,00 \pm 0,020$), pour $n = 16802$ et 3815 cellules, répétées dans 8 et 4 expériences indépendantes, respectivement (Figure 32). Les deux comparaisons ont montré une différence significative ($p < 0,0001$) entre les cellules parentales et de dormance dans les deux modèles de MRD (test t de Student). **Dans l'ensemble, ces résultats renforcent le rôle potentiel de la forme du cytosquelette dans les mécanismes sous-jacents du processus de MRD.**

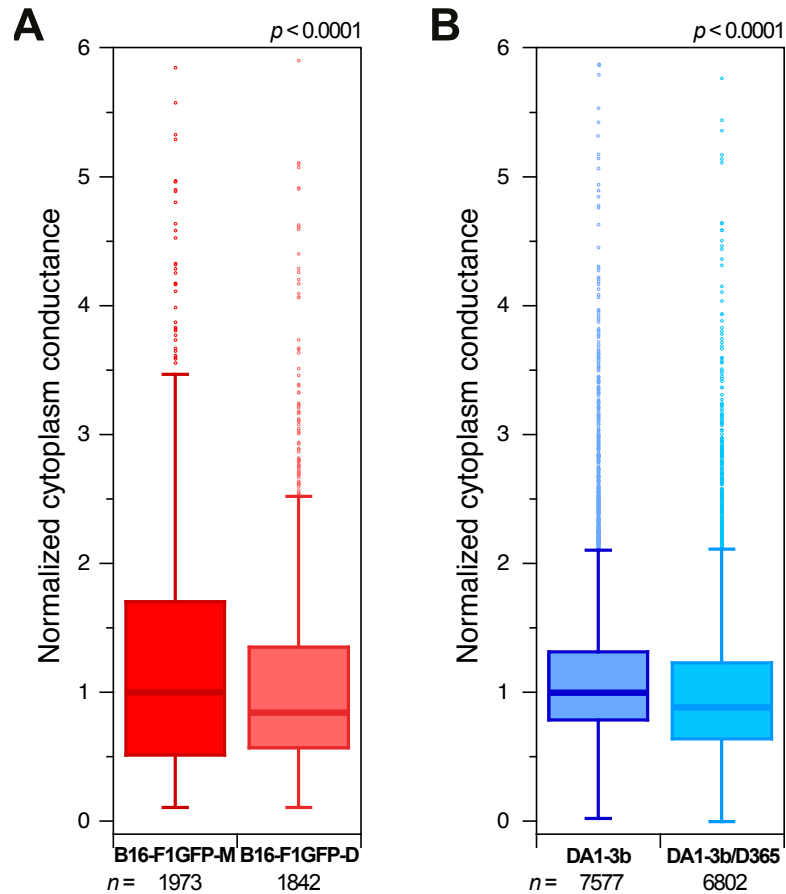


Figure 32 : Diagrammes en boîte comparant la conductance du cytoplasme des cellules de dormance B16-F1GFP-D du mélanome et des cellules de dormance DA1-3b/D365 de la leucémie par rapport à leurs cellules homologues parentales.

Les cellules de chaque groupe, (A) mélanome et (B) leucémie, ont été analysées par des mesures d'impédance à 30 MHz, et normalisées selon la médiane des cellules parentales. Les expériences ont été répétées respectivement 4 et 8 fois, avec différentes cultures cellulaires. Le nombre de cellules analysées est indiqué sous chaque diagramme. Les deux comparaisons ont montré des différences significatives ($p < 0,0001$).

DISCUSSION

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

L'étude des caractéristiques multi-omiques des cellules de dormance du mélanome et de la leucémie à partir des modèles murins syngéniques de MRD nous a permis d'explorer les mécanismes génétiques et non génétiques impliqués dans la dormance tumorale. **Notre approche multi-omique a permis d'identifier une signature génétique spécifique et d'en souligner l'impact fonctionnel potentiel dans les deux modèles de cancer.**

Certains gènes porteurs de mutations sont communs aux modèles murins de dormance du mélanome et de la leucémie. Pour autant, un nombre important de gènes mutés sont spécifiques aux cellules dormantes dans chaque modèle distinct. Cela suggère que ces cellules ont élaboré des mécanismes de résistance contre leur environnement ou les traitements, que ce soit via l'acquisition de mutations avantageuses, ou en étant sélectionnées avant même le début de la période de MRD (Rambow *et al.*, 2018 ; Mopin *et al.*, 2022 ; Onecha *et al.*, 2021 ; Robinson *et al.*, 2023). **La découverte de gènes mutés exclusivement présents dans les cellules parentales renforce l'idée selon laquelle il existerait des clones dormants initiaux dans la population tumorale parentale** (Rambow *et al.*, 2018 ; Mopin *et al.*, 2022 ; Onecha *et al.*, 2021 ; Robinson *et al.*, 2023 ; Patel *et al.*, 2023).

Dans le modèle de mélanome B16-F1, la maladie résiduelle minimale (MRD) semble être associée à la sélection de clones préexistants, plutôt qu'à l'acquisition de nouvelles mutations par les cellules de la deuxième génération après une période de dormance (B16-F1GFP-DB#1, B16-F1GFP-DB#2 et B16-F1GFP-DB#3). Nos données de séquençage de l'exome des cellules leucémiques DA1-3b suggèrent

quant à elles un schéma préférentiel de gain de mutations. Bien que nos deux modèles de MRD aient été soumis à un protocole de vaccination cellulaire similaire, il semble que le processus de MRD puisse impliquer des mécanismes de résistance distincts.

Dans la leucémie myéloïde (LAM) humaine, la résurgence de la maladie semble impliquer des mécanismes similaires à ceux observés dans notre modèle murin de MRD. En effet, de nombreuses analyses par séquençage NGS mettent en lumière le fait qu'un clone de cellule leucémique, qu'il soit initialement présent ou bien un sous-clone résistant aux thérapies, peut acquérir de nouvelles mutations, proliférer et émerger en tant que clone prédominant lors de la rechute (Onecha *et al.*, 2021 ; Robinson *et al.*, 2023).

Dans le mélanome humain, il est fréquent d'observer l'émergence de clones tumoraux résistants à la thérapie chez les patients, ce qui conduit à la rechute et à un pronostic défavorable (Rambow *et al.*, 2018 ; Patel *et al.*, 2023). Notre équipe ainsi que d'autres études avons d'ores et déjà démontré que les cellules de mélanome possédaient une plasticité cellulaire accrue, un processus non génétique qui semble favoriser l'adaptation des cellules tumorales à leur environnement (Touil *et al.*, 2013 ; Vidal *et al.*, 2022). Cette propriété biologique semble également réguler le switch phénotypique entre les cellules aux propriétés de cellules souches et celles qui n'en ont pas (Touil *et al.*, 2013). Les travaux antérieurs du laboratoire ont démontré que les cellules de dormance B16-F1GFP étaient enrichies en cellules présentant un phénotype semblable à celui des cellules souches (Touil *et al.*, 2016). Notre séquençage de l'exome ainsi que les données de VAF associées ont renforcé l'hypothèse selon laquelle des clones préexistants parmi les cellules parentales

pourraient présenter des caractéristiques de plasticité ou de cellules souches, soulignant le processus de maladie résiduelle. **Ces observations remettent en perspective le mécanisme sous-jacent de la MRD dans le mélanome : existe-t-il un mécanisme unique, qu'il soit ou non génétique, ou existe-t-il une combinaison des deux comme cela a été observé dans notre modèle murin ?**

Notre étude a révélé des signatures génétiques spécifiques dans les cellules de dormance du mélanome. En associant ces résultats aux données précédentes montrant leur phénotype « souche », **nous avons émis l'hypothèse de l'existence à la fois de mécanismes génétiques et non génétiques pour expliquer le processus de MRD.** Une étude récente a mis en lumière une carte spatiotemporelle de la diversité des stades et du devenir des cellules de mélanome, et a suggéré que la capacité de croissance ou de métastase était liée à des sous-ensembles distincts de cellules. Comme ces comportements phénotypiques peuvent être acquis de façon dynamique suite à l'exposition à des signaux spécifiques de la niche et de son microenvironnement, ces résultats soulignent les capacités de reprogrammation des cellules de mélanome (Karras *et al.*, 2022). Bien que la plasticité cellulaire puisse être impliquée dans le processus de dormance tumorale dans le mélanome, nos résultats n'ont pas permis de discriminer les processus génétiques et non génétiques qui pourraient expliquer la dormance dans le modèle murin B16-F1. En effet, la deuxième génération de cellules de dormance B16-F1GFP-DB n'a présenté aucun gène muté supplémentaire, tout en conservant ses propriétés de cellules de type « souche ». De plus, nous avons précédemment montré que ces cellules de mélanome dérivées du site cérébral modulaient leur profil transcriptomique par rapport à la première génération de cellules de dormance, et ce sans altération génomique supplémentaire

(Touil *et al.*, 2016 ; Touil *et al.*, 2013). Ainsi, la MRD pourrait bien impliquer des processus génétiques et non génétiques dans le mélanome.

Grâce à notre analyse multi-omique, nous avons démontré que la signature génétique des cellules de dormance pourrait avoir un impact fonctionnel. Pour autant, tous les gènes mutés identifiés dans les deux modèles de dormance ne contribuent pas nécessairement à cet impact fonctionnel. Pour un ensemble spécifique de gènes mutés dans les deux modèles de MRD, les altérations différentielles de CNV, combinées aux profils épigénétiques et à l'expression transcriptomique des gènes ont mis en évidence des impacts fonctionnels possibles, ainsi qu'une implication dans les mécanismes de MRD. Même si plusieurs gènes mutés n'ont pas présenté d'expression corrélée à des marques épigénétiques répressives, un nombre conséquent de gènes portant des mutations dans les cellules de dormance ont été exprimés, en accord avec le code d'histone actif associé. De plus, la surexpression des gènes mutés dans les cellules de dormance n'est majoritairement pas associée à une amplification ou à une délétion différentielle entre les cellules parentales et les cellules de dormance.

Concernant le modèle murin de leucémie, la combinaison des analyses épigénétique et transcriptomique a révélé que les marques d'histones actives étaient concomitantes à la surexpression de plusieurs gènes mutés qui sont impliqués dans les voies métaboliques. De façon notable, l'expression de ces gènes n'était pas uniquement dictée par les altérations de CNV, ce qui souligne une interaction nuancée entre les facteurs génétiques et non génétiques dans le contexte de la MRD. L'analyse GO a révélé les rôles fonctionnels potentiels des gènes mutés exprimés, montrant un

lien avec "la liaison des cadhérines" et "la liaison des molécules d'adhésion cellulaire", tandis que ceux dans les cellules de mélanome étaient associés à des voies impliquant "la liaison des petites molécules" et "la liaison des nucléotides".

Pour déterminer si les "signatures génétiques mutées murines" révélées par nos modèles murins de MRD étaient pertinentes pour la maladie humaine correspondante, nous avons analysé les profils génétiques de ces gènes dans des cohortes humaines de LAM et de mélanome, et ce à partir de bases de données publiques. Bien que la signature des gènes mutés dans la dormance révélée par le modèle murin de leucémie ne reflète pas précisément, ou seulement dans une moindre mesure, les motifs de mutations observés dans la LAM humaine au moment du diagnostic, elle a mis en évidence des altérations de CNV. **Cette découverte suggère un rôle potentiellement significatif de ces gènes dans la maladie humaine.** De plus, en raison de l'absence de bases de données sur la MRD ou la rechute de la LAM, nous n'avons pas pu vérifier la pertinence de notre signature dans les échantillons humains pendant la progression de la maladie. Néanmoins, *Idh1* a été trouvé muté dans les cellules de dormance de leucémie murine, et *IDH1* muté est fréquemment observé dans la LAM humaine tant au diagnostic qu'aux stades de MRD (Tazi *et al.*, 2022, Robinson *et al.*, 2023).

Dans les échantillons de mélanome humain, nous avons confirmé la présence de gènes mutés similaires dans les tumeurs primaires et métastatiques. Ces observations renforcent la pertinence de nos résultats pour d'éventuelles applications translationnelles. Bien que la fréquence des gènes mutés de dormance « murins » soit faible dans les tumeurs de mélanome métastatique, sans

« l'enrichissement » attendu, plusieurs gènes ont présenté des altérations de CNV avec une fréquence significativement augmentée par rapport au stade primaire. Ces observations renforcent la pertinence de nos résultats pour des applications translationnelles potentielles. Quant aux modèles murins de MRD, ils pourraient également mimer les caractéristiques de la maladie à l'échelle d'un « patient unique » en ce qui concerne les motifs de mutation, ce qui réduit ainsi la portée des signatures de gènes mutés identifiées en relation avec la dormance.

L'explication de la résistance aux thérapies étant couramment imputée à l'existence d'altérations génétiques (Holohan *et al.*, 2013), nous avons axé notre étude sur ce phénomène, tout en y incluant les facteurs non génétiques des cellules dormantes. En effet, de robustes études mettent en lumière l'acquisition transitoire via des mécanismes non mutationnels de phénotypes tolérants aux thérapies (Rambow *et al.*, 2018 ; Trumpp et Wiesler, 2008 ; Ravindran Menon *et al.*, 2015 ; Su *et al.*, 2017).

L'analyse protéomique des cellules de dormance montre que la dérégulation de l'expression protéique est principalement induite par des mécanismes non génétiques, et ce dans les deux modèles murins de MRD. Dans les cellules de dormance de leucémie, l'analyse de l'enrichissement a identifié des voies associées au métabolisme cellulaire. Cela fournit des informations précieuses sur les mécanismes moléculaires régissant la dormance. De même, la dérégulation des protéines dans les cellules de dormance de mélanome était principalement influencée par des facteurs non génétiques. L'analyse des voies d'enrichissement a révélé son implication dans le métabolisme cellulaire. **Pour autant, les cellules de dormance de mélanome présentent également un manque de différenciation et une organisation dérégulée du cytosquelette.** Notre étude permet une comparaison

entre la signature des cellules de dormance de nos modèles MRD et celles conçues dans des études précédentes impliquant la chimiothérapie et les cellules humaines de patients (Rambow *et al.*, 2018 ; Marin-Bejar *et al.*, 2021).

Fait intéressant, plusieurs gènes et voies identifiés sont communs à ceux identifiés dans les signatures de plusieurs modèles de MRD de mélanome tels que les cellules souches de la crête neurale, les cibles de MITF (*melanocyte inducing transcription factor*), la différenciation et la pigmentation ainsi que l'invasion (Rambow *et al.*, 2018). De la même manière, en ce qui concerne les modèles de PDX de MRD de LAM, des cellules persistantes après la chimiothérapie ont montré une reprogrammation métabolique, comme observé dans notre modèle de dormance de leucémie (Farge *et al.*, 2017). De plus, **l'analyse de l'enrichissement des voies de GO a révélé une implication significative des protéines dérégulées observées dans les cellules de dormance DA1-3b/D365, et ce dans plusieurs processus de biosynthèse cellulaire.** Ces éléments sont comparables à l'étude de Cabezas, robuste étude qui a également révélé une "signature de cellules dormantes" dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) avec des implications pour les voies de biosynthèse pendant la transition des CSH dormantes aux CSH actives (Cabezas-Wallscheid *et al.*, 2017). **Cette "signature dormante" pourrait à la fois discriminer des compartiments cellulaires fonctionnellement distincts dans le pool de cellules souches leucémiques chez les patients atteints de LAM, et fournir des informations cruciales sur le destin cellulaire de ces cellules potentiellement résistantes** (Beneyto-Calabuig *et al.*, 2023).

Ces observations renforcent nos conclusions et mettent en évidence les caractéristiques communes sous-jacentes au processus de MRD, quel que soit le type de traitement anticancéreux conduisant à la dormance. En effet, nos modèles de MRD syngéniques ont été conçus par le biais de la vaccination cellulaire, tandis que les modèles de MRD d'autres études ont été obtenus sous chimiothérapie (Farge *et al.*, 2017 ; Rambow *et al.*, 2018 ; Saudemont *et al.*, 2004 ; Touil *et al.*, 2016). Un nombre très limité d'études ont décrit des modèles de MRD de souris et ont principalement utilisé des modèles PDX, alors dépourvus d'implications du système immunitaire. **Cette étude menée dans des modèles syngéniques de leucémie et de mélanome pourrait décrypter les mécanismes potentiels liés à l'immunité de la dormance.** Comme précédemment démontré dans notre modèle de MRD de leucémie, la surexpression des ligands inhibiteurs immunitaires PD-L1 a renforcé la résistance aux lymphocytes T CD8 (Saudemont *et al.*, 2004). En revanche, les mécanismes élucidés dans nos modèles de MRD syngéniques, qui sont distincts de ceux mis en évidence dans d'autres modèles de MRD, pourraient être impliqués dans le contexte de la résistance du système immunitaire.

Il est important de noter que cette étude a révélé l'expression différentielle commune de 11 protéines dans les modèles de dormance de la leucémie et du mélanome. **Cela suggère une potentielle signature "globale" pour la maladie résiduelle.** SEPTIN-9 et CAPG ont montré une expression accrue dans les deux pathologies, indiquant une organisation structurale partagée dans le cytosquelette pendant la dormance tumorale. De plus, plusieurs protéines dérégulées dans les cellules de dormance étaient significativement enrichies dans les voies liées au cytosquelette. En ce sens, de nombreuses études ont révélé que les propriétés

mécaniques dictées par le cytosquelette peuvent avoir un impact sur le destin cellulaire, y compris la dormance tumorale ou les phénotypes mieux adaptés à un nouvel environnement (Fletcher et Mullins, 2010 ; Wang *et al.*, 2022 ; Barkan *et al.*, 2008). Notre expérience sur les propriétés physiques a révélé une signature "électrique" commune dans les cellules de dormance des deux modèles de MRD. La conductance du cytoplasme des cellules de dormance était significativement réduite, ce qui signifie un changement profond dans l'organisation structurale des microtubules et des filaments d'actine. Bien que la dépolymérisation/polymérisation des filaments d'actine ou des microtubules ait été décrite comme ayant un impact contradictoire sur la conductance ou les propriétés électriques (Gharooni *et al.*, 2019 ; Salmanzadeh *et al.*, 2013), **cette étude met en évidence un rôle significatif du cytosquelette sous-jacent aux processus de MRD à travers différents types de cancer.**

L'utilisation de modèles syngéniques offre un avantage significatif dans la recherche sur le cancer. En effet, cette approche permet de minimiser les variabilités génétiques interindividuelles, améliorant ainsi la fiabilité des résultats et la validité des déductions tirées de l'étude. En explorant les signatures génétiques et protéomiques des cellules dormantes dans le contexte de l'immunothérapie, notre étude offre de nouvelles perspectives. Les conclusions concernant les différences ou similitudes dans les signatures peuvent clarifier les stratégies thérapeutiques pour le traitement de la MRD à travers divers types de cancers.

De plus, la complexité de l'approche multi-omique enrichit l'exploration complète des mécanismes moléculaires régissant la MRD. En combinant des ensembles de données génomiques, transcriptomiques, protéomiques et

épigénomiques, **cette méthodologie offre une vue holistique et exhaustive du paysage biologique de la MRD**, ce qui offre alors des perspectives précieuses pour le développement de stratégies ciblées (Caplan *et al.*, 2022).

CONCLUSION/PERSPECTIVES

Notre étude contribue à la compréhension des mécanismes de la MRD, car elle propose une première analyse multi-omique comparative de la dormance tumorale dans deux types de cancers différents dans un contexte syngénique. Elle met en lumière l'importance d'explorer les caractéristiques des cellules résiduelles et leur rôle central dans cette persistance aux traitements.

Bien que certaines tumeurs réagissent initialement de manière favorable à la chimiothérapie ou aux thérapies ciblées, la plupart des cas récidivent, souvent sans mutations de résistance identifiables. Cela souligne l'importance d'étudier l'hétérogénéité phénotypique non génétique qui pourrait jouer un rôle crucial dans les rechutes tumorales, et donc de ne pas se concentrer uniquement sur les mutations génétiques.

Il est très difficile de cibler spécifiquement la MRD dans les tumeurs solides telles que le mélanome, de par le caractère invasif des biopsies répétitives. De plus l'hétérogénéité intra-tumorale et la formation de métastases à plus ou moins longue distance de la tumeur primaire complexifient encore plus le processus. Le suivi de la MRD basé sur les biomarqueurs tumoraux tels que les cellules tumorales circulantes est une piste d'étude prometteuse, mais cela reste insuffisant.

Ce défi pousse à vouloir modéliser la dormance tumorale pour mieux comprendre la MRD. Trouver un modèle pertinent reste complexe, car modéliser signifie inévitablement se limiter à certains facteurs, souvent au détriment d'éléments clés comme le système immunitaire. C'est un point critique dans des modèles tels que les PDX, qui, bien qu'efficaces pour reproduire certains aspects de la biologie tumorale humaine, excluent l'implication du système immunitaire en raison de l'utilisation de souris immunodéficientes. Nos modèles présentent l'avantage de ne pas omettre cette composante essentielle.

Notre étude comparative a ainsi évalué les similarités entre nos modèles de mélanome et les données humaines, en analysant à la fois les tumeurs primaires et les stades métastatiques. Cela est crucial, car l'accès aux informations sur les cellules résiduelles humaines de mélanome reste très limité. Pour la LAM, les données de patients ne fournissaient pas d'informations suffisamment détaillées sur la temporalité de la MRD.

L'intérêt majeur de notre modèle réside donc dans cette capacité à intégrer la notion de temporalité sans omettre l'implication du système immunitaire, tout en offrant un cadre complémentaire aux modèles d'études les plus couramment utilisés, comme les PDX, qui demeurent une référence mais avec leurs propres limitations.

Malgré les forces de notre étude, elle présente une limite notable : l'absence d'une analyse à l'échelle de la cellule unique. Cette approche aurait permis d'affiner la résolution et la compréhension des variations phénotypiques au sein des populations cellulaires étudiées (Robinson *et al.*, 2023). En effet, une telle analyse aurait pu

caractériser plus précisément les sous-populations spécifiques impliquées dans la MRD, apportant un éclairage sur la diversité cellulaire souvent masquée dans les études de masse (Liu *et al.*, 2024).

Questionnement sur le modèle d'étude : cellules de dormance et hypothèse de DTP

Nos cellules, amplifiées *in vitro* après un état de dormance *in vivo*, sont dans un état prolifératif. Toutefois, elles conservent plusieurs caractéristiques de la dormance tumorale, ce qui les rend pertinentes pour l'étude des mécanismes associés à la MRD (Saudemont *et al.*, 2004 ; Touil *et al.*, 2016).

Nos modèles murins ont révélé que ces cellules montrent une prolifération réduite par rapport aux cellules parentales, ainsi qu'un manque notable de différenciation, une résistance au système immunitaire et/ou un phénotype proche de celui des cellules souches, selon la pathologie étudiée (Saudemont *et al.*, 2004 ; Touil *et al.*, 2016 ; Touil *et al.*, 2022).

Bien que ces cellules ne soient pas quiescentes, leur profil s'approche de celui des DTP (*Drug-Tolerant Persisters*), des cellules capables de survivre aux traitements sans mutations de résistance identifiables (Sharma *et al.*, 2010). Cette hypothèse est soutenue par des observations similaires dans les cellules dormantes « en sortie de dormance », qui pourraient refléter un état précoce des DTP. Il est important de noter que la persistance représente une phase transitoire avant l'acquisition de la résistance. Au cours de cette phase, des modifications épigénétiques ou génétiques peuvent

s'accumuler, menant finalement à l'apparition de cellules résistantes aux traitements. Ce continuum entre dormance tumorale, « dormance fonctionnelle » et rechute pourrait éclairer les interactions dynamiques entre ces cellules persistantes et le système immunitaire pendant la MRD (Min *et al.*, 2023 ; Farge *et al.*, 2017 ; Rambow *et al.*, 2018 ; Flores-Gluzman *et al.*, 2020).

En effet, les DTP se distinguent des autres sous-populations cellulaires tumorales par plusieurs caractéristiques spécifiques qui jouent un rôle essentiel dans leur survie face aux traitements cytotoxiques. Ces caractéristiques incluent principalement :

a) Une quiescence ou prolifération ralentie

Les DTP entrent dans un état de quiescence ou de prolifération très lente, ce qui leur permet de résister aux traitements conçus pour cibler des cellules cancéreuses activement proliférantes. Cet état de dormance est un mécanisme de protection efficace contre les thérapies anticancéreuses, qui sont souvent dirigées contre les cellules en division rapide. De plus, cette quiescence leur permet d'échapper aux pressions sélectives induites par le traitement. Dans le mélanome, les DTP proliférantes s'appuient sur des voies de réponse au stress distinctes en raison de leur stress réplicatif accru, favorisant l'accumulation de mutations et la résistance à long terme (Russo *et al.*, 2024).

Comme évoqué précédemment, la croissance ralentie de nos modèles dits de dormance laisse supposer un continuum entre dormance tumorale, « dormance

fonctionnelle » et persistance des cellules résiduelles alors capables d'induire une rechute.

b) Un phénotype non génétique

Contrairement aux mécanismes de résistance classiques, où des mutations génétiques spécifiques confèrent une résistance aux médicaments, les DTP développent une tolérance aux traitements de manière non génétique. Cela signifie que leur capacité à survivre aux médicaments ne résulte pas de mutations permanentes dans leur ADN. Ce phénotype réfractaire est souvent réversible, ce qui permet aux DTP de quitter cet état une fois que l'exposition aux médicaments est réduite ou supprimée (Sharma *et al.*, 2010).

Les résultats de nos analyses abondent en ce sens concernant nos modèles de « dormance », où nous avons souligné l'implication de mécanismes non génétiques dans la MRD.

c) Un état réversible

Une caractéristique clé des DTP est leur capacité à sortir de l'état de résistance une fois que le stress du traitement est levé. Cette réversibilité les différencie des cellules ayant acquis une résistance génétique permanente. En effet, les DTP ne sont pas condamnées à rester dans cet état réfractaire, mais peuvent redevenir sensibles aux médicaments après une certaine période (Kurppa *et al.*, 2020).

Nos modèles cellulaires pourraient donc correspondre à ce stade dynamique intermédiaire entre une sortie de dormance et une pré-résistance potentielle, stade possiblement sensible à un stress mutagène pouvant alors induire une résistance clonale et irréversible.

Autre aspect important, la régulation épigénétique joue un rôle crucial dans cet état réversible des DTP. En effet, les cellules présentent une plasticité transcriptionnelle leur permettant de s'adapter aux traitements, et cette capacité est largement médiée par des modifications épigénétiques. Des études ont montré que l'augmentation des déméthylases des lysines des histones est essentielle pour la survie des DTP, leur conférant une résistance aux thérapies ciblées et à la chimiothérapie. De plus, l'élévation de la triméthylation de l'histone H3 à la lysine 9 (H3K9me3) induit un état de chromatine répressif qui favorise le phénotype DTP. Ce mécanisme, en particulier au niveau des éléments rétrotransposons LINE1, suggère que les DTP peuvent maintenir une forme de dormance tout en étant susceptibles d'être réactivés en réponse à des facteurs environnementaux ou thérapeutiques.

Nos modèles cellulaires ont souligné l'importance des modifications épigénétiques sur l'expression des gènes dans le contexte de dormance.

d) **Une plasticité phénotypique**

Un des traits les plus marquants des DTP est leur **plasticité**. Ces cellules sont capables de modifier leur phénotype en réponse aux changements dans leur microenvironnement ou en fonction du stress imposé par le traitement. Cette plasticité phénotypique leur permet de s'adapter à différents types de stress, augmentant ainsi leurs chances de survie à long terme. Elles peuvent ainsi alterner entre un état de tolérance aux médicaments et un état plus prolifératif, lorsque les conditions deviennent favorables (Russo *et al.*, 2024).

De façon générale, l'interaction entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement mécanique, notamment la rigidité membranaire, joue un rôle fondamental dans la régulation de la prolifération, de la migration et de la résistance des cellules cancéreuses. Les travaux de Yeh *et al.* (2012) sur la régulation de la prolifération des cellules endothéliales via la rigidité du substrat mettent en évidence l'importance de la voie Src/Vav2/RhoA dans ce processus. L'influence de la rigidité membranaire sur l'activation de la signalisation cellulaire, comme celle du RhoA, pourrait également avoir des implications dans la prolifération des cellules leucémiques et des CSC dans le mélanome. Cela pourrait influencer leur capacité à résister aux thérapies et à persister dans la MRD. Les cellules leucémiques ou de mélanome qui persistent dans la MRD pourraient utiliser des mécanismes de réponse à leur microenvironnement mécanique pour maintenir leur survie et leur état de quiescence, échappant ainsi aux thérapies conventionnelles.

Nos analyses multi-omiques ont révélé des marqueurs communs, tels que SEPTIN-9 et CAPG, dont l'expression est augmentée dans les deux types de cancers étudiés. Ces protéines, impliquées dans l'organisation cytosquelettique, pourraient jouer un rôle dans les mécanismes de plasticité des cellules dormantes.

Liu *et al.* (2024) ont mené des études sur l'axe FYB1/CAPG dans la LAM et sur la régulation mécanique des cellules cancéreuses dans le mélanome. Ils ont mis en lumière de nouveaux potentiels pour cibler la MRD. En inhibant spécifiquement FYB1 ou CAPG, ou en perturbant la réponse des cellules cancéreuses à leur microenvironnement mécanique (rigidité membranaire), il pourrait être possible de surmonter la résistance aux traitements et d'éliminer plus efficacement les cellules responsables de la rechute. Des thérapies basées sur la modulation des propriétés mécaniques des cellules ou sur des inhibiteurs ciblant les voies de signalisation impliquées (comme la voie NF- κ B activée par CAPG et jouant un rôle dans la LAM (Ma *et al.*, 2023)) pourraient compléter les approches actuelles pour traiter les patients présentant une MRD. En parallèle, la compréhension des relations entre la rigidité membranaire et la régulation des CSC dans le mélanome pourrait offrir de nouvelles pistes pour cibler la persistance des cellules souches tumorales dans la MRD.

Par ailleurs, des études récentes ont montré que le passage de la dormance à la croissance métastatique peut être influencé par des signaux épigénétiques provenant du microenvironnement. Par exemple, Barkan *et al.* (2010) ont démontré que l'expression de certaines protéines, telles que p16 et p27, est élevée dans les

cellules dormantes, contribuant à leur arrestation dans le cycle cellulaire. De plus, la transition de la quiescence à la prolifération peut dépendre de la production de fibronectine et de la signalisation via l'intégrine $\beta 1$, entraînant une réorganisation du cytosquelette avec la formation de fibres de stress d'actine. Ces mécanismes suggèrent que les cellules tumorales peuvent passer d'un état dormant à un état prolifératif en réponse à des modifications de leur environnement. Des analyses fonctionnelles, telles que le western blot, la RT-qPCR et les siARN, pourraient valider l'implication de SEPTIN-9 et CAPG dans la dormance et la plasticité, tout en offrant de nouvelles pistes thérapeutiques pour perturber ces mécanismes. En ciblant les voies de signalisation et les structures cytosquelettiques qui régulent cette plasticité, il serait possible d'inhiber la transition de l'état dormant à l'état prolifératif, ce qui pourrait améliorer l'efficacité des traitements contre la rechute.

Perspectives de recherche : la réorganisation cytosquelettique dans la dormance tumorale et possiblement les DTP

Nos analyses mettent en lumière la complexité de ces cellules, renforçant l'idée que la réorganisation cytosquelettique pourrait être un mécanisme clé à explorer.

Les avancées technologiques, telles que le traçage des lignées cellulaires et les approches multi-omiques à cellule unique, permettent d'étudier la dynamique des cellules résiduelles avec un niveau de détail sans précédent. Ces outils facilitent la capture des états cellulaires transitoires et réversibles des cellules résiduelles, ouvrant la voie à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui soutiennent leur survie en dormance. L'analyse des données d'échantillons tumoraux hétérogènes

à cellule unique est possible par l'usage de logiciels tels que Conos ou encore cellAlign (Alpert *et al.*, 2018 ; Rawbow *et al.*, 2018 ; Barkas *et al.*, 2019).

Une piste intéressante de recherche serait d'explorer comment la réorganisation cytosquelettique, potentiellement médiée par des marqueurs comme SEPTIN-9 et CAPG, influence la transition entre les états pré et post-dormance de nos cellules. En effet, il serait pertinent de déterminer si et comment les modifications de la structure cytosquelettique sont régulées par des signaux du microenvironnement, et quel impact cela a sur la plasticité phénotypique des cellules.

De plus, des études antérieures ont montré que l'activation transcriptionnelle et le "priming épigénétique" — un processus par lequel des modifications épigénétiques préparent les cellules à des réponses spécifiques lors de stimuli — sont liés à la transition vers des états de DTP (Marsolier *et al.*, 2022). Il serait enrichissant d'étudier comment la réorganisation cytosquelettique interagit avec ces mécanismes de priming pour influencer la capacité des cellules à s'adapter à des environnements changeants.

Les recherches pourraient également être complétées par l'utilisation de divers modèles d'étude *in vitro* et *in vivo*, comme les cultures en 3D, les organoïdes ou les modèles PDX, afin d'appréhender les mécanismes complémentaires en jeu. Les systèmes de BIOMEMS (*Biomolecular Electronic Systems*) peuvent aussi offrir un environnement contrôlé pour étudier les interactions cellule-cellule et cellule-microenvironnement, ce qui permettrait d'explorer les réponses des DTP dans des conditions plus physiologiques.

Il serait complémentaire et bénéfique d'explorer comment les traitements anticancéreux induisent des changements dans la structure cytosquelettique et la plasticité des DTP. En identifiant les mécanismes par lesquels ces traitements affectent les cellules DTP, nous pourrions découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer les résultats cliniques. L'intégration de technologies comme l'imagerie en temps réel et les approches de génotypage à cellule unique pourrait fournir des informations précieuses sur l'acquisition de la tolérance médicamenteuse et de la résistance, en mettant l'accent sur la réorganisation cytosquelettique comme un point d'intervention potentiel.

Enfin, des études longitudinales sur la dynamique des cellules résiduelles en réponse aux traitements pourraient révéler des cibles thérapeutiques qui perturbent les mécanismes de dormance et de tolérance médicamenteuse. Cette approche pourrait non seulement éclairer les bases moléculaires de la dormance tumorale, mais aussi contribuer au développement de stratégies innovantes pour prévenir la récurrence tumorale.

Malgré ses limites, cette étude offre une perspective innovante concernant la recherche sur la MRD, en exploitant des modèles syngéniques tout en tenant compte du contexte immunitaire. Ces résultats fournissent une base solide pour de futures investigations et pour le développement de stratégies plus efficaces contre la MRD dans le cancer. Nos découvertes suggèrent que les modèles murins imitent étroitement les conditions des patients, fournissant des perspectives précieuses sur les signatures génétiques et protéiques de la MRD. Comprendre ces mécanismes pourrait orienter le développement de stratégies thérapeutiques pour aborder la MRD chez les patients atteints de leucémie et de mélanome.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

**DECIPHERING GENETIC AND NONGENETIC FACTORS UNDERLYING TUMOUR
DORMANCY: INSIGHTS FROM MULTIOMICS ANALYSIS OF TWO SYNGENEIC
MRD MODELS OF MELANOMA AND LEUKEMIA**


BMC BIOLOGICAL RESEARCH

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Deciphering genetic and nongenetic factors underlying tumour dormancy: insights from multiomics analysis of two syngeneic MRD models of melanoma and leukemia

Marie-Océane Laguillaumie^{1,2†}, Sofia Titah^{1,2†}, Aurélie Guillemette¹, Bernadette Neve¹, Frederic Leprêtre³, Pascaline Ségard¹, Faruk Azam Shaik^{4,5}, Dominique Collard^{4,5}, Jean-Claude Gerbedoen^{4,5,6}, Léa Fléchon¹, Lama Hasan Bou Issa¹, Audrey Vincent¹, Martin Figeac³, Shéhérazade Sebda³, Céline Villenet³, Jérôme Kluza¹, William Laine¹, Isabelle Fournier⁷, Jean-Pascal Gimeno⁷, Maxence Wisztorski⁷, Salomon Manier¹, Mehmet Cagatay Tarhan^{5,6,8}, Bruno Quesnel¹, Thierry Idziorek¹ and Yasmine Touil^{1*} 

Abstract

Background Tumour dormancy, a resistance mechanism employed by cancer cells, is a significant challenge in cancer treatment, contributing to minimal residual disease (MRD) and potential relapse. Despite its clinical importance, the mechanisms underlying tumour dormancy and MRD remain unclear. In this study, we employed two syngeneic murine models of myeloid leukemia and melanoma to investigate the genetic, epigenetic, transcriptomic and protein signatures associated with tumour dormancy. We used a multiomics approach to elucidate the molecular mechanisms driving MRD and identify potential therapeutic targets.

Results We conducted an in-depth omics analysis encompassing whole-exome sequencing (WES), copy number variation (CNV) analysis, chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq), transcriptome and proteome investigations. WES analysis revealed a modest overlap of gene mutations between melanoma and leukemia dormancy models, with a significant number of mutated genes found exclusively in dormant cells. These exclusive genetic signatures suggest selective pressure during MRD, potentially conferring resistance to the microenvironment or therapies. CNV, histone marks and transcriptomic gene expression signatures combined with Gene Ontology (GO) enrichment analysis highlighted the potential functional roles of the mutated genes, providing insights into the pathways associated with MRD. In addition, we compared “murine MRD genes” profiles to the corresponding human disease through public datasets and highlighted common features according to disease progression. Proteomic analysis combined with multi-omics genetic investigations, revealed a dysregulated proteins signature in dormant cells with minimal genetic mechanism involvement. Pathway enrichment analysis revealed the metabolic, differentiation and cytoskeletal remodeling processes involved in MRD. Finally, we identified 11 common proteins differentially expressed in dormant cells from both pathologies.

[†]Marie-Océane Laguillaumie and Sofia Titah are considered joint first authors.

*Correspondence:

Yasmine Touil

yasmine.touil@inserm.fr

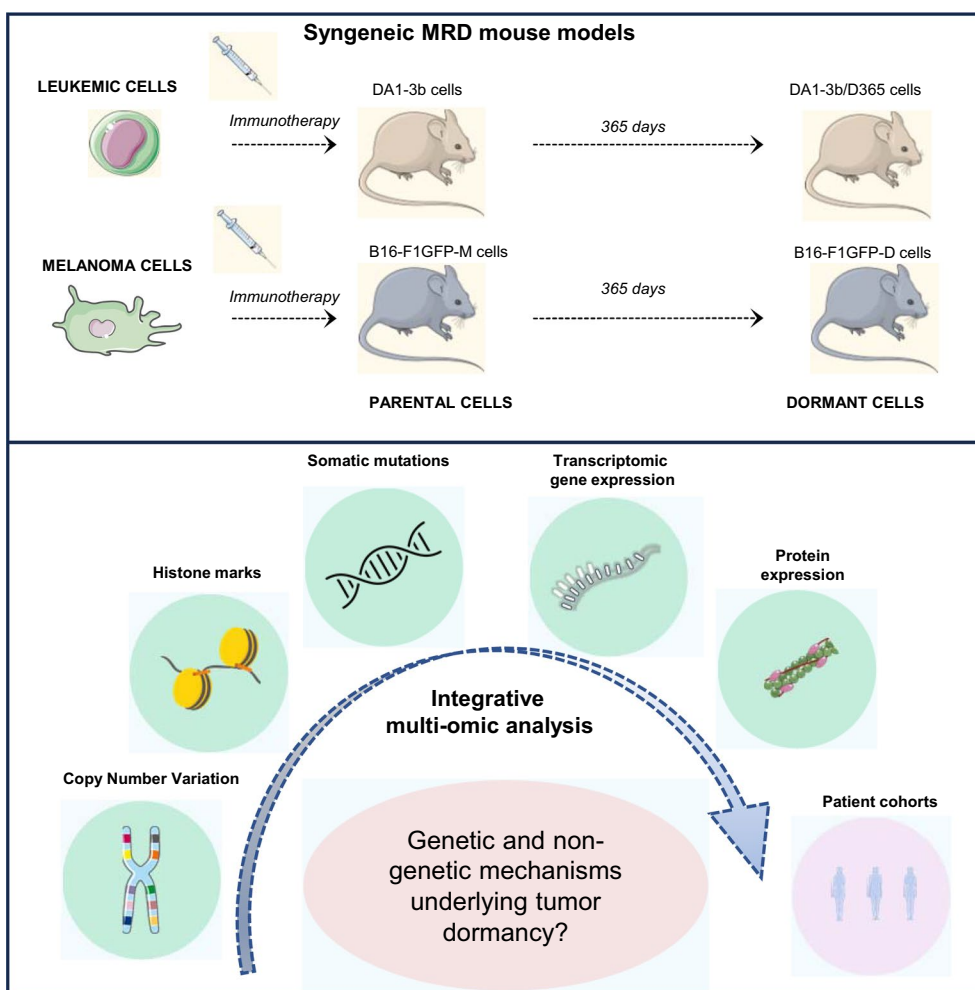
Full list of author information is available at the end of the article



Conclusions Our study underscores the complexity of tumour dormancy, implicating both genetic and nongenetic factors. By comparing genomic, transcriptomic, proteomic, and epigenomic datasets, our study provides a comprehensive understanding of the molecular landscape of minimal residual disease. These results provide a robust foundation for forthcoming investigations and offer potential avenues for the advancement of targeted MRD therapies in leukemia and melanoma patients, emphasizing the importance of considering both genetic and nongenetic factors in treatment strategies.

Keywords Tumour dormancy, Leukemia, Melanoma, Syngeneic model, Multiomics analysis, ChIP-seq, Whole exome sequencing, Copy number variation

Graphical Abstract



Introduction

Tumour dormancy is one of the resistance mechanisms that tumour cells use to persist within the body for extended periods, spanning months to even years [1–3]. Their occurrence is observed in healthy individuals and cancer patients, and persists even after treatment [4,

5]. Dormant cancer cells are able to escape the immune system and resist therapies; this event is termed minimal residual disease (MRD) [1, 2, 6]. Given that tumour dormancy contributes markedly to relapse, a thorough knowledge of its mechanisms is crucial for developing

effective therapeutic strategies aimed at improving patient outcomes.

MRD phenomenon has been described in both solid tumours and hematologic malignancies [1, 6]. Generally, intra- and interpatient tumour heterogeneity arises from mutations, which can impact patient outcomes and be useful prognostic indicators for therapeutic decisions. However, the specific influence of these mutations on tumour dormancy remains unclear. In addition, the limited number of studies describing MRD models did not reveal sufficient knowledge of tumour dormancy mechanisms [7]. Although studies have revealed robust specific signatures of dormant or residual cells, the data are often limited to DNA and/or RNA sequencing minimizing the complexity between the MRD process and the immune system [8–10].

In this context, our laboratory has developed two syngeneic mouse models of myeloid leukemia and melanoma tumour dormancy. As previously described, these models were established through cellular vaccination with irradiated cells overexpressing interleukin-12 (IL-12) or granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), in leukemia and melanoma respectively [11, 12]. With the DA1-3b leukemic model, we isolated dormant cells at different time point during the MRD process [11]. Similarly, we established B16-F1 murine model of dormant melanoma cells [12]. In addition to the previously highlighted resistance features observed in dormant cells from these two models, such as immune check-point expression (DA1-3b) or a stem cell-like phenotype (B16-F1) [11, 12], a deep investigation at genetic and nongenetic level was needed to unveil the intricate process of MRD. Moreover, we have previously shown shared key pathways between melanoma B16-F1 and leukemia DA1-3b models related to their aggressiveness features [13]. Thus, we proposed here to decipher mechanisms underlying MRD in these two distinct models to unveil common processes and therefore a potential “universal” tumor dormancy signature, regardless of tissue origin.

Using these two MRD models, we conducted a multiomics analysis including whole exome sequencing (WES) followed by targeted deep sequencing, copy number variation (CNV), chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq), transcriptomic and proteomic analysis. This approach aimed to elucidate the mechanisms underlying MRD in an immune system context, in order to characterize the tumour dormancy complexity and clarify how genetic and/or nongenetic events could play a role in MRD. This investigation marks the initial attempt to perform a multiomics approach based on dormant cells from syngeneic mouse models, therefore emphasizing specific genetic and nongenetic signatures. In this study, we revealed the potential impact of

mutated genes through their transcriptomic gene expression and involvement in signaling pathways. Regarding the proteomic signature of dormant cells, we identified dysregulated proteins involved in crucial pathways such as metabolism, differentiation and cytoskeleton reorganization. Although these two MRD models featured distinct signatures, 11 proteins were found to be commonly dysregulated in the melanoma and leukemia dormancy models. We also compared the murine MRD signature with corresponding human disease public datasets and revealed common features, reinforcing the translational potential of our MRD models.

Results

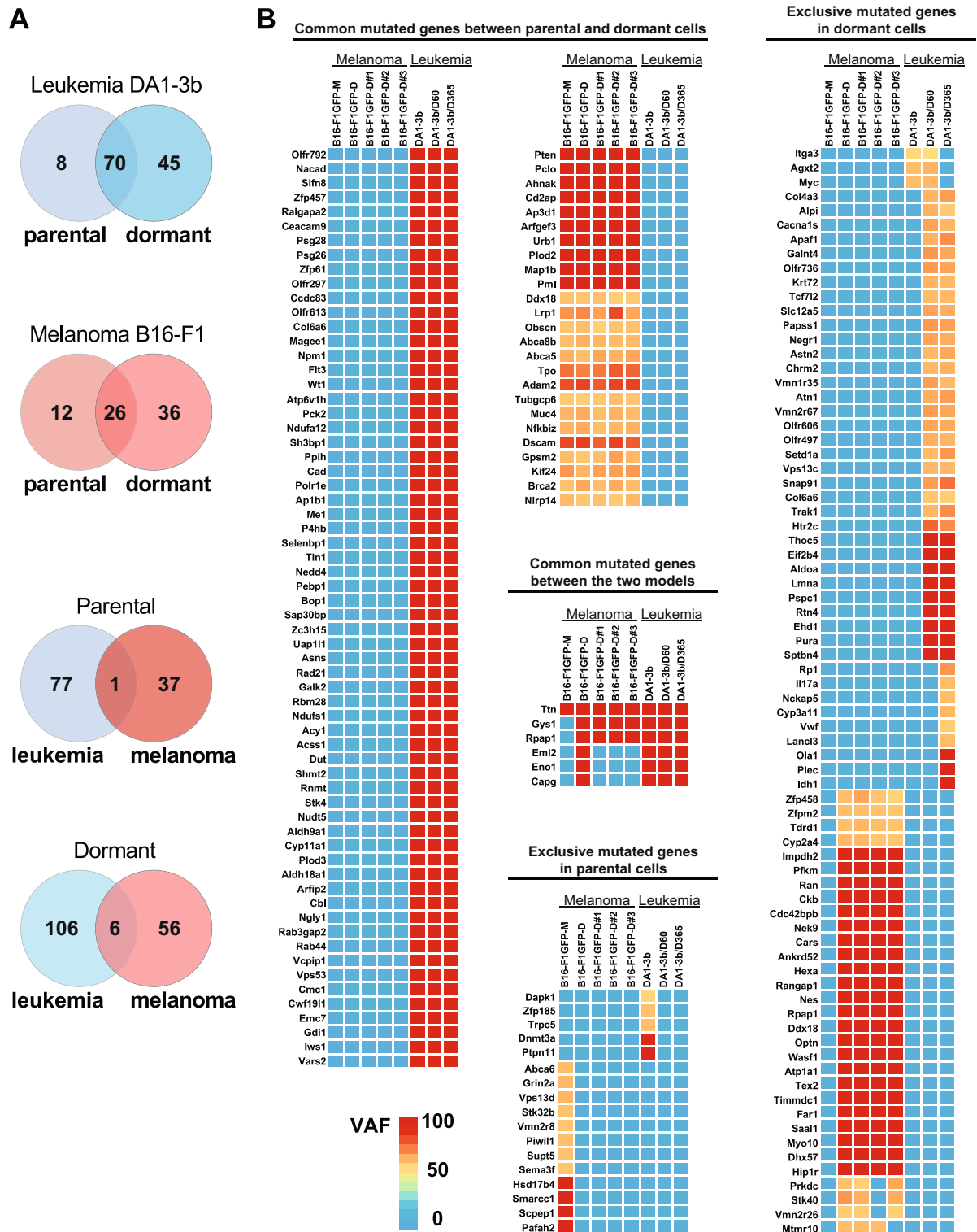
Identification of significantly mutated genes in murine models of dormant leukemia and melanoma

To determine whether therapeutic resistance arises from persistent or MRD cells through genetic mechanisms, we first compared the results of WES of dormant murine melanoma and leukemia (B16-F1GFP-D and DA1-3b/D365, respectively) cells to those of their parental cells (B16-F1GFP-M and DA1-3b). WES identified 218,914 variants in the whole samples, leading to 22,602 variants after filtering for quality and the normal genetic background. Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) algorithm prediction identified 190 significantly mutated genes (SMGs) (Additional file 1; Table S1-a). The SMGs identified in our mouse models included well-described melanoma and leukemia oncogenes and tumour suppressors (*Muc4*, *Pten*, *Grin2a*, *Dnmt3a*, *Npm1* and *Flt3*) [14–16] reinforcing the WES validation and the subsequent filtering of SMGs.

To validate SMGs and monitor gene harbouring mutation during MRD process, targeted sequencing was subsequently performed at various timepoints of the dormancy period in both models. In the murine leukemia model, targeted mutation monitoring was performed on Day 60 and Day 365 of dormancy (DA1-3b/D60 and DA1-3b/D365 cells respectively). Similarly, dormant melanoma B16-F1 cells were analysed on Day 365 of dormancy (B16-F1GFP-D) and during subsequent “generation” in a cell-derived brain site (B16-F1GFP-DB#1, #2, and #3 cells).

Through Venn diagrams, we visualized the number of shared or exclusively mutated genes based on the dormancy or parental state and the tumour type (Fig. 1A). Although a limited number of genes harbour mutations (six genes) overlapped between the melanoma and leukemia dormancy models (Fig. 1A, B), a notable number of mutations were exclusively found in dormant cells from both models (Fig. 1A, B).

In dormant DA1-3b/D365 cells, among the “dormancy” exclusive mutated genes, we observed 42 mutations



potentially resulting in amino-acid (AA) changes. One frameshift mutation and three nonsense mutations were detected in the *Pcp1* (M443X), *Tcf7l2* (R442*), *Chrm2* (Q358*) and *Atn1* (Q153*) genes. Regarding exclusively mutated genes in dormant melanoma B16-F1GFP-D cells, we observed 34 mutations that may lead to AA changes, while two nonsense mutations were observed in the *Cars* (W416*) and *Stk40* (Q386*) genes (Additional file 1, Table S1-a).

Specifically, approximately 48% vs. 6% of the targeted sequenced genes exclusively exhibited mutations in dormant versus parental melanoma cells, while in leukemia cells, this ratio was approximately 34% vs 17%. Despite identifying various common genes with mutations in both dormant and parental states within each model individually (Fig. 1B), signifying shared molecular characteristics, the MRD status might preferentially select clones with specific mutated genes (distinct between our 2 MRD models) conferring potential resistance against the microenvironment or therapies. The presence of exclusive gene mutations in parental cells in both models suggests the potential existence of the original dormant clones among the parental counterparts. On the other hand, exclusive gene mutations in dormant cells may indicate two potential scenarios: the acquisition of additional mutations during the MRD process and/or the existence of original mutations in preexisting dormant clones that were not technically detected by targeted sequencing among the heterogeneous parental clones.

To assess mutation clonality, Variant Allelic Frequency (VAF), serves as a metric of the representing the fraction of alleles carrying a specific genetic alteration, thus acting as a surrogate for mutation clonality [17]. Most mutations detected within dormant cells in both models exhibited high VAF values (>50–100%), indicating that a substantial portion of cells harbour specific genetic alterations or mutations.

When we examined the genetic evolution of MRD, we found that dormant melanoma B16-F1GFP-D cells exhibited consistent genetic characteristics regardless of the dormancy/MRD duration. The genetic mutation signatures in the second generation of dormant melanoma cells (B16-F1GFP-DB#1, B16-F1GFP-DB#2, and B16-F1GFP-DB#3) were similar to those observed during the initial stage of dormancy analysis (B16-F1GFP-D). Conversely, in the murine leukemia model, subtle but noticeable differences in the number of gene mutations (nine genes) were identified between Day 60 and Day 365 of the dormancy process (Fig. 1B). From a genetic evolutionary perspective, it appears that MRD in the melanoma model could emerge from a pre-existing clone selection, whereas in the leukemia model, mutations may arise during the dormancy period.

Multi-omics analysis of mutated genes revealed potential genetic implication for the dormancy phenotype in leukemia and melanoma models

To better define the genetic signatures of the dormant cells from our two MRD models, we performed multi-omics analysis and integrated the resulting CGH analysis (CNV), ChIP-seq (histones post-translational modifications), and transcriptomic gene expression data (Fig. 2, Additional file 1, Table S1-b).

Although the global CNV pattern at the arm level did not differ between dormant and parental cells in either model (Additional file 2, Fig.S1), several focal segments containing genes harbouring mutations were differentially amplified, deleted, or without any CNV alterations between the two conditions (parental and dormant status) (Additional file 1, Table S1-b).

We first analysed the DA1-3b leukemia model and among the 70 commonly mutated genes in dormant leukemia DA1-3b/D365 and parental DA1-3b cells, ten genes (*Ttc7b*, *Dnmt3b*, *Ap1b1*, *Ne1*, *Nedd4*, *Acy1*, *Cyp11a1*, *Htr2c*, *Magee1* and *Gdi1*) were amplified in dormant and parental cells (Fig. 2A). In addition, CNV loss was observed for *Magee1* and *Gdi1* regardless of the parental or dormant status of the cells. For 55 mutated genes, no amplification or deletion was noted in either dormant or parental leukemia cells. These observations highlighted the minimal impact of tumour dormancy on CNV for these indicated mutated genes.

In contrast, we identified CNV alterations of several mutated genes according to the dormant or parental status of the leukemic cells, signifying a specific genetic signature of dormant cells. For instance, *Aldh18a1* and *Cwf19l1* commonly mutated genes exhibited CNV amplification exclusively in the parental cells, while *Vars2* and *Eno1* showed exclusive amplification in the dormant cells and CNV loss in the parental cells respectively. Among the genes exclusively mutated in DA1-3b/D365 dormant cells, four genes (*Trak1*, *Prps11l*, *Thoc5* and *Ehd1*) were amplified and three genes (*Lancl3*, *Fam3a* and *Htr2c*) shared by parental and dormant cells were deleted. Furthermore, the *Tcf7l2* and *Aldoa* genes displayed CNV amplification exclusively in the parental cells, while the *Vps13c* and *Snap91* genes were exclusively amplified in the dormant cells. Finally, for genes exclusively mutated in parental DA1-3b cells, two genes (*Zpf185* and *Trpc5*) exhibited deletions in both parental and dormant cells. Overall, integrative analysis of several commonly or exclusively mutated genes with differential CNV alterations according to the dormant or parental status of the leukemic cells allowed us to highlight/reveal genetic process (mutation pattern and CNV) for a subset of genes in the tumour dormancy or MRD context.

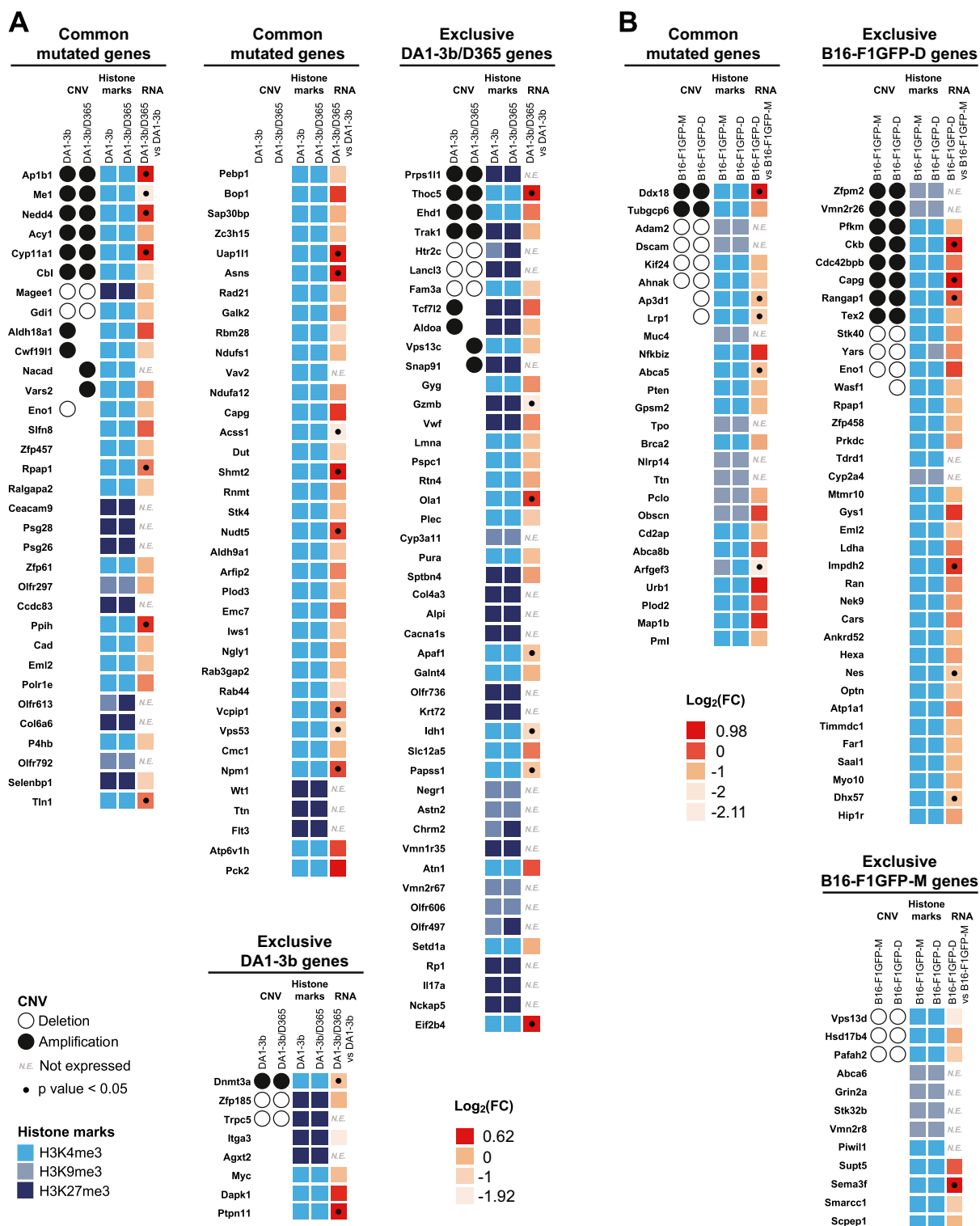


Fig. 2 Heatmaps of the results of the CNV, histone marks, and transcriptomic gene expression analyses of MRD mutated genes. The CGH results are represented by a black circle for amplification, while deletions are denoted by an empty circle. H3K4me3 epigenetic active codes are depicted in bright blue, H3K9me3 in grey-blue, and H3K27me3 in navy blue. Transcriptomic gene expression is depicted by a colour gradient relative to Log₂ (fold change) varying from light orange for lower expression to red for higher expression. The fold change represents differential gene expression between dormant and parental cell conditions. Significant transcriptomic values (p < 0.05) are indicated with a dot. Each experiment was repeated three times. **A** Heatmap of the leukemia model DA1-3b. **B** Heatmap of the B16-F1 melanoma model

As we conducted WES to identify variants, except for mutations that lead to a nonsense AA, uncovered and filtered mutations were not found to be associated with regulatory sequences and therefore not directly linked to gene expression regulation. In contrast, the description of CNV signature of mutated genes in dormant leukemic cells may have a strong impact on gene expression.

To better understand the functional impact of the genetic signature (mutations and CNV) in the MRD process and uncover the regulatory mechanisms governing the expression of mutated genes, we performed additional analyses of epigenetic patterns combined with transcriptomic gene expression data. Regarding the epigenetic signature among mutated genes in the leukemia model, we focused on histone posttranslational modifications such as H3K4, H3K9, and H3K27 trimethylation (-me3) which reflect active (H3K4) and repressive (H3K9 and H3K27) gene transcription, respectively [18]. The greatest enrichment of H3K4me3 epigenetic modifications was observed for mutated genes shared by both parental and dormant cells. Among genes exclusively mutated in DA1-3b/D365 dormant cells, 40% (18 out of 45) were enriched with H3K27me3 modifications, a pattern conserved in both dormant and parental cells. In contrast, for genes that were exclusively mutated in the parental DA1-3b cells, 50% (four out of eight) displayed H3K27me3 repressive histone marks, while the remaining genes exhibited H3K4me3 active pattern. As histone marks are closely related to the regulation of gene expression, we examined transcriptomic gene expression and observed its variability among mutated genes mainly according to the corresponding epigenetic pattern. As expected, 26 out of 36 and seven out of 11 mutated genes enriched with H3K27me3 and H3K9me3 repressive epigenetic code, respectively, displayed no RNA transcription, while only two out of 81 mutated genes enriched with H3K4me3 active marks showed no transcriptomic gene expression (Fig. 2A).

Notably, in the DA1-3b/D365 dormant cells, the mutated genes whose expression was most strongly compared to that in the parental cells, included *Nudt5*, *Shmt2*, *Asns*, *Pck2*, *Eno1*, *Npm1*, and *Bop1*, with the first five genes known for their involvement in metabolic pathways. *Thoc5*, *Eif2b4*, and *Ola1* overexpressing mutated genes were found exclusively in DA1-3b/D365 dormant cells. In contrast, among genes exclusively mutated in the DA1-3b parental cells, *Ptpn11* and *Dapk1* were the most highly expressed genes (Fig. 2A). Although the expression of mutated genes may have an impact without overexpression, these upregulated mutated genes were predominantly not related to CNV gain or loss pattern differences highlighting a further complex mechanism or combined nongenetic

and genetic mechanisms contributing to the MRD phenomenon.

A similar multiomics approach was conducted with the identified mutated genes in the murine melanoma MRD model. Among the 26 shared mutated genes in melanoma B16-F1GFP-D and B16-FGFP-M cells, two genes (*Ddx18* and *Tubgcp6*) were amplified in both parental and dormant cells (Fig. 2B). CNV loss was observed for the *Adam2*, *Dscam*, *Kif24* and *Ahnak* genes in both parental and dormant cells. No genomic alterations were revealed in either dormant or parental melanoma cells for 18 commonly mutated genes including oncogenes or tumour suppressor genes such as *Pten*, *Brca2*, or *Pml*. As observed for the leukemia MRD model, our results revealed a minimal impact of melanoma dormancy on CNV for these particular mutated genes.

Conversely, the two *Lrp1* and *Ap3d1* mutated genes shared by in both dormant and parental cells, exhibited CNV deletions exclusively in dormant cells. Among genes exclusively mutated in B16-F1GFP-D dormant cells, eight genes (*Zpfn2*, *Vmn2r26*, *Pfkm*, *Ckb*, *Cdc42bpb*, *Capg*, *Rangap1* and *Tex2*) were amplified, and three genes (*Stk40*, *Yars* and *Eno1*) shared by parental and dormant cells were deleted. In addition, *Wasp1* displayed CNV deletion exclusively in dormant cells. With respect to genes that were exclusively mutated in the parental B16-F1GFP-M cells, three genes (*Vps13d*, *Hsd17b4* and *Pafah2*) exhibited deletions in both the parental and dormant cells. As observed in the leukemia model, identification of several mutated genes combined with differential CNV alterations according to the dormant or parental status highlighted genetic involvement underlying the MRD context.

We next adopted a similar strategy for the melanoma model and performed additional analysis regarding epigenetic patterns combined with transcriptomic gene expression. The greatest enrichment of H3K4me3 epigenetic modifications was observed with 17 mutated genes shared by both parental and dormant cells. Among the genes exclusively mutated in the B16-FGFP-D dormant cells, 8% (three out of 36) were enriched with H3K9me3 modifications, a pattern conserved in both cell lines. In contrast, for genes exclusively mutated in parental DA1-3b cells, 30% (four out of 13) displayed H3K9me3 repressive histone codes, while the remaining genes exhibited H3K4me3 active marks. As expected, 13 out of 15 mutated genes enriched with the H3K9me3 repressive epigenetic code demonstrated no transcriptomic gene expression. In comparison, only one out of 56 mutated genes enriched with the H3K4me3 active mark were not detected (Fig. 2A).

Overall, although the global CNV and/or epigenetic profiles were essentially identical between dormant and

parental cells in both leukemia and melanoma models, the identification of specific mutated gene signatures in dormant cells associated with a differential CNV pattern can highlight the genetic mechanisms underlying the MRD phenomenon. The functional impact of the identified mutated genes and/or the regulation of their expression may shape the dormant cell phenotype in both MRD models. Despite the fact that tumour dormancy involved equivalent genetic implication in both models, i.e., not identical mutated genes but rather similar multiomics signature, we observed a significant difference in the percentage of mutated gene exclusively expressed in dormant cells: 89% vs. 56% in leukemia and melanoma respectively.

Mutated genes were involved in signalling pathways

In our study models, we first defined GO based on the molecular functions, biological pathways, and cytological components associated with gene products. By conducting GO enrichment analysis, we aimed to elucidate how genes with mutations in both parental and dormant cells in the MRD models are functionally linked.

Our results revealed 12 significantly enriched terms for commonly mutated genes in parental leukemia cells and two in parental melanoma cells. Additionally, only genes with mutations in dormant cells were significantly enriched in two and nine pathways in the DA1-3b/D365 and B16-F1GFP-D models, respectively. Interestingly, no enrichment was observed among exclusively mutated genes in melanoma parental cells, except for one significant GO term in leukemia DA1-3b counterpart cells (Fig. 3A, B).

The exclusively mutated genes in DA1-3b/D365 cells were enriched in biological functions such as “cadherin binding” and “cell adhesion molecule binding”. The exclusively mutated genes in B16-F1GFP-D were enriched in various biological functions, including “small molecule binding,” “nucleotide binding,” “catalytic activity,” and “enzyme binding”.

Genetic profiles of the “murine MRD mutated gene signature” in human leukemia and melanoma diseases

To determine the possible implication in human disease of the mutated genes through our murine MRD models, we analysed the frequency of mutations in these in human acute myeloid leukemia (AML) and primary and metastatic melanoma tumours. The results were extracted from several patient cohorts (n=207 for AML patients and n=489 for melanoma patients) in public datasets (GDC portal) that combined exome sequencing data. The frequencies of mutated genes in human samples among the genes found to be mutated in murine

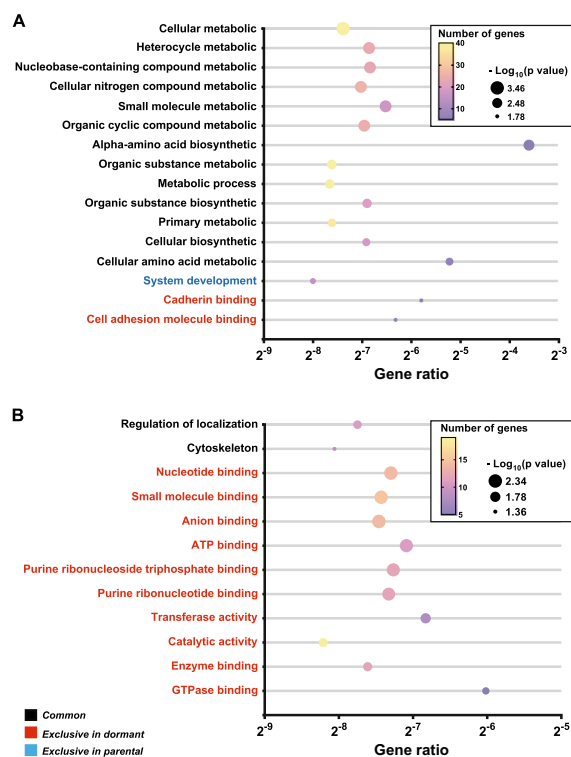


Fig. 3 Bubble plots of pathway enrichment analysis with MRD mutated genes in the DA1-3b (A) and B16-F1 (B) models. Pathways are classified (colours black, red and blue) according to the common and exclusive mutated genes in the dormant and parental cells. The number of genes indicates the number of mutated genes enriched in the pathway (colour plasma gradient). The “Gene Ratio” indicates the ratio of enriched mutated genes to background genes. Bubble size is according to the p value ($-\log_{10}$ scale) of pathway enrichment

models of leukemia (Fig. 4A) or melanoma (Fig. 4B) were noted (Additional file 1, Table S1-c).

Only data corresponding to the diagnosis of AML were documented. Among the genes exclusively mutated in the dormant model, only the *IDH1* gene was highly frequently mutated (10.63%) in human AML samples while the remaining genes were mutated either at a low frequency (under 1.5%) or not at all (Fig. 4A). Although several genes (40 genes) identified among commonly mutated genes in murine dormant and parental cells were not genetically affected in human AML, a substantial number of genes (21 genes) displayed mutations, including 6 genes with moderate to high frequencies. As expected, the most frequently mutated genes were *DNMT3A* (19.32%) and *NPM1* (20.29%), followed by *FLT3* (13.53%) which is consistent with the AML mutation landscape [14] as shown in Additional file 1, Table S1-d, reinforcing the relevance of our DA1-3b leukemia model for future translational applications in humans. Additionally, *PTPN11* (6.76%) was one of the most frequently mutated genes in human AML samples

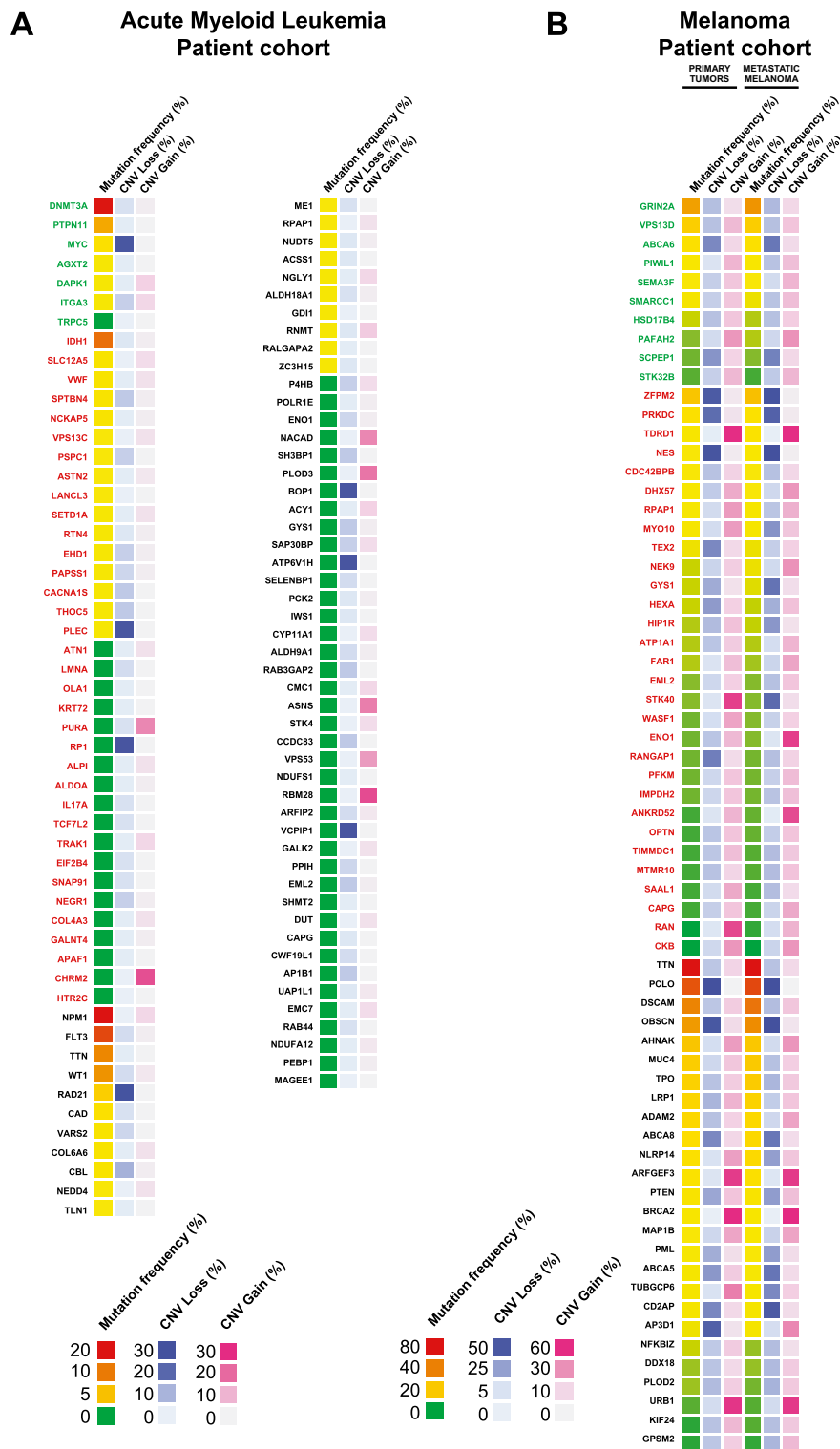


Fig. 4 Heatmaps of “MRD genes” corresponding to genetic profiles in human AML (A) and melanoma (B) patients. The frequencies of mutated genes and associated CNVs (loss and gain) are expressed as percentages and reflect the number of patients affected among the total patients in the corresponding AML and melanoma patient cohorts (n = 207, n = 489 for AML and melanoma, respectively). The values are represented by a distinct colour gradient. For human melanoma samples, the results are represented according to the stage of disease progression, i.e., primary or metastatic tumours. The data were extracted from the public domain GDC portal (NIH Institute) version 1.0. In the indicated list, commonly mutated genes are indicated in black letters, genes exclusive to dormant cells are shown in red letters, and genes exclusive to parental cells are displayed in green letters

and was also exclusively mutated in the murine parental model. In the literature, *PTPN11* is notably described for its significant role in leukemia development, where its mutations can lead to hyperactivation, causing proliferation of leukemic cells, therapy resistance, and survival [19].

Interestingly, despite the lack of mirroring regarding mutations in human AML, CNV analysis revealed that several genes mutated exclusively in dormant cells or under both conditions, were either amplified or deleted in human AML. Indeed, *PURA* (16.35%), *CHMR2* (23.08%), *NACAD* (16.35%), *PLOD3* (18.27%), *ASNS* (17.31%), *VPS53* (13.46%), and *RBM28* (24.04%) were particularly altered with CNV gain. Conversely, the *PLEC* (25.96%), *RPI* (26.92%), *RAD21* (27.88%), *BOPI* (25.96%), *ATP6VIH* (26.92%), and *VCPIP1* (26.92%) genes were strongly associated with CNV loss (Fig. 4A). Interestingly, the uncovered CNV alterations of these particular genes in human AML patients even at the time of diagnosis reinforced the impact of these “dormancy” gene signatures.

We next explored the mutation frequencies of “murine MRD genes” in human melanoma samples across all conditions, including primary tumour and metastatic stages (Fig. 4B). Overall, a similar trend was observed regardless of the condition (primary tumours, and metastatic melanoma). The most frequently mutated genes in human melanoma were those mutated in parental and dormant mouse cells (common genes), with up to 80% mutation rates for *TTN*, followed by *PCLO* (>52%), *DSCAM* (approximately 40%), and *OBSCN* (approximately 34%). *GRIN2A* followed among genes exclusive to the parental cells (approximately 32%). These genes are frequently mutated in human melanoma (Fig. S2), reinforcing the relevance of our B16-F1 murine model. Interestingly, several exclusively mutated genes in murine dormant cells such as *ZFPM2*, *PRKDC*, *TDRD1*, *NES*, *CDC42BPBD* and *HX57*, exhibited moderate to high frequencies of mutation in human melanoma.

Although the mutation frequency did not vary according to disease stage, the results were largely the same for CNV gains and losses. However, a substantial number of genes appeared to stand out. In the context of CNV gain, exclusively mutated genes in dormant cells such as *TEX2* were associated with a decrease in metastasis, as was *RANGAPI* (lack of 15%). Conversely, *STK40* showed an increase in metastasis (30.5%). Commonly mutated genes, such as *AP3DI*, demonstrated a pronounced disparity, with a significantly greater percentage observed in primary tumours (38% vs. 8% in metastatic stage). In the context of CNV loss, the analysis revealed notable patterns for “murine MRD genes”. *STK40* exhibited a disparity, as it increased in primary tumours (53.08%), such

as *RAN* (49.66%). In contrast, *ENO1* showed a substantial increase (51.72%) in metastases, as did *ANKRD52* (47.48%). These findings underscore the diversity of CNV gains and losses in “murine MRD genes”.

Even though analysis at the metastatic stage does not perfectly mimic the MRD signature in human melanoma, it helps to highlight genetic patterns of cells that have survived to anticancer treatment and/or in different microenvironments compared to those of primary tumours. Although the “murine MRD genes” mutation signature was not clearly enriched in human melanoma metastasis, this analysis revealed that for a few genes, the associated CNV alterations were correlated with the metastatic stage of the disease.

Differential protein expression in dormant leukemia DA1-3b/D365 cells sheds light on a distinct dominant nongenetic process in MRD

As the functional impact of the genetic signature reflected by expression of mutated genes could not define the exclusively dormant cell phenotype, we next conducted proteomic signature analysis of dormant leukemic cells to uncover potential differential and exclusive protein expression. We questioned which proteins were dysregulated in dormant cells and if identified mutated genes were expressed at the protein level and/or overlapped with the differentially proteins expressed.

Hence, mass spectrometry (MS) was used to analyse protein expression variations in dormant leukemia DA-1b/D365 cells. A total of 2,182 proteins were identified, with 118 proteins displaying significant differences in expression levels ($p < 0.01$) between DA1-3b/D365 and DA1-3b cells. Notably, 26 proteins were uniquely expressed in parental cells, while 25 proteins were exclusively detected in dormant cells (Fig. 5A) (Additional file 1, Table S1-e). Among 118 proteins with altered expression, 56 were upregulated, whereas 63 were downregulated specifically in dormant cells (Fig. 5B) (Additional file 1, Table S1-e).

To better define the proteomic signature of dormant leukemic cells, we conducted multiomics analysis combining CGH, epigenetic modification and transcriptomic gene expression data. Our objective was to determine how genetic or nongenetic mechanisms shape underlying mechanisms that lead to dormant signature/phenotype.

Among the upregulated proteins in the dormant cells, seven out of 56 genes showed amplification in both the parental and dormant cells, while seven genes were exclusively amplified in the parental cells. The remaining 42 corresponding genes were neither amplified nor deleted. Additionally, only *Psdm10* exhibited a deletion in both parental and dormant cells. Regarding proteins downregulated in dormant cells, eight proteins displayed

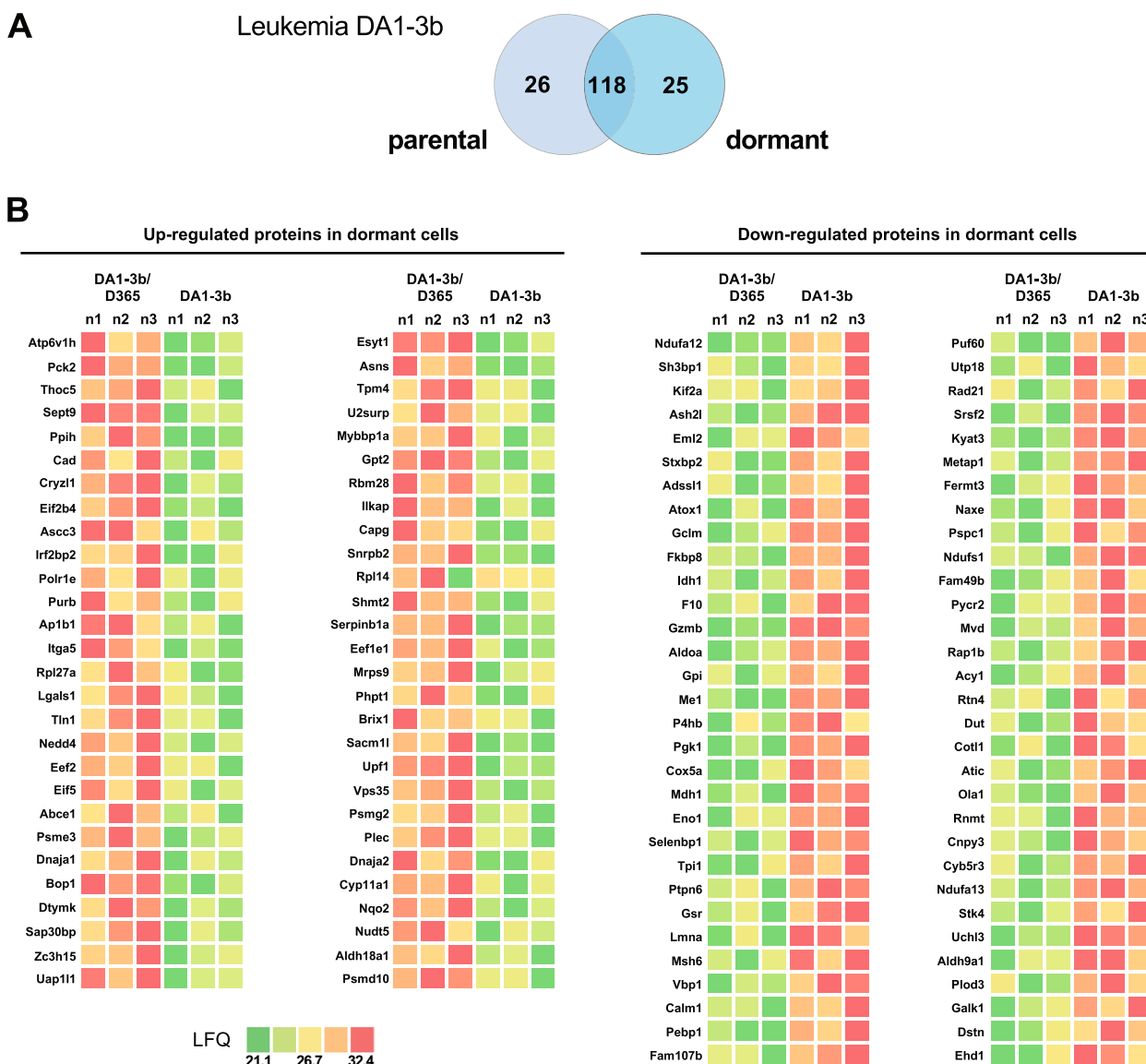


Fig. 5 Differential protein expression analysis in dormant leukemia DA1-3b cells compared to their parental cells. **A** Venn diagrams illustrating the number of commonly dysregulated and exclusive proteins according to the dormant or parental state of leukemia DA1-3b cells. A significance threshold of $P < 0.05$ was used for Student's *t* test with Perseus software. **B** Heatmaps illustrating upregulated (red colour gradient) and downregulated proteins (green colour gradient) in leukemia DA1-3b/D365 cells compared to their parental cells. The results are expressed as label-free quantification (LFQ) of proteins. The LFQ intensity was logarithmized ($\log_2[x]$). Three independent experiments ($n = 3$) were performed, and the resulting LFQs are shown

amplification in both cell lines, with nine exclusively amplified in parental cells and two solely in the dormant cells. The remaining 53 corresponding genes displayed no genomic alterations. Except for the nine exclusively amplified genes in parental cells, the CNV differential pattern between dormant and parental cells did not explain the differential protein expression. These observations highlighted the possible nongenetic mechanisms underlying the dysregulated proteomic signature of dormant leukemic cells (Fig. 6A).

We next conducted epigenetic modification analysis and H3K4me3, H3K9me3, and H3K27me3 epigenetic marks consistently revealed a pronounced prevalence of H3K4me3 modification in dormant and parental cells, with only four showing enrichment of the H3K27me3 repressive code across all genes. Among the proteins that were upregulated in dormant cells, 22 showed significantly increased RNA transcription. Specifically, among the upregulated proteins showing significantly increased transcriptomic expression

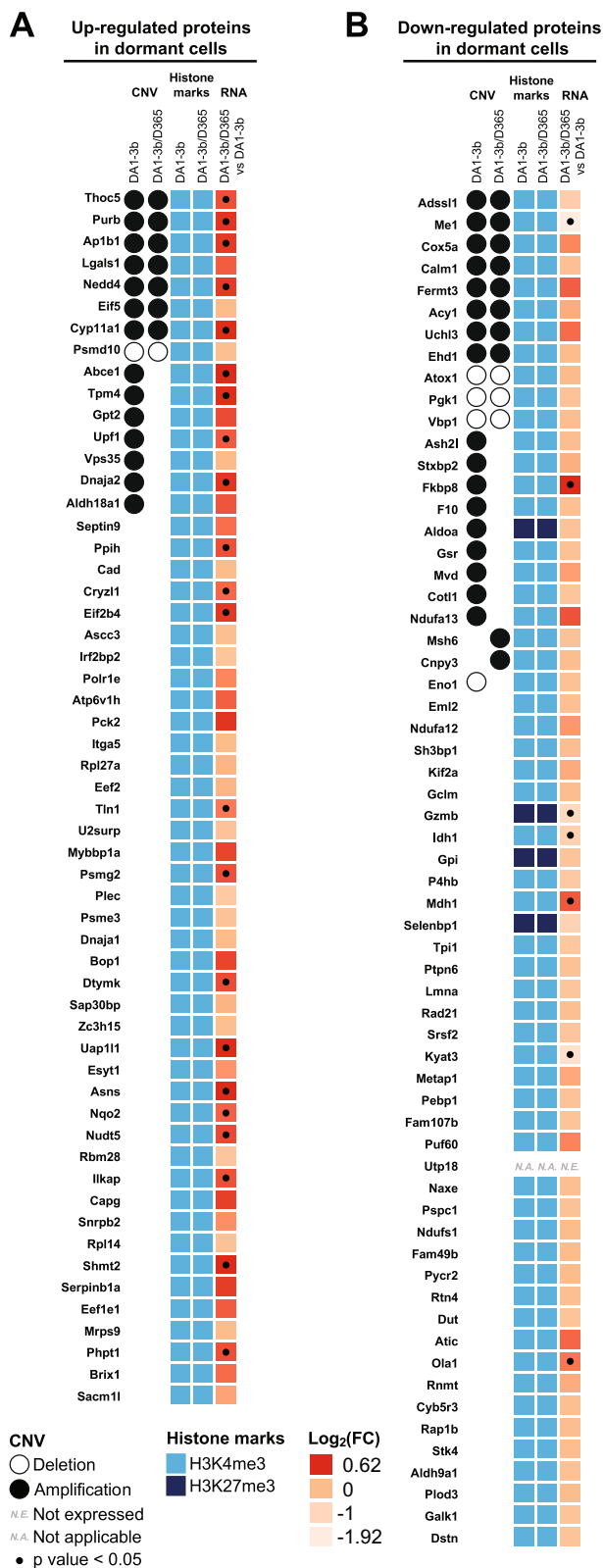


Fig. 6 Heatmaps of the results of CNV, histone marks and transcriptomic gene expression of dysregulated proteins in dormant leukemic DA1-3b/D365 cells compared to their parental cells. CGH results are represented by a black circle for amplification, while deletions are denoted by an empty circle. H3K4me3 epigenetic active codes are depicted in bright blue and H3K27me3 in navy blue. Transcriptomic gene expression is depicted by a colour gradient relative to Log₂ (fold change) varying from light orange for lower expression to red for higher expression. The fold change represents differential gene expression between dormant and parental cell conditions. Significant transcriptomic values (p < 0.05) are indicated with a dot. Each experiment was repeated three times. **A** Heatmap of the upregulated proteins in dormant cells. **B** Heatmap of the downregulated proteins in dormant cells

in dormant cells, the following proteins were notable: THOC5, PPIH, CRYZL1, PURB, AP1B1, TTN1, NEDD4, ABCE1, DTYMK, UAP1L1, ASNS, TPM4, ILKAP, SHMT2, PHPT1, UPF1, PSMG2, DNAJA2, CYP11A1, NQO2 and NUDT5. Among these proteins, DNAJA2, ASNS, SHMT2, DTYMK, and NUDT5 are involved in acetylation mechanisms influencing protein structure and gene expression. Additionally, DNAJA2, ASNS, DTYMK, NEDD4, ABCE1, and UPF1 are known for their involvement in cytosolic processes (Fig. 6A). Conversely, among the proteins downregulated in dormant cells, seven showed a significant difference in transcriptomic gene expression. Three proteins exhibited deletions in both dormant and parental cells, with *Eno1* being deleted solely in the parental cells (Fig. 6B).

Proteins exclusively detected in the DA1-3b/D365 dormant cells displayed amplification of three corresponding genes in both the parental and dormant cells; four were exclusively amplified in the parental cells, and only *Ass1* was amplified exclusively in dormant cells. For proteins exclusively expressed in the DA1-3b parental model, three were amplified only in the parental cells, while *Vars2* was amplified solely in the dormant cells. Furthermore, three genes exhibited deletions in parental and dormant cells. Notably, only *F13a1* exhibited a differential epigenetic pattern between the parental cells, marked by H3K9me3, and the dormant cells, characterized by H3K27me3. The transcriptomic expression of genes identified through proteomic analysis in the leukemia model indicated a generally uniform expression across all proteins, with notable overexpression observed for *Ass1*, which was exclusive to the DA1-3b/D365 dormant cells (Fig S2).

Overall, our results showed that the dysregulated proteins in dormant leukemic cells were mainly unrelated to genetic/genomic alterations. In addition, except for a discrete number of genes, the identified mutated genes were not differentially expressed at the protein level.

Differential protein expression in a murine leukemia model highlights its involvement in biological pathways

As shown in Fig. 7, a bubble plot demonstrates our GO enrichment analysis aiming to uncover the functional roles of proteins differentially expressed in dormant DA1-3B/D365 cells compared to their parental counterparts.

This analysis revealed 12 significantly enriched terms related to the upregulated proteins, primarily related to “cellular metabolism” and “organo-nitrogen compound biosynthesis.” Notably, the GO enrichment analysis highlighted pathways with the highest gene ratio, specifically

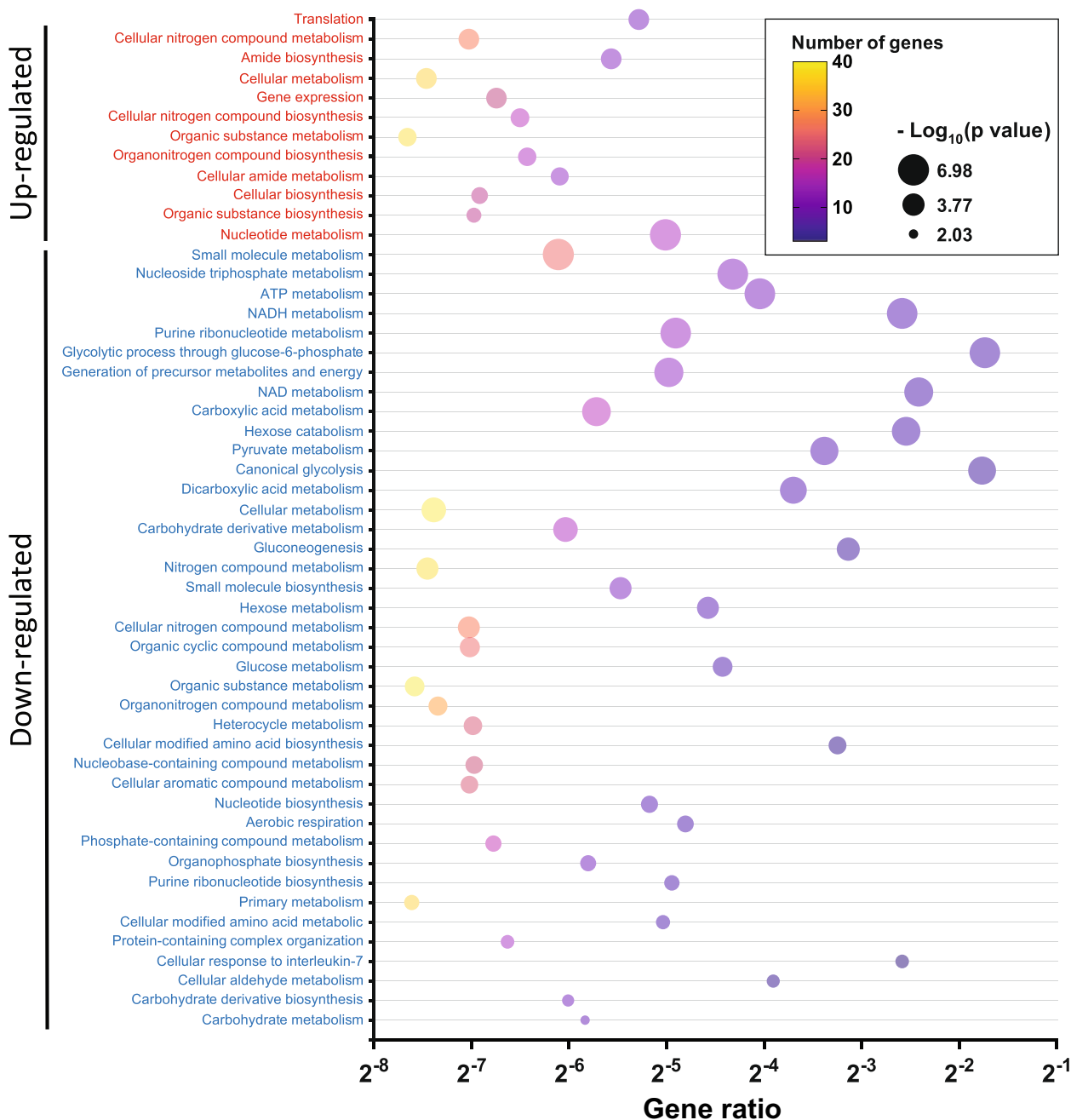


Fig. 7 Bubble plots of GO pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins in dormant leukemia DA1-3b/D365 cells compared to their parental cells. Pathways are classified according to upregulated (red) and downregulated (blue) protein expression. The number of proteins enriched in the pathway is indicated (colour plasma gradient). The “Gene Ratio” indicates the ratio of enriched proteins to background proteins. Bubble size is according to the p value (\log_{10} scale) of pathway enrichment

emphasizing “translation,” “amide biosynthesis,” and “cellular amide metabolism.”

Conversely, the downregulated proteins were enriched in 40 distinct terms, with a particular emphasis on processes such as “glycolytic process through glucose-6-phosphate” and “canonical glycolysis.” The pathways exhibiting the highest gene ratios were those linked to “cellular metabolism,” “nitrogen compound metabolism,” and “cellular modified amino acid biosynthesis” as illustrated in Fig. 7. These discoveries offer valuable insights into the underlying molecular mechanisms governing the behaviour of dormant leukemia cells and their original counterparts.

Differential protein expression analysis in dormant melanoma B16-F1GFP-D cells

Analysis of protein expression variations in dormant melanoma B16-F1GFP-D cells was also performed through proteomic investigation using mass spectrometry. A total of 2474 proteins were identified, 168 of which exhibited differences in expression ($p < 0.05$) between B16-F1GFP-D and B16-F1GFP-M cells. Notably, 43 proteins were only expressed in parental cells, while 36 proteins were exclusively detected in dormant cells (Fig. 8A). Among the 168 proteins whose expression was altered, 96 were upregulated, whereas 72 were downregulated in the dormant melanoma B16-F1GFP-D cells (Fig. 8B, Additional file 1, Table S1-f).

As performed in the leukemia model, we used multiomics approaches to integrate transcriptomic, CGH-based detection of CNV regions, and epigenetic modification analysis of the identified proteins (Fig. 9, Additional file 1, Table S1-g). As expected, most of the corresponding genes exhibited an H3K4me3 epigenetic active mark, i.e., 94 out of 96 upregulated genes and 69 out of 70 downregulated proteins indicating an active transcription. Additionally, CGH analysis revealed that for the majority of genes encoding proteins, 42 upregulated and 30 downregulated proteins, exhibited amplification or deletion patterns conserved between parental and dormant cells. Although we observed no correlation between the differential CNV pattern and the upregulation of proteins

in dormant cells, deletions specifically in the dormant model were observed for nine proteins (METAP2, ASS1, S100B, EEF2, UBE2N, WASF1, SLC25A3, GSTT3 and LTA4H) of the downregulated ones, suggesting that tumour dormancy may impact the expression of these genes through genomic alteration.

Regarding proteins exclusively detected in dormant cells, no differential CNV pattern correlated with proteomic analysis (Additional file 3, Fig. S2). Interestingly, we detected high transcriptomic expression of *Adss1* in dormant cells without any genomic variation. Among proteins exclusively detected in parental cells, most of the genes displayed no differential CNV pattern between dormant and parental cells except for the *Stx7* and *Wdr18* genes which exhibited exclusive deletions in dormant cells (Additional file 3, Fig. S2).

In summary, our results revealed that protein dysregulation in dormant melanoma cells largely did not occur through genetic mechanisms, in concordance with what was observed in the leukemia MRD model. Furthermore, apart from a few genes, the identified mutated genes did not exhibit differential expression at the protein level.

Differential protein expression in a murine melanoma model highlights the significant involvement of biological pathways

The subsequent step involved conducting GO enrichment analysis to explore the functional relationships of differentially expressed proteins in dormant B16-F1GFP-D cells compared to their parental counterparts. A total of 21 terms exhibited significant enrichment for upregulated proteins, primarily associated with cellular processes and metabolism, particularly involving NAD metabolism, glucose catabolism, and canonical glycolysis pathways (Fig. 10). Conversely, downregulated proteins were enriched in 51 terms, with a focus on various metabolic processes, cellular component organization, and biogenesis. The key pathways identified included proton transmembrane transport, actin filament severing, melanin biosynthesis, fructose metabolism, and cellular component biogenesis, as depicted in Fig. 10.

(See figure on next page.)

Fig. 8 Differential protein expression analysis in dormant melanoma B16-F1GFP-D cells compared to their parental cells. **A** Venn diagrams illustrating the number of common dysregulated and exclusive proteins according to the dormant or parental state of the melanoma B16-F1 cells. A significance threshold of $p < 0.05$ was used for Student's t test with Perseus software. **B** Heatmaps illustrating upregulated (red colour gradient) and downregulated proteins (green colour gradient) in dormant melanoma B16-F1GFP-D cells compared to their parental counterpart cells. The results are expressed as label-free quantification (LFQ) of proteins. The LFQ intensity was logarithmized ($\log_2[x]$). Three independent experiments ($n = 3$) were performed, and the resulting LFQs are shown

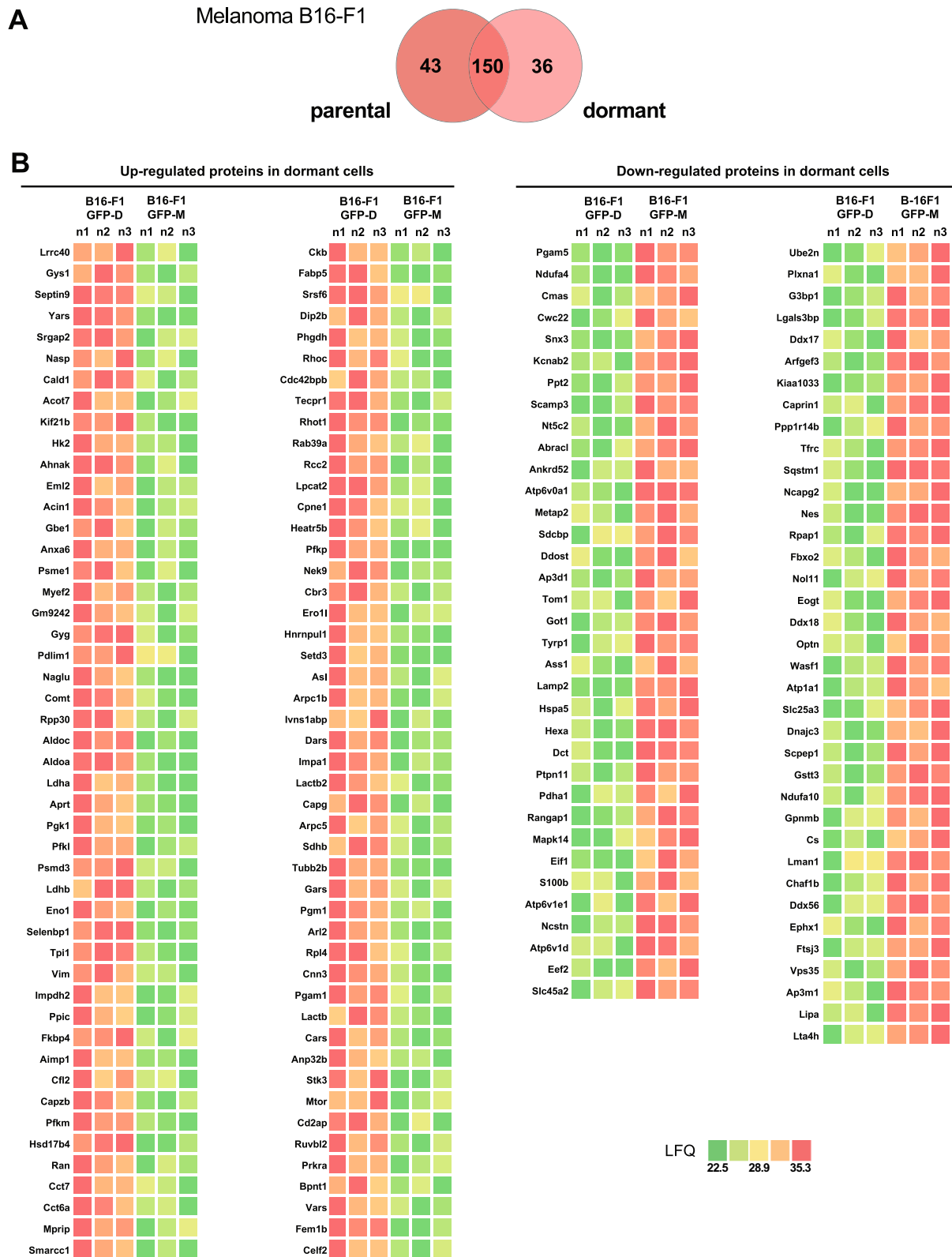


Fig. 8 (See legend on previous page.)

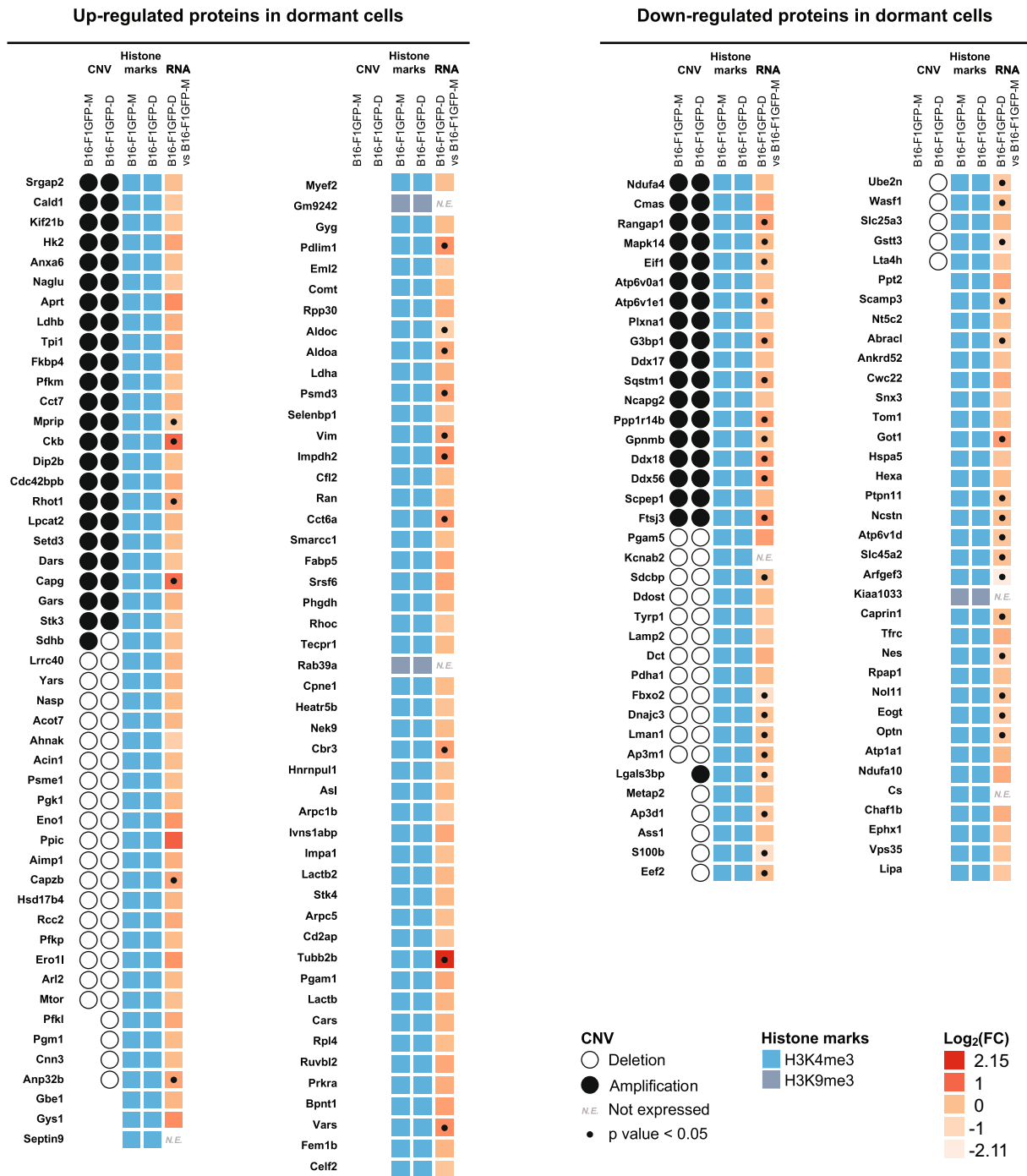


Fig. 9 Heatmaps of the results of CNV, histone marks and transcriptomic gene expression of dysregulated proteins in dormant melanoma B16-F1GFP-D cells compared to their parental cells. CGH results are represented by a black circle for amplification, while deletions are denoted by an empty circle. H3K4me3 epigenetic active codes are depicted in bright blue and H3K9me3 in grey-blue. Transcriptomic gene expression is depicted by a colour gradient relative to Log₂ (fold change) varying from light orange for lower expression to red for higher expression. The fold change represents differential gene expression between dormant and parental cell conditions. Significant transcriptomic values (p < 0.05) are indicated with dots. Each experiment was repeated three times

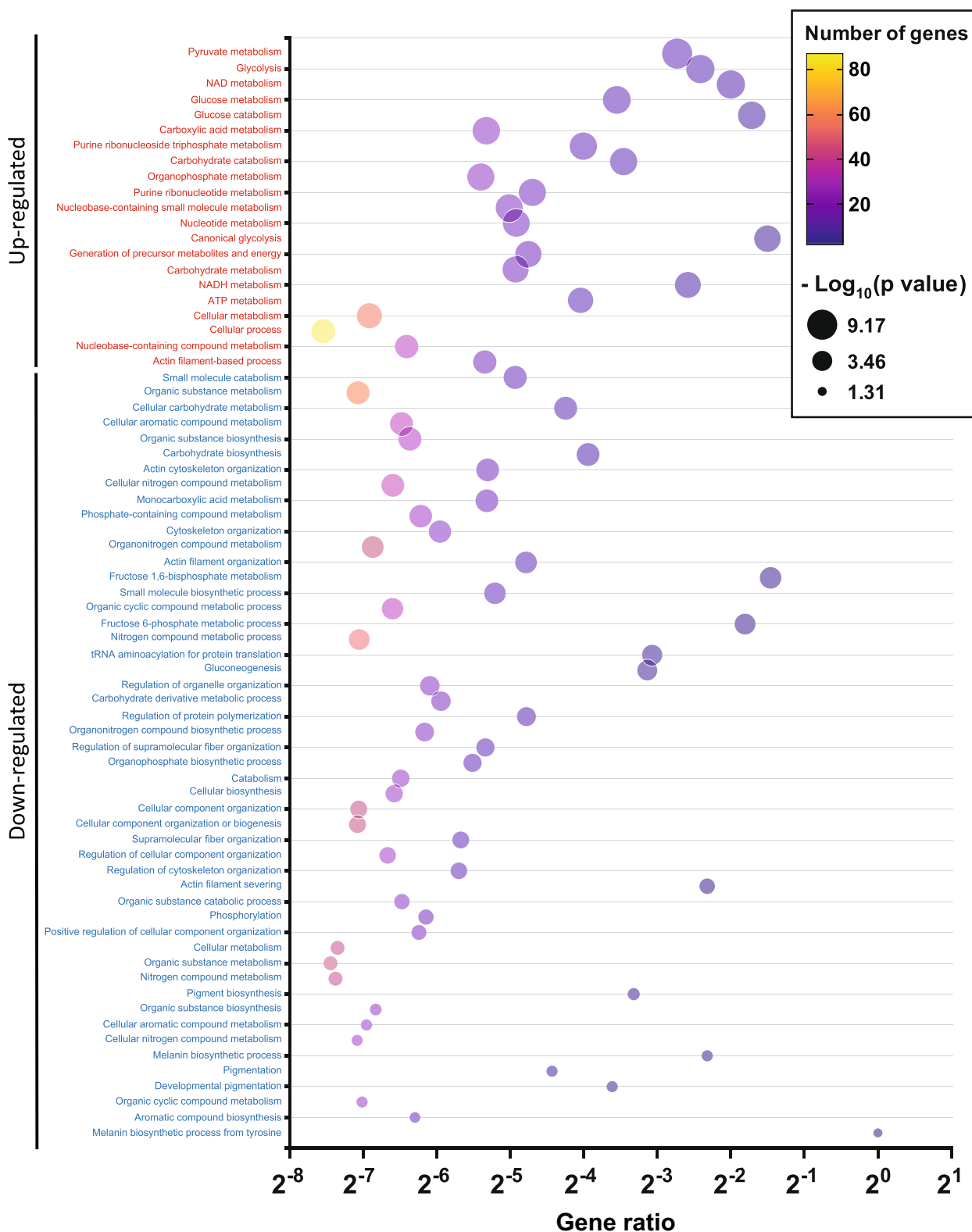


Fig. 10 Bubble plots of GO pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins in dormant melanoma B16-F1 cells compared to their parental cells. Pathways are classified according to upregulated (red) and downregulated (blue) protein expression. The number of proteins enriched in each pathway is indicated by the colour of the plasma gradient. The "Gene Ratio" indicates the ratio of enriched proteins to background proteins. Bubble size is according to the p value (Log₁₀ scale) of pathway enrichment

Identification of 11 common differentially expressed genes in both murine MRD models revealed a possible common MRD signature

Among the 11 proteins commonly differentially expressed between the leukemia and melanoma models, four exhibited increased expression in the leukemia dormancy model. In contrast, nine proteins showed increased expression in the melanoma dormancy model. Notably, only SEPTIN-9 and CAPG exhibited consistent overexpression in both pathologies; this suggests a distinct protein signature between the two conditions (Fig. 11A).

Among these 11 proteins, CAPG is commonly overexpressed in both leukemia and melanoma dormant cells. SEPTIN9 is known for its role in regulating cell structure and cell division, while CAPG influences cell motility and shape by modulating actin dynamics. These two proteins are therefore crucial for many fundamental cellular processes. Their observed increase in protein expression in the dormancy models of the two pathologies suggests a potential structural alteration of the cytoskeleton in the context of tumour dormancy. Furthermore, methylation of the *Septin9* promoter has recently been associated with cancer recurrence and metastasis phenomena, particularly in breast cancer [20]. The role of CAPG in AML promotion has been described [21] (Fig. 11B).

The comparative analysis of CNVs in both models revealed a disparity in protein amplification. However, a shared deletion between the parental and dormant cells was observed in both pathologies, specifically involving

Pgk1. Additionally, the parental deletion of *Eno1* is consistent across the parental model of melanoma and its associated dormancy model. As expected, we observed a predominance of the H3K4me3 epigenetic active pattern in both pathologies; however, the H3K27me3 repressive histone code was detected for the *Aldoa* and *Selenbp1* genes in the leukemic model (Fig. 11B, additional file 1, Table S1-h).

Genetic and differential expression impact of the 11-protein MRD signature in human AML and melanoma

Among the 11 proteins commonly dysregulated in dormant cells from both pathologies (Table 1), public data analysis from AML patient cohorts [22, 23] (n=905) revealed that four of them—*SELENBP1*, *SEPTIN9*, *GYG*, and *ENO1*—demonstrated significantly greater expression in patients with adverse prognoses (ELN 2017 classification). Conversely, the remaining proteins appeared to be associated with an intermediate prognosis. Notably, a discrete percentage (0.5%) of patients displaying CNV (deletion) was observed in four of these common genes, including *ENO1*, which also exhibited a deletion in our murine parental myeloid model. Regarding melanoma pathology, when comparing public data from patients between the diagnosis and metastatic stages [16], significant frequencies of amplification (14.5% and 10.0% respectively) were observed for the *SELENBP1* and *SEPTIN9* genes at the metastatic stage (Table 1). Consistent with findings from our parental and dormant mouse

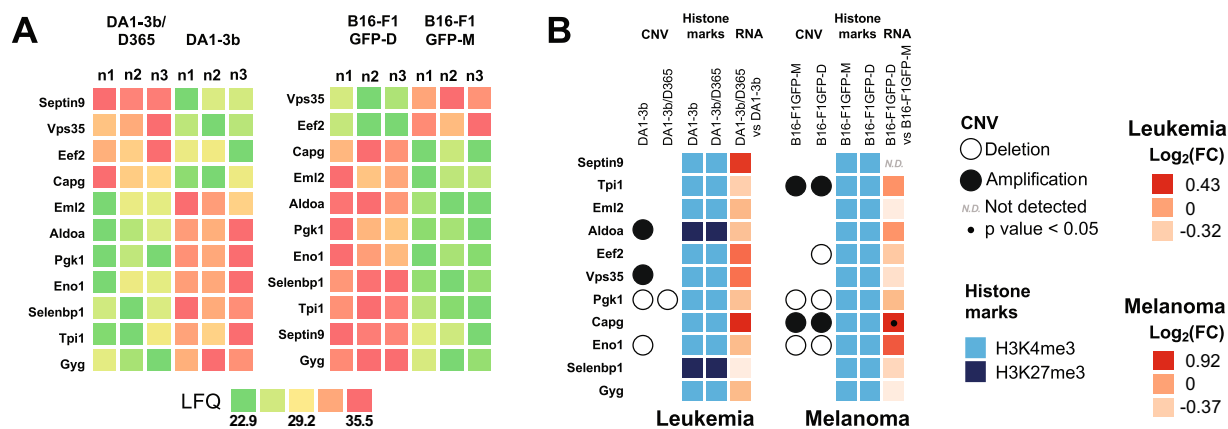


Fig. 11 Common protein signatures between the 2 murine MRD models. **A** Heatmaps illustrating upregulated and downregulated proteins in dormant melanoma B16-F1-GFP-D and leukemia DA1-3b/D365 cells compared to their parental cells. The results are expressed as label-free quantification (LFQ) of proteins. The LFQ intensity was logarithmized ($\log_2[x]$). Three independent experiments (n=3) were performed, and the resulting LFQs are shown. **B** Heatmaps of integrative data analysis of CNV, histone marks and transcriptomic gene expression with dysregulated proteins in dormant melanoma B16-F1GFP-D and leukemia DA1-3b/D365 cells compared to their parental cells. CGH results are represented by a black circle for amplification, while deletions are denoted by an empty circle. H3K4me3 active marks are depicted in bright blue and H3K27me3 in navy blue. Transcriptomic gene expression is depicted by a colour gradient relative to \log_2 (fold change) varying from light orange for lower expression to red for higher expression. The fold change represents differential gene expression between dormant and parental cell conditions. Significant transcriptomic values ($p < 0.05$) are indicated with a dot. Each experiment was repeated three times

Table 1 Impact of the 11 proteins commonly differentially expressed in murine DA1-3b/D365 leukemia and B16-F1GFP-D melanoma dormancy models on human AML and melanoma

Gene	Acute myeloid leukemia		Melanoma—primary tumours		Metastatic melanoma	
	ENL classification (higher expression in)	Deletion	CNV loss and gain frequency (%)		Amplification	Deletion
ALDOA	Intermediate*	0.5	4.7	1.6	2.7	
SELENBP1	Adverse*		6.3		14.5	0.9
SEPTIN9	Adverse*	0.5	7.8	1.6	10.0	
EEF2	Intermediate*					
CAPG	Intermediate*		6.3	1.6	0.9	0.9
EML2	Intermediate				4.5	2.7
GYG	Adverse		4.7		1.8	
VPS35	Intermediate	0.5	1.6	3.1		0.9
TPI1	Intermediate		4.7		6.4	6.4
ENO1	Adverse	0.5	4.7	6.3	1.8	1.8
PGK1	Intermediate					

melanoma models, a notable frequency of *TPI1* amplification at both the diagnostic (4.7%) and metastatic (6.4%) stages was observed.

Table 1 reveals a correlation between the highest expression (RNA-seq) of the 11 genes and ENL classification groups (i.e. adverse, intermediate and favourable) in AML (n=905). An asterisk symbolizes a significant result ($p < 0.05$). The table shows the frequency (%) of CNV loss and gain related to the indicated gene in AML and melanoma (primary and metastatic tumors) patients (n=489). The data were extracted from the public domain cBioportal [16, 22, 23].

Shared functional properties by dormant cells from the both MRD models

As we observed a common overexpression of SEPTIN9 and CAPG at the protein level in dormant cells regardless of the tumour type, we investigated a potential functional impact by measuring the physical properties of the dormant cells compared to their parental counterpart cells in both MRD models. Indeed, these two proteins are involved in cytoskeleton organization [24–26], a feature involved in cell fate and adaptive mechanisms to the microenvironment [27, 28]. In addition, the cytoskeleton network may link mechanical properties with cell dormancy [27, 29]. Besides mechanical effects, multiple studies have described the role of the major cytoskeletal components such as actin filaments and microtubules, on the electrical properties of cells [30–32]. Interestingly, dynamic processes such as depolymerisation/polymerisation of microtubules and actin filaments have been described to impact the

electrical signature of cancer cells [30, 31]. Thus, we performed impedance analyses to compare the electrical properties of cells from both MRD models. The required throughput for single-cell analysis was sustained using electrical impedance measurements in a microfluidic device. This micromachined impedance spectroscopy flow cytometer obtained different cell properties at dedicated measurement frequencies, e.g., size at frequencies between 0.1–1 MHz, membrane reactance at frequencies between 2–5 MHz, and cytoplasm conductance at frequencies higher than 20 MHz [33]. Therefore, we measured the response of each cell at 30 MHz to compare their cytoplasm conductance as a greater expression of SEPTIN 9 and CAPG, binding proteins involved in cytoskeleton remodeling, was detected in dormant cells from the 2 MRD models. To minimize possible errors due to device calibration, we normalized each measurement according to the median of the parental cells. DA1-3b/D365 leukemia (0.888 ± 0.007 normalized value \pm standard error) and B16-F1GFP-D (0.84 ± 0.018 normalized value \pm standard error) melanoma dormant cells exhibited lower normalized cytoplasm conductance than their parental counterpart cells, i.e., DA1-3b (1.000 ± 0.007) and B16-F1GFP-M (1.000 ± 0.020), repeated in 6 and 4 independent experiments for a total n=14,379 and 3815 cells, respectively (Fig. 12). Both comparisons showed significant difference ($p < 0.0001$) between the parental and dormant cells in both MRD models (student t-test). Overall, these results reinforced the possible role of the cytoskeleton shape in mechanisms underlying the MRD process.

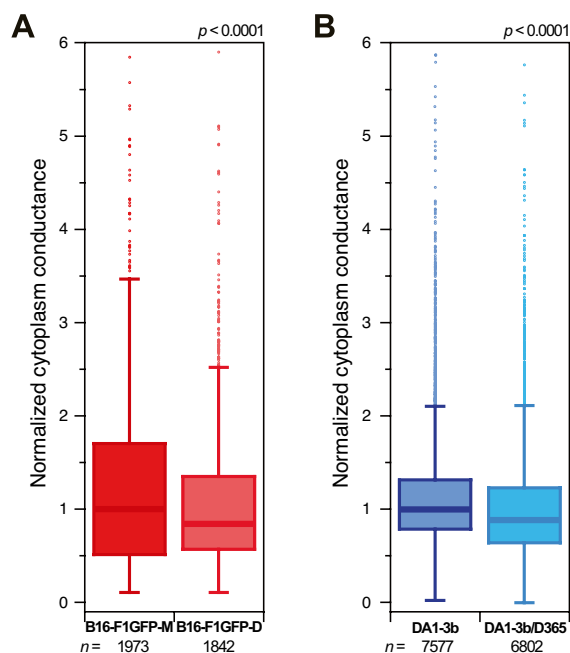


Fig. 12 Box plots comparing the cytoplasm conductance of both dormant melanoma B16-F1GFP-D cells and dormant leukemia DA1-3b/D365 cells compared to their parental counterpart cells. Cells of each group, **A** melanoma and **B** leukemia, were analysed by impedance measurements at 30 MHz, and normalized according to the median of parental cells. The experiments were repeated four and six times, respectively, with independent cell cultures. The numbers of analysed cells are shown under each plot. Both comparisons showed significant differences ($p < 0.0001$)

Discussion

Investigation of the multiomics signatures of dormant melanoma and leukemia cells from the MRD syngeneic mouse models has provided crucial insights into the genetic and nongenetic mechanisms involved in tumour dormancy. Our multiomics approach revealed a specific genetic signature and highlighted its potential functional impact in both models. Although a discrete overlap among genes harbor mutations was observed between murine melanoma and leukemia dormancy models, a significant number of mutated genes appeared exclusively in dormant cells within both models. This singularity suggests potential resistance mechanisms against the microenvironment or therapies, indicating either the acquisition of advantageous mutations or preexisting clonal selection during the MRD process [10, 34–36]. The identification of exclusive mutated genes in parental cells reinforced the hypothesis linking the existence of original dormant clones to their parental counterparts [10, 35–37].

In the B16-F1 melanoma model, preexisting clone selection may be involved in MRD due to the lack of additional mutation acquisition among the 2nd generation

postdormancy cells (B16-F1GFP-DB#1, B16-F1GFP-DB#2 and B16-F1GFP-DB#3). Our exome sequencing data of the DA1-3b leukemia cells preferentially support a mutation gain scenario. Even though our two MRD models were designed through a similar immunotherapy protocol, the MRD process may involve distinct mechanisms that lead to resistance. In human AML, the reappearance of leukemic disease can occur through mechanisms identical to those observed in the murine MRD model. Indeed, multiple studies through NGS deep sequencing revealed that an original clone or a subclone resistant to anticancer therapy, acquired new mutations, expanded and emerged as the predominant clone at relapse [35, 36]. Many lines of evidence have shown the existence of an ancestral, prediagnostic clone evolving and emerging as the major clone at relapse [35].

In human melanoma, the emergence of therapy-resistant tumour clones is frequently observed in melanoma patients and is responsible for tumour relapse and poor prognosis [10, 37]. We and others have previously shown that melanoma cells exhibit a high capacity for cellular plasticity, a nongenetic process that likely enables adaptation to the environment [38, 39]. In addition, cellular plasticity can control the phenotypic switch between stem-like and non-stem-like cancer cells [38]. As we have previously shown that dormant B16-F1GFP-D cells were enriched in stem-like phenotype cells, exome sequencing and associated VAF data reinforced the hypothesis that preexisting clones among parental cells may display plastic/stem cell features underlying the MRD process [12]. These observations call into question the mechanism underlying MRD in melanoma: is there a unique genetic or nongenetic mechanism or a combination of both as observed with our murine model?

As this study revealed specific gene signatures in melanoma dormant cells combined with previous data showing their stem-like phenotype, we hypothesized that both genetic and nongenetic mechanisms explain the MRD process. An elegant study recently highlighted a spatiotemporal map of the diversity and trajectories of melanoma cell states and proposed that the capacity for growth or metastasis is limited to distinct subsets of cells [40]. As these phenotypic behaviours can be dynamically acquired upon exposure to specific niche or microenvironment signals, these findings emphasize the reprogramming capacities of melanoma cells [40]. Although plasticity may be involved in the MRD mechanisms in melanoma, our results did not discriminate between genetic and nongenetic processes which could explain dormancy in the B16-F1 murine model. Indeed, the 2nd generation of B16-F1GFP-DB dormant cells did not feature any additional mutated genes without losing their stem-like cell properties. In addition, we

previously showed that these brain site-derived melanoma cells modulate their transcriptome profile compared to the first generation of dormant cells without any additional genomic alterations [12, 38]. Thus, MRD could involve genetic and/or nongenetic mechanisms in melanoma.

Our multiomics analysis demonstrated that the genetic signature of dormant cells may have a functional impact. However, it is important to note that not all of the identified mutated genes from both dormancy models necessarily contribute to this functional impact. For a specific set of mutated genes in both MRD models, differential CNV alterations combined with epigenetic patterns and transcriptomic gene expression, highlighted possible functional impacts and involvement in MRD mechanisms. Although several mutated genes did not exhibit expression correlated with epigenetic repressive marks, a substantial number of genes harbouring mutations in dormant cells were expressed in agreement with the associated active histone code. In addition, the overexpression of mutated genes in dormant cells was mainly not associated with differential amplification or deletion between parental and dormant cells.

In regard to the murine leukemia model, combined epigenetic and transcriptomic analysis revealed that active histone marks were correlated with the overexpression of several mutated genes that are involved in metabolic pathways. Remarkably, the expression of these genes was not solely dictated by CNV alterations, underscoring a nuanced interplay between genetic and nongenetic factors in the context of MRD. Gene Ontology enrichment analysis revealed the potential functional roles of the expressed mutated genes, revealing a link to “cadherin binding” and “cell adhesion molecule binding,” whereas those in melanoma cells were associated with pathways involving “small molecules binding” and “nucleotide binding”.

To ascertain whether the “murine mutated gene signatures” revealed through our murine MRD models were relevant to the corresponding human disease, we analysed the genetic profiles of these genes in human AML and melanoma cohorts from public datasets. Although the dormant mutated gene signature revealed by the murine leukemia model did not precisely mirror, or did so only to a limited extent, the mutation patterns observed in human AML at diagnosis, revealed CNV alterations. This finding suggests a potentially significant role of these genes in human disease. In addition, because MRD or AML relapse datasets were not available, we could not verify the relevance of our signature in human samples during the progression of the disease. Nevertheless, *Idh1* was found to be mutated in murine

leukemia dormant cells, and a mutated *IDH1* gene is frequently observed in human AML at both diagnosis and MRD stages [15, 36].

In human melanoma samples, we confirmed the presence of similar mutated genes in primary and metastatic tumours. These observations reinforced the relevance of our findings for potential translational applications. While the frequency of “murine” dormant mutated genes was low in metastatic melanoma tumours without any expected “enrichment”, several genes exhibited CNV alterations with a significantly increased frequency compared to the primary stage. Although these observations reinforced the relevance of our findings for potential translational applications, the murine MRD models may also mimic disease features of one “single patient” regarding mutational patterns minimizing the utility of the identified mutated gene signatures related to dormancy.

In addition to the most commonly accepted explanation for the evolution of resistance involving genetic alterations [41], we focused our study on the nongenetic resistance of dormant cells. Indeed, recent and robust studies indicate that drug-tolerant persister phenotype(s) can be transiently acquired through nonmutational mechanisms [10, 42–44]. The proteomic analysis of dormant cells revealed that dysregulated protein expression was primarily driven by nongenetic mechanisms in both murine MRD models. In leukemia dormant cells, enrichment analysis identified pathways associated with cellular metabolism, providing valuable insights into the molecular mechanisms governing dormant cells. Similarly, dysregulation of proteins in dormant melanoma cells was influenced mainly by nongenetic factors, and enrichment pathway analysis revealed its involvement in cellular metabolism. However, dormant melanoma cells also exhibit a lack of differentiation and dysregulated cytoskeleton organization. This study enables a comparison between the dormant cell signature from our MRD models and those designed in previous studies involving chemotherapy and human cells from patients [10, 45].

Interestingly, several identified genes and/or pathways, were common to those identified in signatures from several MRD melanoma models such as the neural crest stem cells, *MITF* targets, differentiation/pigmentation and invasion [10]. In the same way, in regard to the PDX (patient-derived xenograft) AML MRD models from other studies, persistent cells following chemotherapy, exhibited metabolic reprogramming as noted in our dormant leukemia model [8]. In addition, the GO enrichment pathway analysis revealed a significant involvement of dysregulated proteins observed in dormant DA1-3b/D365 cells, in several cellular biosynthesis processes. Interestingly, an elegant study revealed a “dormant cell signature” in hematopoietic stem cells (HSC)

with implications for biosynthesis pathways during the transition from dormant to active HSCs [46]. Similarly, a recent study, revealed that these “dormant signature” could (i) discriminate functionally distinct cell compartments in the leukemic stem cell pool from those in AML patients and (ii) provide crucial insights into the cell fate trajectories of these potentially resistant cells [47].

Overall, these observations reinforce our findings and highlight the common features underlying the MRD process regardless of the nature of anticancer treatment that leads to dormancy. Indeed, our syngeneic MRD models were designed through immunotherapy while MRD models in other studies were obtained under chemotherapy [8, 10–12]. A very limited number of studies have described MRD mouse models and mainly used PDX models devoid of immune system implications. This study conducted in syngeneic models of leukemia and melanoma may decipher potential immune-related mechanisms of dormancy. As previously shown in our leukemia MRD model, overexpression of the immune inhibitory ligands PD-L1 enhanced resistance to CD8 T lymphocytes [11]. Conversely, the mechanisms elucidated in our syngeneic MRD models, that are distinct from those highlighted in other MRD models, may be implicated within the context of immune system resistance.

Interestingly, this study revealed the common differential expression of 11 proteins in leukemia and melanoma dormancy models. This suggests a potential “general” signature for MRD. SEPTIN-9 and CAPG consistently exhibited increased expression in both pathologies, indicating a shared structural organization in the cytoskeleton during tumour dormancy. In addition, several dysregulated proteins in dormant cells were significantly enriched in cytoskeleton-related pathway. Remarkably, many lines of evidence have revealed that the mechanical properties dictated by the cytoskeleton may impact cell fate including tumor dormancy or phenotypes better suited to a novel environment [27–29]. Our physical properties investigation revealed a common “electrical” signature in dormant cells from the two MRD models. The cytoplasm conductance of the dormant cells was significantly lower, signifying a profound change in the structural organization of microtubules and actin filaments. Although depolymerized/polymerized actin filaments or microtubules have been described to have contradictory impacts on conductance or electrical properties [30, 31], this study highlights a significant role of the cytoskeleton underlying MRD processes across various cancer types.

The use of a syngeneic model provides a significant advantage in cancer research. This approach minimizes interindividual genetic variabilities, thereby enhancing

the reliability of outcomes and the validity of deductions drawn from the study. By exploring the genetic and proteomic signatures of dormant cells in the context of immunotherapy, our study offers new and valuable insights. Conclusions regarding the differences or similarities in signatures can inform therapeutic strategies for MRD treatment across a spectrum of cancer types.

Moreover, the rich multiomics approach enables a comprehensive exploration of the molecular mechanisms governing MRD. Through the combination of genomic, transcriptomic, proteomic, and epigenomic datasets, this methodology affords a holistic and exhaustive view of the biological landscape of MRD, offering valuable insights for the development of targeted strategies [48]. Despite these strengths, our study lacked single-cell analysis, which could constrain the resolution and comprehension of phenotypic variations within cellular populations [36]. Incorporating this approach would have enabled a more precise characterization of the specific cell subpopulations implicated in MRD [49]. In addition, although the cellular models employed in the study consisted of cells amplified *in vitro* immediately after the *in vivo* dormancy state and were thus, in a proliferative state, they still manifested features of tumour dormancy that render them relevant for MRD investigation [11, 12]. Our murine models showed a decrease in the proliferation of dormant cells compared to the parental ones, alongside a noted lack of differentiation, resistance to the immune system and/or a stem cell-like phenotype according to the pathology involved [11–13]. While these cells may not be in a quiescent state, they do exhibit a dormant state that may reflect a late stage of MRD or even early events of relapse. In addition, several MRD models highlight the nonquiescence state of residual cells and indicate “functional dormancy” which may illustrate the immune system interactions during MRD [7, 8, 10, 50]. Thus, our models may also reflect MRD mechanisms in an “active” state of dormant cells (as shown by the enrichment of biosynthetic processes) or a state of postimmune system pressure.

Conclusions

In summary, despite its limitations, this study offers a comprehensive and innovative perspective on MRD research, leveraging syngeneic models and considering the immune context. These results provide a robust groundwork for future investigations and hold substantial potential for the development of more effective strategies against MRD in cancer. Our findings suggest that murine models closely mimic patient conditions, providing valuable insights into the genetic and protein signatures of MRD. Understanding these mechanisms could guide the

development of therapeutic strategies to address MRD in leukemia and melanoma patients.

Materials and methods

MRD leukemia DA1-3b and B16-F1 melanoma mouse models

Murine leukemic myeloid cells (DA1-3b parental cells and DA1-3b/D365 dormant cells) and melanoma cells (B16-F1GFP-M parental cells, B16-F1GFP-D, B16-F1GFP-DB#1, B16-F1GFP-DB#2, and B16-F1GFP-DB#3 dormant cells) were isolated as previously described [11, 12]. Briefly, dormant cells were isolated from MRD syngeneic mouse models based on immunotherapy, capturing distinct dormancy stages (Day 60 and Day 365 for the leukemia model, and Day 365 and “2nd generation in brain site” for the melanoma model). The cells were amplified *in vitro* and stored in liquid nitrogen until subsequent analysis.

Array-comparative genomic hybridization analysis

DNA extraction from frozen samples was carried out following the manufacturer's recommendations QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen Valencia, CA, USA). The quantity and quality of the extracted DNA were assessed on a NanoDrop platform (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and by gel electrophoresis. CGH array analysis was achieved using pangenomic arrays consisting of 60-mer oligonucleotides (027411_D_F_20150623 design version, Mouse Genome 180 K CGH array, Agilent Technologies Santa Clara, CA, USA). The arrays were scanned using an Agilent G2505B scanner, and data were analysed with Agilent Feature Extraction Software (v10.7.3.1) against the mm9 (mm9: NCBI37) mouse genome assembly. The array data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE250172 for public accessibility. CNVs were detected using the Aberration Detection Method 2 (ADM2) algorithm. CNVs was called either gain or deletion according to the log₂ ratio distribution analysed with Genomic Workbench software (v5.0.14).

Whole exome sequencing analysis

DNA was extracted as described in section “array-comparative genomic hybridization analysis”. Library preparation was performed using the SureSelect Target Enrichment System (Agilent Technologies, USA), with 1 µg of genomic DNA fragmented and the library purified and size-selected using AMPure XP beads (Beckman Coulter Life Sciences, USA). Following ligation of Ion Xpress barcodes and P1 adapters, the libraries were amplified. The amplified DNA fragments underwent hybridization to biotinylated RNA library baits and subsequent capture using streptavidin-coated magnetic

beads. Quality assessment of the captured library fragments was performed on a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Template preparation utilized Ion PI™ Hi-Q™ chemistry (Life Technologies, USA), with 50 pM of each library loaded onto an Ion Chef™ Instrument (Life Technologies, USA) for template enrichment. Templating efficiency of the Ion spheres was evaluated using a Qubit™ 2.0 fluorometer (Thermo Fischer Scientific, USA). Prepared libraries were loaded onto Proton PI chips v3 (two samples/chip) and sequenced on an Ion Proton using PI™ Hi-Q™ sequencing 200 chemistry (Life Technologies, USA) with a read length of 260 bp and 520 flow cycles. Data analysis involved the Ion Torrent platform-specific pipeline software (Torrent Suite v4.0) for read separation, sequence alignment to the mm10 mouse genome reference, target-region coverage analysis, and removal of low-quality reads. Exome sequencing data are publicly accessible through Sequence Read Archive (SRA) under the PRJNA1103364 bioproject number. The alignment file from the Torrent Suite was transferred to Ion Reporter (Ion Reporter v4.0) for variant file generation using default parameters. A total of 218,914 variants (insertions/deletions/SNPs) were detected in the total samples.

Targeted sequencing analysis

DNA was extracted as described in section “array-comparative genomic hybridization analysis”. AmpliSeq libraries were prepared using the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 and Ion AmpliSeq Custom Panel (Life Technologies). AmpliSeq technologies were used to design a custom NGS library including 190 amplicons in two pools, covering all the targets of interest (30.6 kb covered at 100%). The targets of interest were selected from the whole exome sequencing results, and filtered by the effects of the variants on genes, transcripts, protein sequences and regulatory regions. These effects were calculated using the Ensembl VEP and SIFT tools (<https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>). Ten nanograms of each DNA sample served as the template for library preparation. Quality control of all libraries was conducted using the Agilent Bioanalyzer with high sensitivity chips. Template dilutions were calculated post-normalization of library concentrations to 100 pM using the Ion Library Equalizer Kit (Life Technologies). Library templates underwent clonal amplification using the Ion One Touch 2™ system as per the manufacturer's instructions. Following enrichment of recovered template-positive Ion Sphere Particles, samples were sequenced using Ion 318 v2 chips on the Ion PGM System or Ion 530 chips on the Ion S5XL system (Thermo Fisher Scientific). Data analysis utilized the Torrent Suite Software v.5.2.2 (Thermo Fisher Scientific) with

alignment to the mm10 mouse genome. Variant calling was optimized, achieving a mean depth of 5000 reads for each sample.

ChIP sample preparation for sequencing

Cells were treated with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature to cross-link proteins and DNA. The reaction was quenched with 125 mM glycine for 5 min, followed by cell collection and lysis in the following buffer [HEPES/KOH 0.01 M pH 7.9, KCl 0.01 M, MgCl₂ 0.0015 M and 1× protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)]. After centrifugation at 10,000×g for 10 min at 4 °C, the supernatant containing chromatin was collected. Chromatin was sheared by sonication at 4 °C using a Bioruptor 300 to generate fragments of approximately 200–400 bp in length, with 15 cycles of 30 s ON/OFF at the highest setting. For immunoprecipitation, 100 µL of the chromatin supernatant was incubated overnight at 4 °C on a rotating wheel with specific antibodies against H3K9 (Diagenode), H3K27 (#, Active Motif), or H3K4 (Diagenode) trimethylation, using 0.25 µg of antibody for 0.1 A_{260nm}. Control experiments included the use of an equivalent amount of irrelevant control IgGs (Millipore). An aliquot of the same amount was saved as the input sample and stored overnight at –20 °C. The next day, immune complexes were incubated with 100 µL of magnetic beads for 3 h at 4 °C under rotation. Beads were washed sequentially with low salt wash buffer, high salt wash buffer, and TE buffer 1X pH 8.0. Following each wash, beads were centrifuged at 960×g for 3 min at room temperature. After removing the supernatant, immune complexes were eluted with 210 µL of elution buffer and incubated for 15 min at 65 °C with stirring. Eluted material was collected by centrifugation at 16,000×g for 1 min at room temperature. The immunoprecipitated material was eluted at room temperature in elution buffer (100 mM NaHCO₃, 1% SDS), and the crosslinking reactions were reversed by adding 100 mM NaCl and incubating at 65 °C overnight. The eluted material was then treated with Q-Protease (Qiagen) and RNase H to remove protein and RNA, respectively, and the enriched genomic DNA fragments were purified according to the Macherey Nagel protocol (Kit Nucleospin Gel and PCR Clean up), eluted in 35 µL of sterile water and stored until sequencing.

Chip-Seq analysis

The DNA samples were sequenced at GATC (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). Illumina sequencing libraries were prepared according to ISO 17025 standards and applied to an Illumina HiSeq 2500 platform (Illumina, San Diego CA, USA) for 50 bp paired-end sequencing, ensuring a minimum of 30 Mb per sample. The

ChIP-Seq data (fastq) are publicly accessible through the Sequence Read Archive (SRA) under the PRJNA1054015 bioproject number. Analysis of the aligned data was conducted using the Partek Genomics Suite ChIP-Seq workflow (version PGS7.20.0831 for Windows). Standard methods were employed for data importation and quality control assessment. Peak detection allowed the identification of enriched regions, encompassing both novel and known genomic loci, thereby pinpointing potential targets.

Array gene expression analysis

Total RNA extraction was conducted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) as per the manufacturer's protocol, including additional DNase treatment. The yield and quality of total RNA were evaluated using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France). Gene expression analysis was performed using one-color whole Mouse 8×60 k microarrays (074809_D_F_20150624 slides, Agilent Technologies). cRNA labelling, hybridization, and detection followed standard protocols provided by Agilent Technologies. Cyanine 3-labelled cRNA was synthesized from 50 ng of total RNA using a low-input QuickAmp labelling kit, with RNA Spike-In serving as a positive control for labelling and amplification steps. Purified labelled cRNAs (600 ng each) were hybridized and washed according to manufacturer's instructions, followed by scanning on an Agilent G2505C scanner. Data extraction was performed using Agilent Feature Extraction Software® (FE version 10.7.3.1). The microarray data are publicly accessible through the Gene Expression Omnibus (GEO) series accession number GSE250145. Statistical analysis and filtering were conducted using Genespring® software version GX13.0 (Agilent Technologies).

Sample preparation for MS analysis

HPLC grade acetonitrile (ACN), water, and analytical reagent (AR)-grade trifluoroacetic acid (TFA) were from Biosolve B.V (Valkenswaard, Netherlands). Ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃), DL-dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), urea, tris(hydrochloric acid) (Tris-HCl), and sodium chloride (NaCl) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was purchased from Bio-Rad (Marnes La Cocquette, France), and AR-grade formic acid (FA) was from Fluka. Thiourea and urea were obtained from Fluka and Euromedex, respectively. Sequencing grade modified porcine trypsin was obtained from Promega (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Charbonnières-les-Bains, France). Protein extraction and digestion were carried out following established protocols [51]. Cells were lysed in a buffer comprising 4% SDS

and 100 mM DTT in 100 mM Tris–HCl (pH 7.6), followed by sonication for three 30-s cycles at 500 W and 20 kHz. Centrifugation at 14,000×g for 10 min at room temperature was then performed to pellet cell debris, and the supernatant containing proteins was collected. The Filter-Aided Sample Preparation (FASP) method was employed using Amicon Ultra-0.5 mL 10 kDa filters, following the protocol detailed in [51]. Protein digestion was conducted with trypsin (Promega, Gold MS, mass spectrometry grade) at a concentration of 20 µg/mL in 50 mM NH₄HCO₃, with an overnight incubation at 37 °C. Peptide digests were subsequently collected via centrifugation, and the filters were rinsed with 50 µL of 0.5 M NaCl. After adding 5% TFA, the digests were desalted using Millipore ZipTip C18 devices. The desalted solution was dried and reconstituted in water with 0.1% formic acid and 2% acetonitrile, ready for LC–MS/MS analysis.

LC–MS/MS analysis

Samples were analysed by online reversed-phase chromatography using a Thermo Scientific Proxeon EASYnLC 1000 system. The system was equipped with a precolumn (Acclaim Pepmap, 75 µm ID×2 cm, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and a C18 packed-tip column (Acclaim PepMap, 75 µm ID×50 cm, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Peptide separation was achieved with a gradient of acetonitrile (ACN) ranging from 5 to 35% over 120 min at a flow rate of 300 nL/min. The LC eluent was electrosprayed directly from the analytical column, with a voltage of 1.7–2.6 kV applied to the nano-spray source. The chromatography system was connected to a Thermo Scientific Q Exactive mass spectrometer, set to operate in data-dependent acquisition mode, to target the Top 10 most intense ions. Survey scans were conducted at a resolving power of 70,000 FWHM (m/z 400) in positive mode, with an automatic gain control (AGC) target of 3e6. The default charge state was set to two, with unassigned and singly charged states being excluded, and dynamic exclusion enabled for 20 s. The scan range for survey scans was 300–1600 m/z. For data-dependent MS/MS (ddMS2) analysis, the scan range was set from 200 to 2000 m/z, with one microscan acquired at 17,500 full width at half maximum (FWHM). An isolation window of 4.0 m/z was used for selecting precursor ions.

Data analysis MS

All MS data were processed using MaxQuant software (version 1.5.6.5) with the Andromeda search engine. Proteins were identified by searching MS and MS/MS data against the *Mus musculus* database (50,306 sequences). Trypsin specificity was selected for the digestion mode, with N-terminal acetylation and methionine oxidation

as variable modifications. Carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification, allowing up to two missed cleavages. An initial mass accuracy of 6 ppm was chosen for MS spectra, with a minimum of two peptides and at least one unique peptide per protein. The MS/MS tolerance was set to 20 ppm for HCD data. The false discovery rate (FDR) for peptide spectrum matches (PSMs) and protein identification was set to 0.01. Label-free quantification (LFQ) of proteins was conducted using the MaxLFQ algorithm integrated into MaxQuant with default parameters. Identified proteins were further analysed using Perseus software (version 15.6.0). The data file containing identification information was filtered to remove hits to the reverse database, proteins identified only with modified peptides, and potential contaminants. The LFQ intensity values were logarithmically transformed ($\log_2[x]$). Categorical annotation of rows was used to define different groups of replicates. For statistical analysis, only significant proteins according to the Student's t-test were considered.

GO pathway enrichment analysis

The Protein–Protein Interaction (PPI) network and Gene Ontology (GO) analyses of differentially expressed proteins and proteins associated with mutated genes were constructed using STRING version 10.0 (<http://string-db.org/>). Pathway enrichment analyses were visualized as bubble plots generated with GraphPad Prism version 10.2.0.

Physical properties measurements

Electrical impedance measurements were conducted using a hybrid micro electro-mechanical systems (MEMS)/microfluidic device fabricated on a silicon-on-insulator wafer with a two-mask process [52]. This device featured an embedded microfluidic channel with 3D facing electrodes on each side for electrical measurements. The electrical properties of the cells influenced the current passing between the electrodes as they flowed through the channel [53]. The measurements were carried out with a lock-in amplifier (HF2LI, Zurich Instruments) and a trans-impedance amplifier (1 k gain, HF2TA, Zurich Instruments) using a 1-V_{rms} driving signal. The flow rate was set at 3 µL/min, controlled by a pressure pump (LineUp™ Push–Pull, Fluigent) connected to the outlet. Changes in the real and imaginary components of the current, amplified to a potential difference, were recorded as each cell passed between the electrodes. Data processing was performed using a custom Python script to extract the response of each cell. To account for potential variations in device characteristics, the cell responses were normalized against the median

response of the parental cells. Statistical analyses were performed using Student's *t*-tests.

Analysis of public datasets

DNA-seq, RNA-seq, and CNV datasets from human AML samples and melanoma [16, 22, 23, 54] are available in the public domains cBioPortal [55–57] and NIH National Cancer Institute GDC Data portal. Version 1.0.

Abbreviations

ACN	Acetonitrile
AGC	Automatic gain control
AML	Acute myeloid leukemia
CGH	Comparative genomic hybridization
ChIP-seq	Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing
CNV	Copy number variation
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
FA	Formic acid
FWHM	Full width at half-maximum
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GO	Gene ontology
GEO	Gene expression omnibus
IAA	Iodoacetamide
IL-12	Interleukin-12
LFQ	Label-free quantification
MEMS	Micro electro-mechanical systems
MRD	Minimal residual disease
MS	Mass spectrometry
PPI	Protein-protein interaction
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SMG	Significantly mutated gene
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNV	Single-nucleotide variant
VAF	Variant allele frequency
WES	Whole exome sequencing

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40659-024-00540-y>.

Additional file 1: Table S1. The following raw data were obtained: exome sequencing data, histone epigenetic marker data, transcriptomic gene expression data and proteomic MS data. a) Description of mutation types in the indicated genes in DA1-3b and B16-F1 cells. b) Multiomics data analysis from CNV, histones marks, and transcriptomic gene expression data for the indicated mutated genes in both MRD models. c) Percentages of the indicated mutated genes and the associated CNVs in the human AML and melanoma cohorts. d) Percent of the 50 most frequently mutated genes and the associated CNVs in the human AML and melanoma cohorts. The values are represented by a distinct colour gradient. For human melanoma samples, the results are represented according to the stage of disease progression, i.e., primary or metastatic tumours. The data were extracted from the public domain GDC portal version 1.0. e) Proteomic MS analysis and resulting LFQ data in both MRD models. f) Multiomics data analysis of CNV, histones marks, and transcriptomic gene expression data for the indicated dysregulated proteins in the leukemia model. g) Multiomics data analysis of CNV, histones marks, and transcriptomic gene expression data for the indicated dysregulated proteins in a melanoma model. h) Multiomics data analysis of CNV, histones marks, and transcriptomic gene expression data for the 11 common dysregulated proteins in both MRD models

Additional file 2: Figure S1. Karyotype profiles of parental and dormant cells from the 2 MRD models. In the following order, the conditions

were B16-F1GFP-M, B16-F1GFP-D, B16-F1GFP-DB#1, B16-F1GFP-DB#2, B16-F1GFP-DB#3, DA1-3b, DA1-3b/D60, and DA1-3b/D365 cells

Additional file 3: Figure S2. Multiomics data analysis of CNV, histones marks, and transcriptomic gene expression data for the indicated exclusively expressed proteins in dormant or parental cells from the MRD melanoma and leukemia models

Acknowledgements

We would like to thank Bernadette Masselot for her technical assistance. The graphical abstract was partly generated using Servier Medical Art, provided by Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 unported license.

Author contributions

Conceptualization, B.Q., T.I. and Y.T., methodology, M.-O.L., S.T., A.G., P.S., F.A.S., J.-P.G., F.L., M.F., C.V., J.K., W.L.; S.S., M.C.T.; J.-C.G., D.C. and Y.T.; software, M.-O.L., S.T., A.G., B.N., M.W., J.-P.G.; F.A.S., M.C.T.; and Y.T. validation, M.-O.L., S.T., A.G., F.A.S., D.C., M.C.T. and Y.T., formal analysis, M.-O.L., S.T., A.G., J.-P.G., J.K., M.W., M.F., L.F., F.A.S., M.C.T., D.C. and Y.T.; resources, D.C., M.C.T., A.V., I.F., T.I. and Y.T., writing—original draft preparation, M.-O.L., S.T., M.C.T. and Y.T.; writing—review and editing, B.N., F.L., J.-P.G., L. H.B.I., M.-O.L., S.T., T.I., M.C.T. and Y.T.; visualization, M.-O.L., S.T., T.I., M.C.T. and Y.T.; supervision, Y.T. project administration, B.Q., T.I. and Y.T.; funding acquisition, D.C., M.C.T., S.M., T.I., B.Q. and Y.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by grants from INCA_18477, Contrat de Plan Etat-Région CPER Cancer 2015–2020, INSERM, CNRS, Ligue contre le cancer (Septentrion), Ligue nationale contre le cancer, a SIRIC grant from the OncoLille program (INCa-DGOS-Inserm 6041), BiLille bioinformatic platform, Fondation ARC, the University of Lille and the Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL). This work was partially supported by ANR PRCE, CytoMEMS, ANR-21-CE42-0011, and I-SITE ULNE, HiCellPhy, OTP60814. M.-O.L. was supported by Lille Hospital and by the Hauts-de-France Region. S.T. is supported by INSERM and by the Hauts-de-France Region. M.-O.L. was supported by SFH (Société Française d'Hématologie). M.-O.L. is supported by the Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL). F.A.S. was supported by IRCL and is currently supported by ANR PRCE.

Availability of data and materials

The datasets generated and/or analysed during the current study are available as indicated in "Materials and methods" section. The remaining data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020-U1277-CANTHER-Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, Univ. Lille, 59000 Lille, France. ²Inserm, U1003-PHYCEL-Physiologie Cellulaire, Univ. Lille, 59000 Lille, France. ³CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41-UAR 2014-PLBS, Univ. Lille, 59000 Lille, France. ⁴LIMMS/CNRS-IIS IRL2820, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. ⁵CNRS, IIS, COL, Univ. Lille SMMiL-E Project, Lille, France. ⁶Department of Health and Environment, Junia HEI-ISEN-ISA, Lille, France. ⁷Inserm, CHU Lille, U1192, Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire Et Spectrométrie de Masse (PRISM), Univ. Lille, 59000 Lille, France. ⁸CNRS, Centrale Lille, Polytechnique Hauts-de-France, Junia, UMR 8520-IEMN, Univ. Lille, Villeneuve d'Ascq, France.

Received: 27 April 2024 Accepted: 23 August 2024
Published online: 03 September 2024

References

- Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(11):834–46.
- Quesnel B. Tumor dormancy: long-term survival in a hostile environment. *Adv Exp Med Biol*. 2013;734:181–200.
- Quesnel B. Tumor dormancy and immunoescape. *APMIS acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2008;116(7–8):685–94.
- Kauffman HM, McBride MA, Delmonico FL. First report of the United Network for organ sharing transplant tumor registry: donors with a history of cancer. *Transplantation*. 2000;70(12):1747–51.
- Myron Kauffman H, McBride MA, Cherikh WS, Spain PC, Marks WH, Roza AM. Transplant tumor registry: donor related malignancies. *Transplantation*. 2002;74(3):358–62.
- Aguirre-Ghiso JA. Translating the science of cancer dormancy to the clinic. *Can Res*. 2021;81(18):4673–5.
- Min HY, Lee HY. Cellular dormancy in cancer: mechanisms and potential targeting strategies. *Cancer Res Treat*. 2023;55(3):720–36.
- Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, Bosc C, Sugita M, Stuani L, Fraisse M, et al. Chemotherapy-resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism. *Cancer Discov*. 2017;7(7):716–35.
- Patton EE, Mueller KL, Adams DJ, Anandasabapathy N, Aplin AE, Bertolotto C, Bosenberg M, Ceol CJ, Burd CE, Chi P, et al. Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer Cell*. 2021;39(5):610–31.
- Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, Karras P, Brown D, Chang YH, Debiec-Rychter M, et al. Toward minimal residual disease-directed therapy in melanoma. *Cell*. 2018;174(4):843–855.e819.
- Saudemont A, Quesnel B. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7–H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood*. 2004;104(7):2124–33.
- Touil Y, Segard P, Ostyn P, Begard S, Asporc C, El Machhour R, Masselot B, Vandomme J, Flamenco P, Idziorek T, et al. Melanoma dormancy in a mouse model is linked to GILZ/FOXO3A-dependent quiescence of disseminated stem-like cells. *Sci Rep*. 2016;6:30405.
- Touil Y, Latreche-Carton C, Bouazzati HE, Nagues AL, Jouy N, Thuru X, Laine W, Lepretre F, Figeac M, Tardivel M, et al. p65/RelA NF- κ B fragments generated by RIPK3 activity regulate tumorigenicity, cell metabolism, and stemness characteristics. *J Cell Biochem*. 2022;123(3):543–56.
- Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345–77.
- Tazi Y, Arango-Ossa JE, Zhou Y, Bernard E, Thomas I, Gilkes A, Freeman S, Pradat Y, Johnson SJ, Hills R, et al. Unified classification and risk-stratification in Acute Myeloid Leukemia. *Nat Commun*. 2022;13(1):4622.
- Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681–96.
- Boscolo Bielo L, Trapani D, Repetto M, Crimini E, Valenza C, Belli C, Criscitiello C, Marra A, Subbiah V, Curigliano G. Variant allele frequency: a decision-making tool in precision oncology? *Trends in cancer*. 2023;9(12):1058–68.
- Zaib S, Rana N, Khan I. Histone modifications and their role in epigenetics of cancer. *Curr Med Chem*. 2022;29(14):2399–411.
- Tartaglia M, Martinelli S, Stella L, Bocchinfuso G, Flex E, Cordeddu V, Zampino G, Burgt I, Pallechchi A, Petrucci TC, et al. Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet*. 2006;78(2):279–90.
- Zhang SL, Yu HJ, Lian ZQ, Wan J, Xie SM, Lei W, Chen QP, Zhang L, Wang Q. Septin9 DNA methylation is associated with breast cancer recurrence or metastasis. *J Int Med Res*. 2024;52(1):3000605231220827.
- Ma Q, Zhao M, Long B, Li H. Super-enhancer-associated gene CAPG promotes AML progression. *Communications biology*. 2023;6(1):622.
- Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, Wilmot B, Kurtz SE, Savage SL, Long N, Schultz AR, Traer E, Abel M, et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2018;562(7728):526–31.
- Bottomly D, Long N, Schultz AR, Kurtz SE, Tognon CE, Johnson K, Abel M, Agarwal A, Avaylon S, Benton E, et al. Integrative analysis of drug response and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2022;40(8):850–864.e859.
- Kim J, Mooren OL, Onken MD, Cooper JA. Septin and actin contributions to endothelial cell-cell junctions and monolayer integrity. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*. 2023;80(7–8):228–41.
- Mostowy S, Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(3):183–94.
- Zhang Y, Vorobiev SM, Gibson BG, Hao B, Sidhu GS, Mishra VS, Yarmola EG, Bubb MR, Almo SC, Southwick FS. A CapG gain-of-function mutant reveals critical structural and functional determinants for actin filament severing. *EMBO J*. 2006;25(19):4458–67.
- Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010;463(7280):485–92.
- Wang EJ, Chen IH, Kuo BY, Yu CC, Lai MT, Lin JT, Lin LY, Chen CM, Hwang T, Sheu JJ. Alterations of cytoskeleton networks in cell fate determination and cancer development. *Biomolecules*. 2022;12(12):1862.
- Barkan D, Kleinman H, Simmons JL, Asmussen H, Kamaraju AK, Hoenorhoff MJ, Liu ZY, Costes SV, Cho EH, Lockett S, et al. Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Can Res*. 2008;68(15):6241–50.
- Gharooni M, Alikhani A, Moghtaderi H, Abiri H, Mashaghi A, Abbasvandi F, Khayamian MA, Miripour ZS, Zandi A, Abdollahi M. Bioelectronics of the cellular cytoskeleton: monitoring cytoskeletal conductance variation for sensing drug resistance. *ACS Sens*. 2019;4(2):353–62.
- Salmanzadeh A, Sano MB, Gallo-Villanueva RC, Roberts PC, Schmelz EM, Davalos RV. Investigating dielectric properties of different stages of syngeneic murine ovarian cancer cells. *Biomicrofluidics*. 2013;7(1):11809.
- Zhou Y, Yang D, Zhou Y, Khoo BL, Han J, Ai Y. Characterizing deformability and electrical impedance of cancer cells in a microfluidic device. *Anal Chem*. 2018;90(1):912–9.
- Gawad S, Schild L, Renaud PH. Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab Chip*. 2001;1(1):76–82.
- Mopin A, Leprêtre F, Sebba S, Villenet C, Ben Khoud M, Figeac M, Quesnel B, Brinster C. Detection of residual and chemoresistant leukemic cells in an immune-competent mouse model of acute myeloid leukemia: potential for unravelling their interactions with immunity. *PLoS ONE*. 2022;17(4):e0267508.
- Onecha E, Rapado I, Luz Morales M, Carreño-Tarragona G, Martínez-Sánchez P, Gutierrez X, Sánchez Pina JM, Linares M, Gallardo M, Martínez-López J, et al. Monitoring of clonal evolution of acute myeloid leukemia identifies the leukemia subtype, clinical outcome and potential new drug targets for post-remission strategies or relapse. *Haematologica*. 2021;106(9):2325–33.
- Robinson TM, Bowman RL, Persaud S, Liu Y, Neigenfind R, Gao Q, Zhang J, Sun X, Miles LA, Cai SF, et al. Single-cell genotypic and phenotypic analysis of measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Sci Adv*. 2023;9(38):eadg0488.
- Patel RP, Somasundram PM, Smith LK, Sheppard KE, McArthur GA. The therapeutic potential of targeting minimal residual disease in melanoma. *Clin Transl Med*. 2023;13(3):e1197.
- Touil Y, Zuliani T, Wolowczuk I, Kuranda K, Prochazkova J, Andrieux J, Le Roy H, Mortier L, Vandomme J, Jouy N, et al. The PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low-Rhodamine123-retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2013;31(4):641–51.
- Vidal A, Redmer T. Tracking of melanoma cell plasticity by transcriptional reporters. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1199.
- Karras P, Bordeu I, Pozniak J, Nowosad A, Pazzi C, Van Raemdonck N, Landeloos E, Van Herck Y, Pedri D, Bervoets G, et al. A cellular hierarchy in melanoma uncouples growth and metastasis. *Nature*. 2022;610(7930):190–8.
- Holohan C, Van Schaeuybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):714–26.
- Trumpp A, Wiestler OD. Mechanisms of Disease: cancer stem cells—targeting the evil twin. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008;5(6):337–47.
- Ravindran Menon D, Das S, Krepler C, Vultur A, Rinner B, Schauer S, Kashofer K, Wagner K, Zhang G, Bonyadi Rad E, et al. A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene*. 2015;34(34):4448–59.

44. Su Y, Wei W, Robert L, Xue M, Tsoi J, Garcia-Diaz A, Homet Moreno B, Kim J, Ng RH, Lee JW, et al. Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(52):13679–84.
45. Marin-Bejar O, Rogiers A, Dewaele M, Femel J, Karras P, Pozniak J, Bervoets G, Van Raemdonck N, Pedri D, Swings T, et al. Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell*. 2021;39(8):1135–1149.e1138.
46. Cabezas-Wallscheid N, Buettner F, Sommerkamp P, Klimmeck D, Ladel L, Thalheimer FB, Pastor-Flores D, Roma LP, Renders S, Zeisberger P, et al. Vitamin A-retinoic acid signaling regulates hematopoietic stem cell dormancy. *Cell*. 2017;169(5):807–823.e819.
47. Beneyto-Calabuig S, Merbach AK, Kniffka JA, Antes M, Szu-Tu C, Rohde C, Waclawiczek A, Stelmach P, Gräßle S, Pervan P, et al. Clonally resolved single-cell multi-omics identifies routes of cellular differentiation in acute myeloid leukemia. *Cell Stem Cell*. 2023;30(5):706–721.e708.
48. Caplan M, Wittorf KJ, Weber KK, Swenson SA, Gilbreath TJ, Willow Hynes-Smith R, Amador C, Hyde RK, Buckley SM. Multi-omics reveals mitochondrial metabolism proteins susceptible for drug discovery in AML. *Leukemia*. 2022;36(5):1296–305.
49. Liu J, Jiang P, Lu Z, Yu Z, Qian P. Decoding leukemia at the single-cell level: clonal architecture, classification, microenvironment, and drug resistance. *Exp Hematol Oncol*. 2024;13(1):12.
50. Flores-Guzmán F, Utikal J, Umansky V. Dormant tumor cells interact with memory CD8(+) T cells in RET transgenic mouse melanoma model. *Cancer Lett*. 2020;474:74–81.
51. Duhamel M, Drelich L, Wisztorski M, Aboulouard S, Gimeno JP, Ogrinc N, Devos P, Cardon T, Weller M, Escande F, et al. Spatial analysis of the glioblastoma proteome reveals specific molecular signatures and markers of survival. *Nat Commun*. 2022;13(1):6665.
52. Takayama Y, Perret G, Kumemura M, Ataka M, Meignan S, Karsten SL, Fujita H, Collard D, Lagadec C, Tarhan MC. Developing a MEMS device with built-in microfluidics for biophysical single cell characterization. *Micromachines*. 2018;9(6):275.
53. Rezard Q, Perret G, Gerbedoen JC, Pekin D, Cleri F, Collard D, Lagadec C, Tarhan MC. Developing A mems device for high-throughput multi-parameter single cell biophysical analysis. In: *IEEE 34th international conference on micro electro mechanical systems (MEMS)*; 2021. p. 494–7.
54. Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059–74.
55. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012;2(5):401–4.
56. de Bruijn I, Kundra R, Mastrogiacomo B, Tran TN, Sikina L, Mazor T, Li X, Ochoa A, Zhao G, Lai B, et al. Analysis and visualization of longitudinal genomic and clinical data from the AACR project GENIE biopharma collaborative in cBioPortal. *Can Res*. 2023;83(23):3861–7.
57. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013;6(269):p11.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Figure S1

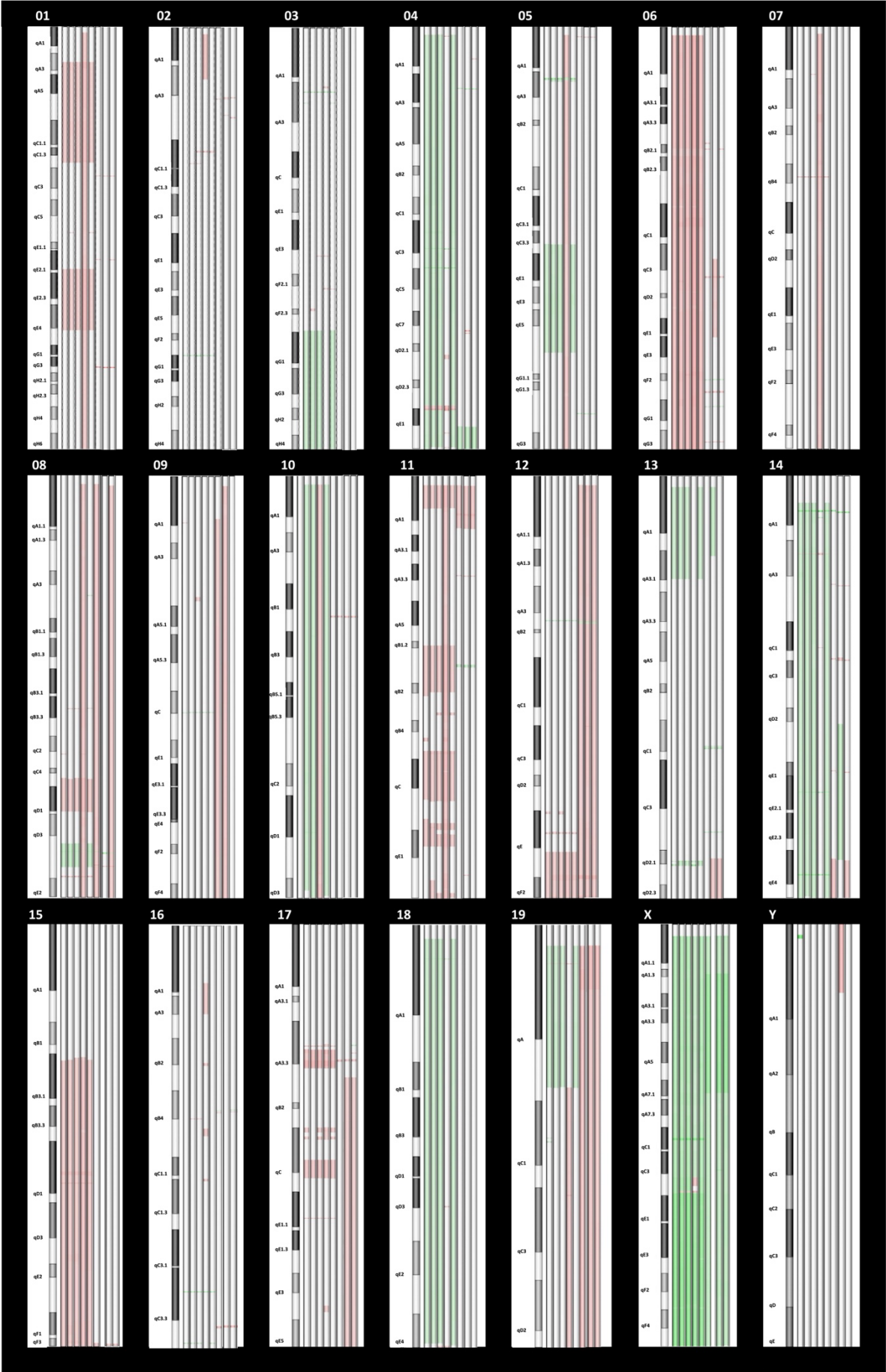


Figure S2A

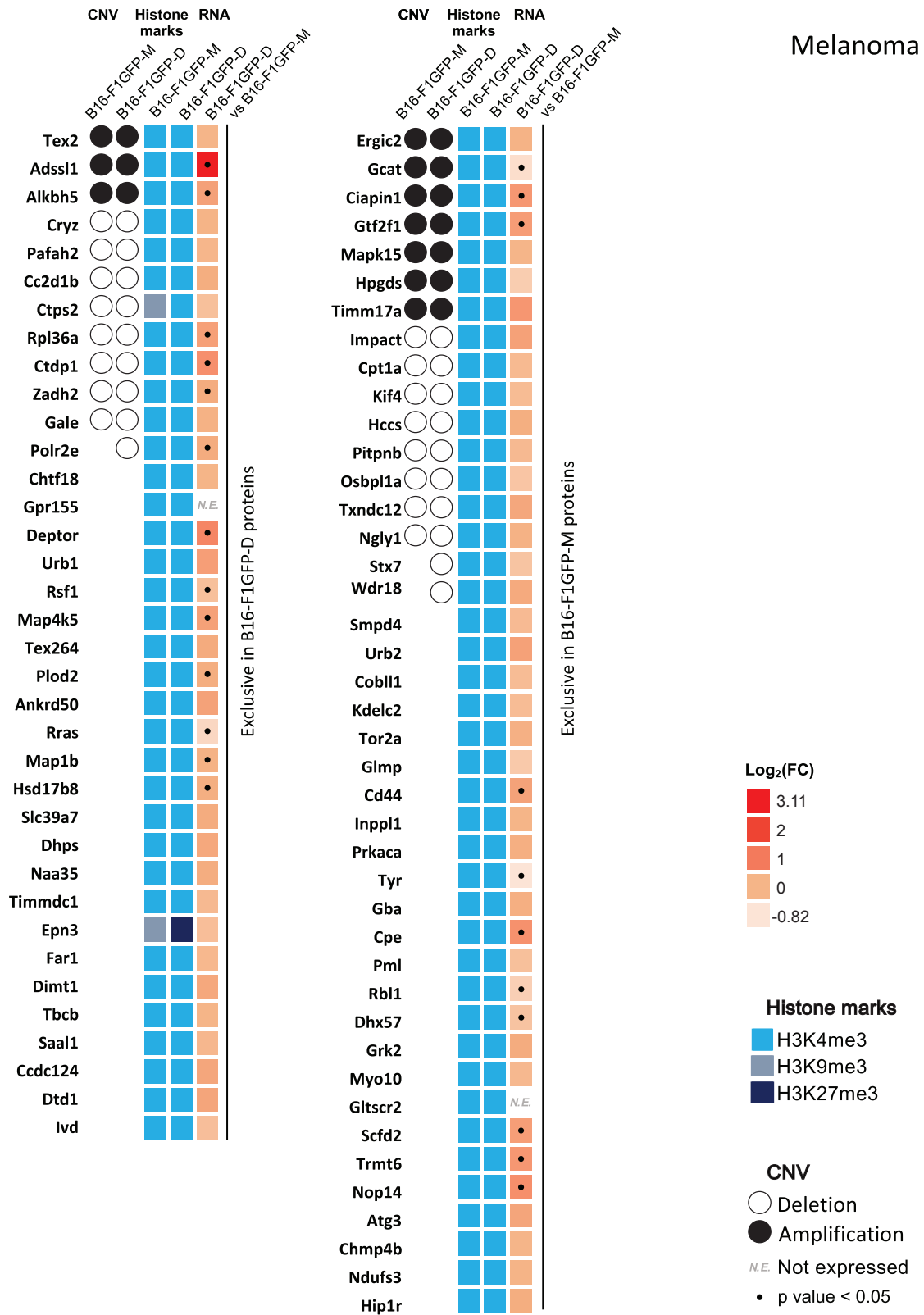
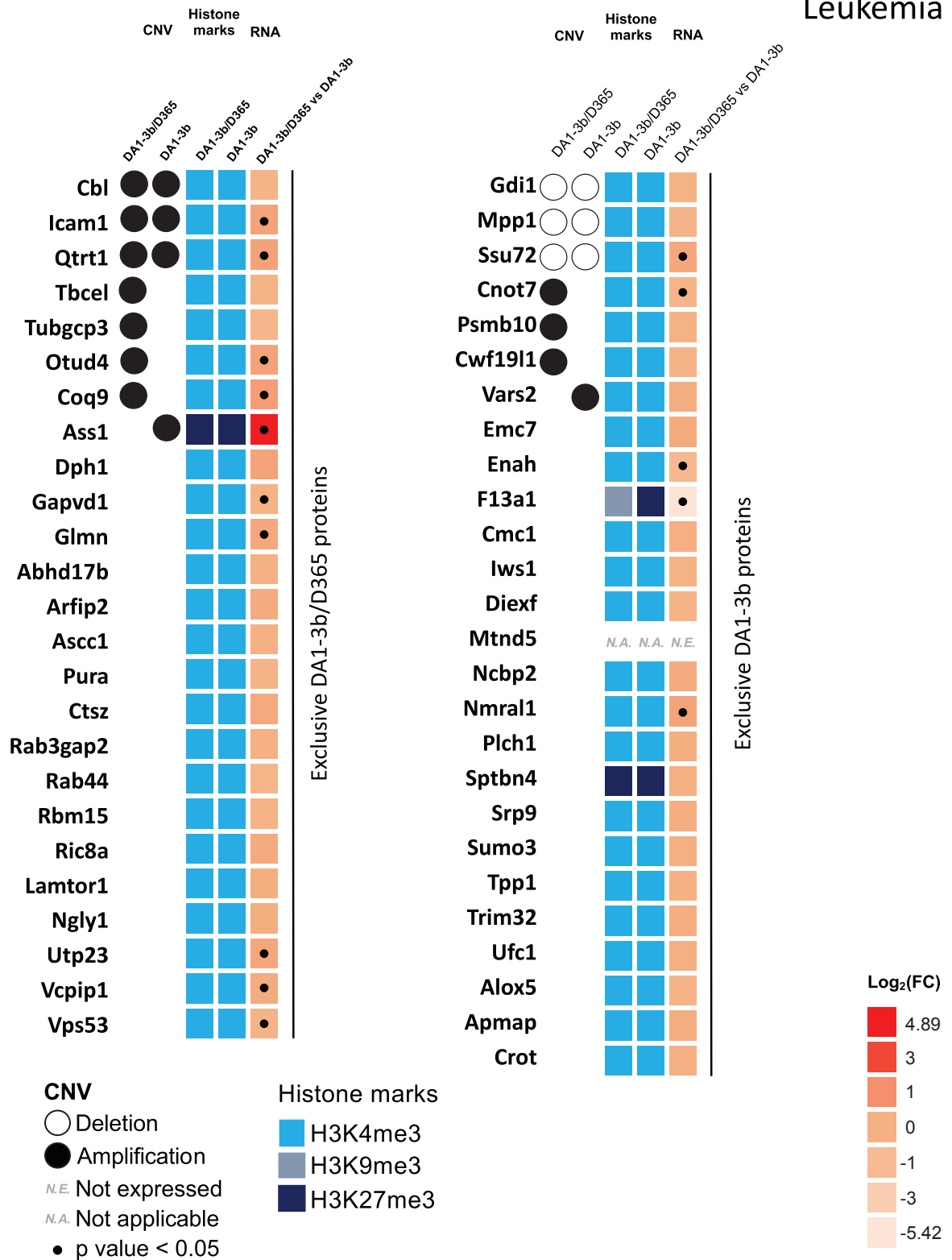


Figure S2B

Leukemia



ANNEXE 2 : IMPLICATION DE LA SIGNALISATION CALCIQUE DANS LA DORMANCE TUMORALE

CHAPITRE 1) REVUES SUR LA SIGNALISATION CALCIQUE

AVANT-PROPOS

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une hémopathie maligne complexe affectant des patients de plus de 65 ans dans la moitié des cas. Cette pathologie est caractérisée par une prolifération clonale de précurseurs myéloïdes que l'on appelle blastes, ainsi qu'une perte de leur différenciation. Bien que des progrès significatifs aient été mis en œuvre dans le dépistage et le traitement des patients atteints de LAM, le pronostic de ces patients demeure défavorable.

Dans les cellules souches cancéreuses (CSC), la signalisation calcique est l'un des premiers mécanismes altérés par des régulateurs épigénétiques. Lorsque l'homéostasie calcique est affectée, elle peut induire une prolifération cellulaire incontrôlée et influencer de nombreux processus biologiques, dont la tumorigenèse. Ce constat souligne le rôle majeur de l'homéostasie physiologique du calcium dans le devenir et la survie des cellules. Dans les cellules cancéreuses, on observe un remodelage de l'expression et de l'activité de canaux calciques ; cette altération contribue au phénotype néoplasique en perturbant les échanges intracellulaires (Prevarskaya *et al.*, 2018). Il est donc primordial de mieux décrypter le rôle du calcium

dans les mécanismes cancéreux, et d'identifier des cibles thérapeutiques pertinentes associées.

C'est dans cette perspective que ces revues, publiées en février 2022 et juin 2023 dans les journaux *Cells* et *Médecine/sciences*, exposent minutieusement l'état de l'art concernant la signalisation calcique dans les LAM. Elles relatent dans un premier temps les mécanismes inhérents à la prolifération, la différenciation et la quiescence des CSH saines et leucémiques. Il est ensuite question de l'implication du calcium dans le métabolisme mitochondrial des cellules. Le lien entre le microenvironnement de la niche osseuse et le destin cellulaire est également décrypté. Enfin, les différentes thérapies décrites ciblant la signalisation calcique sont abordées.

Review

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

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

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

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

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

* Correspondence: loic.lemonnier@inserm.fr

† These authors contributed equally to this work.

‡ Co-Senior authors.

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

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



Citation: Lewuillon, C.;

Laguillaumie, M.-O.; Quesnel, B.;

Idziorek, T.; Touil, Y.; Lemonnier, L.

Put in a “Ca²⁺II” to Acute Myeloid Leukemia. *Cells* **2022**, *11*, 543.

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

Academic Editors: Bruno Constantin and Valérie Coronas

Received: 30 November 2021

Accepted: 1 February 2022

Published: 4 February 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

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

Calcium ions are the main second messengers in cells and are crucial for cell fate and survival. Intracellular Ca²⁺ homeostasis relies on the organized activity of various Ca²⁺ channels, pumps, and exchangers, which maintain a precise Ca²⁺ concentration in the cytoplasm and organelles such as the endoplasmic reticulum (ER), mitochondria, lysosomes,

and nucleus [3–5]. Transient or sustained activation of this machinery regulates changes in the duration and levels of intracellular calcium, thereby governing calcium-dependent physiological processes.

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

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

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

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

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

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

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

2.1. Calcium and Cell Cycle Regulation in AML

Cell division and proliferation are ruled by the cell cycle, which is a four-stage process: the first gap phase G1; the S phase, in which DNA replication occurs; the second gap phase G2; and the M phase, or mitosis, in which the DNA and cytoplasmic material are shared between two new daughter cells. The progression between these different phases is tightly

regulated, and variations in intracellular Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i play a key role throughout the cell cycle, namely during the early G1 phase and at the G1/S and G2/M transitions.

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

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

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

2.2. Calcium Channels and Proliferation in AML

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

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

precise calcium-dependent mechanism underlying the aggressive phenotype of leukemic cells with high ITPR2 expression in AML.

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

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

2.4. Calcium Involvement in AML Differentiation

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

Myeloid differentiation involves the activation of new signaling pathways and the acquisition of new effector functions. Cellular calcium homeostasis and calcium-dependent signaling are intimately involved in these processes. Thus, intracellular calcium transport may be significantly remodeled during differentiation [34]. Some studies have shown the link between differentiation and calcium signaling in AML. It has been shown that the modulation of calcium pump expression, specifically of the sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) pumps, is an integral component of the differentiation program of myeloid precursors and indicates that lineage-specific remodeling of the ER occurs during cell maturation. In addition, it was shown that SERCA isoforms may serve as useful markers for the study of myeloid differentiation [34]. In vitro studies have shown the mechanisms implicated in leukemic cell differentiation. The binding of S100A9 to Toll-like receptor 4 (TLR4), which promotes the activation of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and Jun N-terminal kinase signaling pathways, could lead to myelomonocytic and monocytic AML cell differentiation [35]. Few studies have been published regarding the implication of calcium in the induction of AML cell differentiation through direct or indirect mechanisms. Calcium ionophores can, by themselves, induce the differentiation of primary human AML cells into dendritic cells [36]. It has also been shown that Ca^{2+} signaling, through the receptor IP3R1, sensitizes cells to the effect of retinoic acid. Differentiation induced by retinoic acid was associated with a significant reduction in c-Myc expression and an increase in membrane tyrosine kinase activity in AML cell lines [37].

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

In recent years, research has started to highlight that calcium channels play a key role in CSC function. Calcium channels are indeed involved in the mechanisms required for their function, leading to cancer progression and treatment resistance. Cancers are

most commonly treated with a combination of surgery, chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy. However, several studies have demonstrated that these treatments fail to target or actively select a specific subset of resistant cells termed CSCs [38]. CSCs are characterized by their capacity to remain quiescent and to resist apoptosis, properties generally associated with treatment resistance and tumor relapse [38]. Therefore, deciphering the mechanisms underlying the quiescence of cancer cells or CSCs appears to be crucial in cancer research.

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

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

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

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

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

Relapses in AML are a result of the persistence of chemoresistant leukemic cells, also termed minimal residual disease (MRD). Several studies have demonstrated subclonal heterogeneity and a hierarchy of human leukemia-initiating cells (LICs), including LSCs [45], and Bachas et al. showed that a minor subpopulation of LICs responsible for relapse was present at diagnosis in patients [46]. Therefore, a better understanding of the mechanisms of LSC regulation would help to prevent relapse in AML. As described above, some studies have shown that Ca²⁺ signaling is involved in HSCs and in CSC regulation. However, to our knowledge, no study has described the calcium signaling pathways involved in LSC/LIC regulation. Interestingly, RNA-seq analysis of AML patient samples revealed that some NFAT isoforms (NFATc2/3) were overexpressed in AML blasts at relapse compared to blasts at diagnosis [47]. Although the mechanisms were not described in this study,

these observations could link calcium-dependent pathways to the properties of leukemic cells causing relapse in AML. Further investigations are needed to better understand the calcium-associated mechanisms underlying relapse in AML, particularly those related to LSCs.

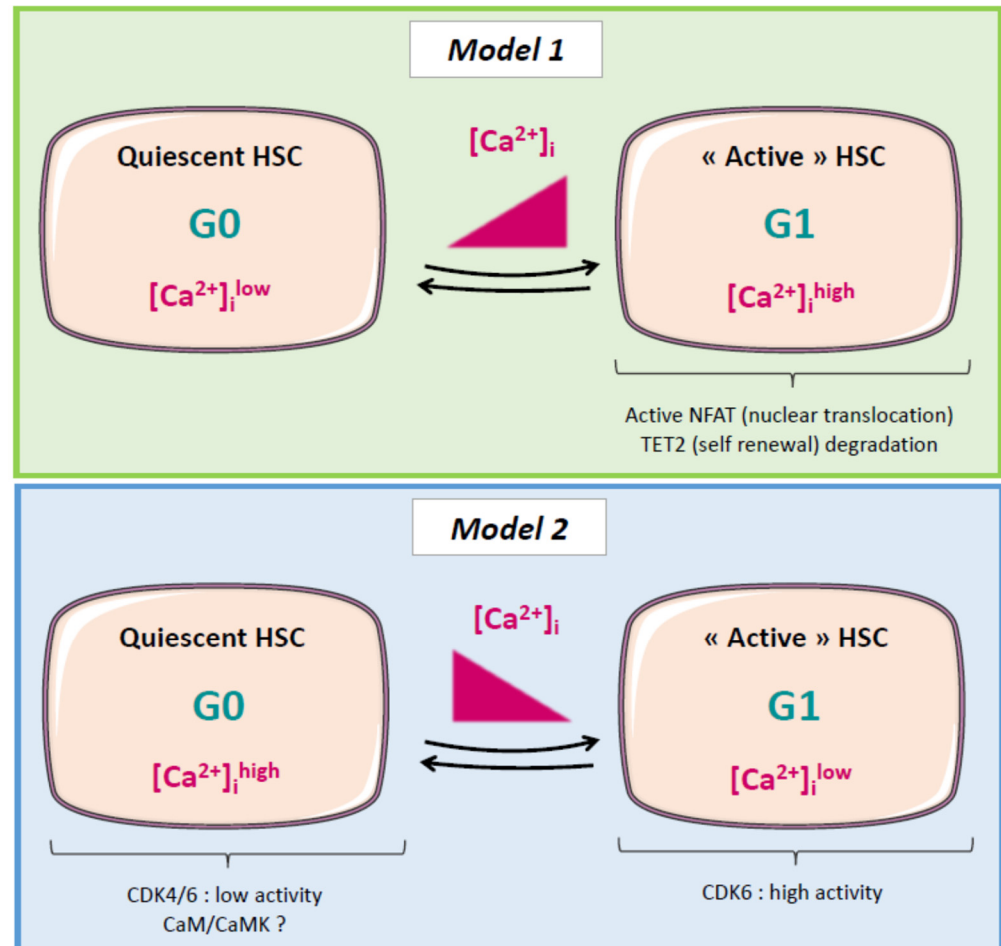


Figure 1. Schematic diagram illustrating the two proposed models of calcium-dependent mechanisms controlling the switch between quiescence and cycling state in HSC. In model 1 [42] and model 2 [9], quiescent hematopoietic stem cells (HSC) display distinct features compared to the cycling/active HSC.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

2.7. Future Directions

In the above sections, we have highlighted several targets/pathways of interest and hypothetical mechanisms associated with calcium signaling (summarized in Table 1 and in Figure 1) and related to AML proliferation and differentiation or to CSC/HSC quiescence. Nevertheless, few studies have investigated the link between calcium signaling and AML cell differentiation or cell cycle regulation so far, and none were performed on leukemic stem cells. In addition, some observations are contradictory. This may be explained by (i) the different origins of the biological material used, i.e., cells lines vs. primary leukemic cells cultured in different laboratories; (ii) the difficulty in studying rare cells such as HSC or LSC; and (iii) the high heterogeneity of AML disease. Regarding the last point, and as was already mentioned, AML is a complex and highly heterogenous hematologic malignancy which displays a plethora of genetic/epigenetic modifications, possibly impacting calcium signaling and therefore leukemic cell fate toward differentiation and/or proliferation.

Interestingly, it was shown in normal myeloid cells that NFAT negatively regulates genes that dictate entry in the cell cycle, such as Cdk4 and Cdk6. This effect was associated with the FLT3 ligand-associated signaling and the phospholipase PLC γ 1-dependent calcium influx [48]. This study suggests that NFAT proteins can inhibit proliferative signaling in myeloid cells and interact with the FLT3 receptor, a protein commonly mutated in AML. It could therefore be interesting to focus future efforts to study the impact of Ca²⁺ signaling on key actors of cell division and proliferation in AML cells, depending on the genetic background and/or the differentiation stage of the disease.

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

Sub-Sections	Targets	Mechanisms	Biological Effect	Biological Sources	References
Ca²⁺ Signaling and Cell Cycle Regulation	CaM	-Increased cytosolic CaM -Transition G1 to S -Decreased Cdk inhibitors p27 (kip1) and p16 (ink4a)	Increased proliferation	HL60 promyelocytic AML cell line	[17]
	CaMKII	-Increased cyclin A, B1, D1	-Increased proliferation -Cell cycle progression	AML cell lines	[19]
	CaMKIV	-Increased p27, p16 -Decreased cyclin A, B1, D1	-Decreased proliferation	AML cell lines	[19]
	CaMKIV	-Phosphorylation Rb	Increased proliferation Proliferation?	Primary AML cells	[18]
	Calcineurin	-Transition G1 to S -Cyclin A, D1? -Cyclin E, E2?	Decreased calcineurin activity (-85%)	Sera from AML patient	[24]
Ca²⁺ Channels and Proliferation in AML	TRPM2	ATF4, CREB	Increased proliferation	Primary AML cells	[25]
	Cav.1.2, L-type calcium channel	-Ca ²⁺ entry	Increased proliferation Cell cycle progression	Primary AML cells	[26]
	ITPR2	SERCA pumps	Cell cycle progression	Primary AML cells	[27]
Notch and Ca²⁺ Signaling in AML Proliferation	Notch/Delta ligand	-Calcium sensor receptor -SOCE	Increased proliferation	TMD7 AML cell line	[29]
	Notch/Delta1 ligand	-Calcium sensor receptor -SOCE	Increased proliferation	HL60 promyelocytic cell line	[30]
	Notch/Jagged1 ligand	-Calcium sensor receptor -SOCE	Decreased proliferation	Primary AML cells, AML cell lines	[28,33]
Calcium Involvement in AML Differentiation	SERCA pumps	-Ca ²⁺	Increased differentiation	Primary AML cells	[34]
	S100A9/TLR4	-p38, ERK1/2, JNK	Increased differentiation	Primary AML cells	[35]
	Ca ²⁺ concentration		Increased differentiation	Primary AML cells	[36]
	IP3R1	-Decreased c-myc expression	Increased AML cells	AML cell lines	[37]

Compared to normal myeloid cells, contradictory results regarding the role of NFAT in proliferation have been shown in AML. Indeed, the NFAT isoform c1 was shown to be frequently overexpressed in AML cells bearing the FLT3 mutation and displaying an

excessive proliferation [49]. Despite the discordant observations made between normal and leukemic cells, this study underlines the possible link between calcium signaling and cell cycle regulation in AML cells with a specific genetic anomaly background. Further studies are thus still required to better understand the precise role of calcium signaling in AML proliferation and differentiation.

3. Mitochondria, Calcium, and AML

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

The citric acid cycle, also known as the TCA cycle or the Krebs cycle, is a metabolic pathway in all aerobic organisms whose primary function is to oxidize acetyl groups, notably from degraded carbohydrates, fats, and proteins, to restore energy production. The process yields one GTP or ATP and several electrons that circulate through the respiratory chain to allow the formation of additional ATP molecules through OXPHOS. Mitochondrial Ca^{2+} uptake engages aerobic metabolism by triggering the activity of three TCA cycle dehydrogenases: pyruvate dehydrogenase (PDH) via pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1) and isocitrate and α -ketoglutarate dehydrogenases (IDH and OGDH, respectively) (for review see [52]).

3.1. Normal Hematopoiesis

Hematopoiesis takes place in the bone, and HSCs share a specialized microenvironment called a niche with a variety of other cells, such as osteoblasts, osteoclasts, macrophages, adipocytes, and perivascular mesenchymal and endothelial cells, to maintain their pluripotent status. The niche provides hypoxic conditions for the maintenance of HSC quiescence. Quiescent HSCs display low intracellular Ca^{2+} levels in both the cytosol and mitochondria in vivo, which is partly fulfilled via low plasma membrane Ca^{2+} influx activity [43]. Low-calcium environments maintain HSCs' stem cell features in vitro. In turn, high Ca^{2+} levels increase mitochondrial OXPHOS and compromise stem cell functions while promoting the gene expression of a series of differentiation markers [8], indicating that disturbing mitochondrial Ca^{2+} signaling may reshape the future of HSCs. Fukushima et al. developed a strategy to discriminate quiescent (dormant) from active stem cells using a nonphosphorylatable p27 G0 marker fused to a yellow fluorescent protein, and this strategy bypassed the ER/mitochondrial pathways. Their data show the implication of the calcium concentration in dormancy. Reconstitution of the BM by HSCs in vivo is promoted by a high concentration of cytoplasmic calcium [9], somewhat opposing the results obtained by Luchsinger et al. in their in vitro model.

Under some conditions, such as interferon treatment or 5-fluorouracil-induced BM suppression, HSCs exit the quiescent state and actively enter the cell cycle [43,53]. Umemoto et al. provided evidence that the initiation of cell division starts with increased intracellular Ca^{2+} levels. The resulting enhancement of mitochondrial membrane potential is accompanied by increases in mitochondrial Ca^{2+} levels, mitochondrial superoxide levels, and intracellular ATP content. Inhibiting the increase in intracellular Ca^{2+} via treatment with nifedipine, an antagonist of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels (LTCCs), drastically affected mitochondrial Ca^{2+} levels and preserved HSC stem cell features.

One potential mechanism by which mitochondrial Ca^{2+} controls the HSC cell cycle and gene expression is epigenetic regulation. Aside from increased ATP synthesis and ROS production, Ca^{2+} affects the epigenome by allowing the formation of acetyl-CoA and α -ketoglutarate (α -KG). While acetyl-CoA is known to be an essential substrate for histone acetylation, α -KG could also play a role. Lombardi et al. recently provided evidence that the loss of mitochondrial Ca^{2+} uptake stimulates myofibroblast differentiation and fibrosis. They identified that MICU1-mediated MCU triggering elicits a metabolic switch;

in this process, α -KG regulates the activity of histone demethylases, including histone lysine demethylases (KDMs) and ten-eleven-translocated (TET) enzymes, and epigenetic remodeling ultimately regulates cell fate [54].

3.2. LSCs and AML

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

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

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

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

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

In addition, several components of the calcium signaling family at the plasma membrane have been described in AML. At the level of purinergic P₂ receptors, decreased expression of P₂X₃ genes involved in apoptosis mechanisms was observed in EVI-1 AMLs [73]. Conversely, P₂X₇R upregulates Pbx3, therefore promoting the progression of MLL-AF9 AML [74].

3.3. Mitochondrial Calcium and Its Implication in Cancer Mechanisms

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

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

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

3.4. Isocitrate Dehydrogenase in AML

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

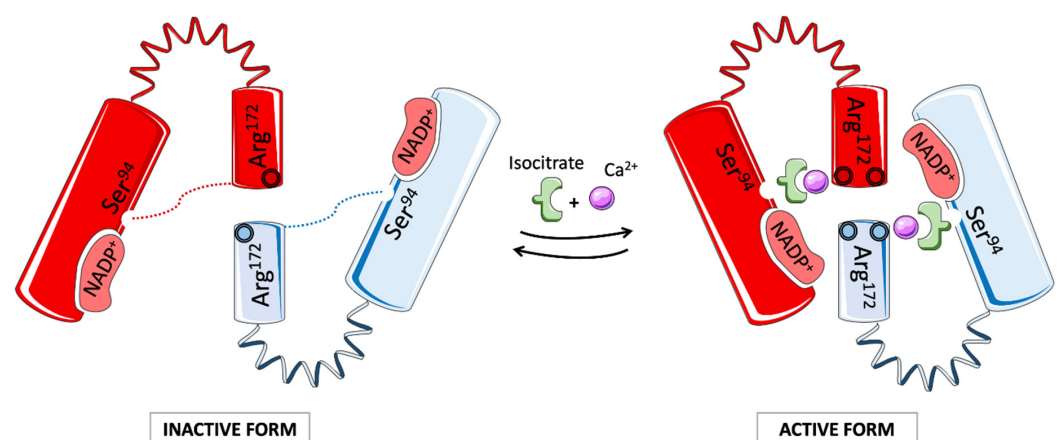


Figure 2. Structure and activation of wild-type IDH2. IDH2 functions as a homodimer, each containing a large NADP⁺-binding/catalytic domain linked to the small domain by a clasp structure. The open form is maintained by hydrogen bonds between Ser⁹⁴ and Arg¹⁷², which obstruct the active site.

IDH2 becomes activated by switching its conformation. The substrate binding site is made of binding sites for NADP^+ and isocitrate bound to divalent cations such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Mn^{2+} . The oxidative catalysis and decarboxylation of isocitrate induce the production of α -KG and NADPH . Mutations in the IDH2 active site provide a gain-of-function activity that converts α -KG to the D2HG oncometabolite (adapted from [79,80]).

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

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

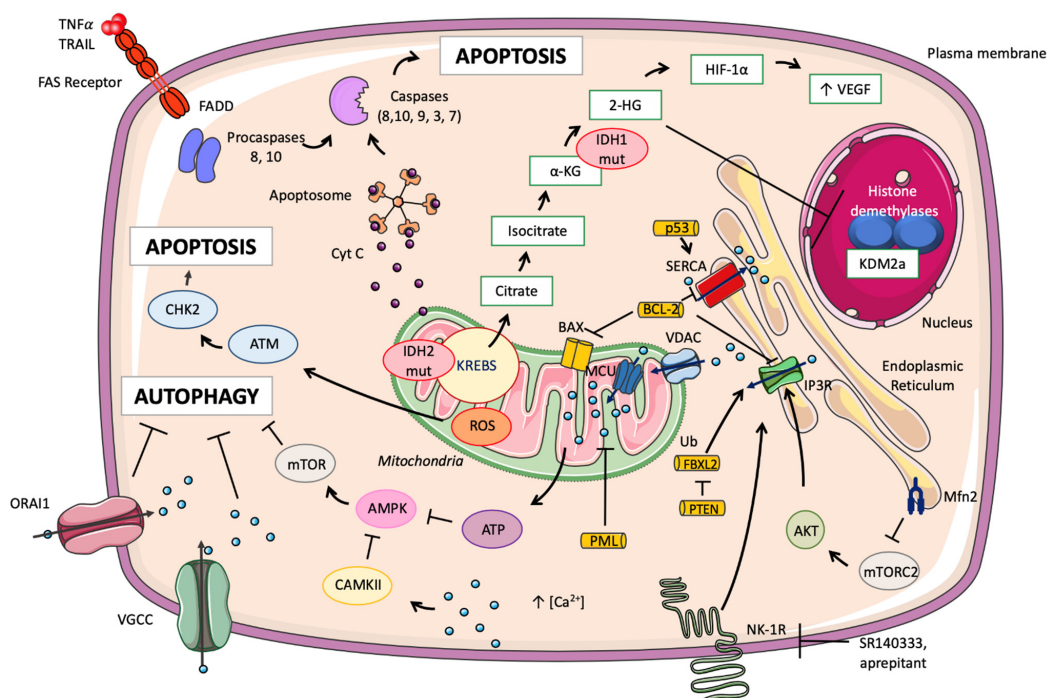


Figure 3. Mitochondrial calcium and its implication in cancer mechanisms. Calcium plays a role in

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

4. Calcium, Microenvironment, and AML Cells

HSCs reside in close proximity and interact with various cellular components in the BM, such as mesenchymal stem cells, endothelial cells, osteoblasts, osteoclasts, macrophages, and immune cells, including T lymphocytes and natural killers. The term niche is used when nonhematopoietic cells interact with HSCs to influence their functions such as adhesion, quiescence, differentiation, and proliferation by producing cytokines, chemokines, and other soluble factors [93].

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

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

4.1. Role of the Endosteal Niche

Bone is the major calcium stock in the body and a key regulatory organ for calcium homeostasis. Bone marrow (BM) consists of a complex hypoxic microenvironment that includes mainly osteoblasts and osteoclasts. Together, they secrete calcium and synthesize the bone matrix, thus forming an interface between calcified bone and marrow cells: the endosteal niche. It has been established that HSCs live in niches within the BM

microenvironment that control HSC dormancy, self-renewal, and mobilization through the production of several factors [95,96].

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

Some studies have shown that extracellular Ca^{2+} is able to bind to calcium-sensing receptors (CaRs), G-protein-coupled receptors responsible for the regulation of extracellular calcium homeostasis in HSCs residing in the BM [95]. As LSCs also express CaRs, they are sensitive to calcemia, which is controlled by calcitropic hormones such as the parathyroid hormone (PTH) and vitamin D [106]. The binding of extracellular calcium to LSC CaRs stimulates the secretion of PTH-related peptide (PTHrP) through L-type voltage-sensitive calcium channel activation and promotes tumor cell proliferation and survival. CaR deficiency reduces the marrow cellularity and disrupts the localization of LSCs, demonstrating the role of CaRs and PTH as key regulators of the endosteal niche and making them potential targets to reduce LSCs [96,107,108]. Although it has been studied in normal HSCs and CML, for now, we can only assume that this mechanism is common to all leukemic stem cell types, including the AML stem cells residing in the BM for which no data currently exist. Moreover, the precise calcium signaling pathway associated with CaR activation remains elusive, as no calcium channel has explicitly been identified in this context.

4.2. Modulation by Retinoic Acid (RA)

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

An interesting study showed a direct interaction between CaMKII γ and RARs mediated through a CaMKII LxxLL signature pattern in myeloid cells. CaMKII γ binds RAR target sites within myeloid gene promoters and phosphorylates RAR to inhibit its transcriptional activity, thus regulating myelopoiesis. Inhibition of CaMKII considerably enhances

the granulocytic differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, meaning that RA prevents LSC differentiation through calcium signaling [112]. Another study proposed that RA-treated leukemic cells display an increase in the expression of the adhesion molecules VLA4, LFA1, VCAM-1, and ICAM1, resulting in an important rise in leukemic cell adhesion to the niche [113]. Similarly, ATRA, a vitamin A derivative, has been shown to have a high affinity for RAR and to induce cell differentiation by increasing the expression of the Ca^{2+} signaling pathway effectors PKC, MAPK, and PI3K, which are required for the activation of transduction pathways leading to cell differentiation [114–117]. Moreover, ATRA also seems to enhance the production of $\text{TGF}\beta 2$, which is abundant in the BM and induces cell dormancy through a p38-dependent signaling pathway leading to the activation of the dormancy-associated proteins DEC2/Sharp1 and p27kip1 [107,118].

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

4.3. The Vascular Niche

Leukemic stem cells interact not only with the endosteal niche but also with the vascular niche. Indeed, HSC activity seems to be linked to vascular development, and this niche contains a large amount of soluble factors and cellular elements that may contribute to leukemia homeostasis [94,121]. Although the vascular niche is being studied in murine models, there are still many gaps in our knowledge of the human vascular niche. What has been shown until now is that mesenchymal stem cells (MSCs) are essential for the well-being of the HSC niche, as they facilitate stem cell engraftment to the vascular niche. MSCs go to the peripheral blood in higher numbers under hypoxic conditions, suggesting that several cell types in the BM niche are also sensitive to hypoxia. LSCs, characterized by a low division rate, come from one of the most hypoxic regions, where they are “hidden” from immune cells and avoid exposure to chemotherapeutic drugs, therefore increasing their survival rate [122].

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

The secretion of adhesion factors by a variety of cell types and via different Ca^{2+} -dependent mechanisms in microenvironment niches shows the interconnection between those niches and their importance for AML stem cell proliferation and survival. What remains to be identified are the calcium channels and the associated calcium signaling pathways involved in all the mechanisms described above (Figure 4) [97,129].

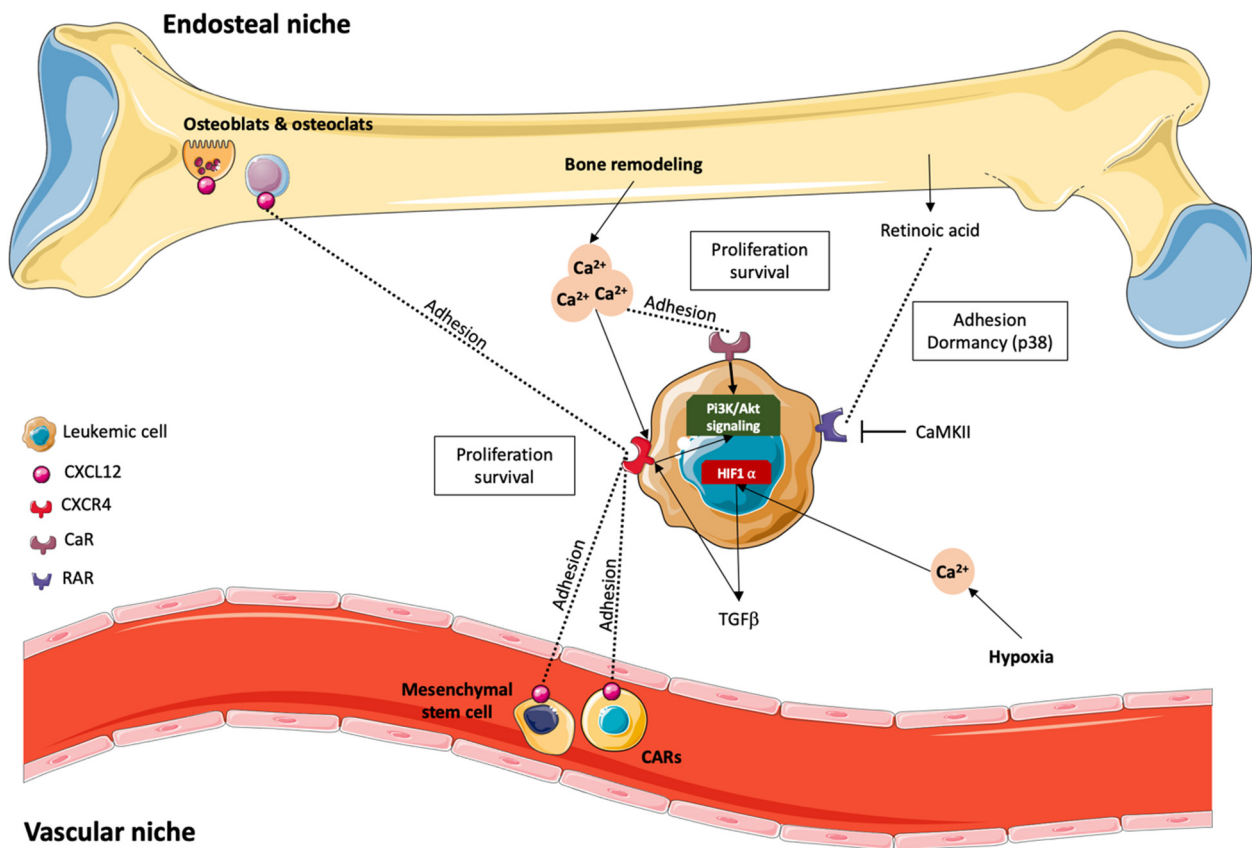


Figure 4. Mechanisms of adhesion to the niche. The binding of CXCL12 expressed by mesenchymal stromal cells, CARs, osteoclasts, and osteoblasts to CXCR4 expressed by leukemic stem cells induces an increase in intracellular calcium ion levels, leading to the entrance of LSCs into the vascular or endosteal niche, which in turn induces prosurvival and proliferative signaling pathway mobilization. Bone remodeling is responsible for the high extracellular calcium level, which enables the binding of calcium to the CaRs expressed by LSCs, thus helping the cells adhere to the niche. RA present in the BM microenvironment can bind to its RARs expressed on LSCs, inducing the regulation of LSC growth, proliferation, differentiation, apoptosis, and immune response; however, RAR activity can be modulated by CaMKII. The hypoxic environment of the BM seems to have proliferation-inducing and prosurvival effects on AML cells and upregulates CXCR4 expression on blasts, allowing them to adhere to the niche.

4.4. Immune Escape

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

The binding of the target cell major histocompatibility complex (MHC) or antigen to the T lymphocyte T cell receptor (TCR) complex induces the release of ER calcium stores. In turn, ER Ca²⁺ store depletion leads to the oligomerization of the calcium-sensing stromal interaction molecule 1 (Stim1) protein. Then, Stim1 oligomers translocate to regions near the plasma membrane, where they directly bind to calcium-release-activated channels (CRACs) via their STIM1 Orai-activating region (SOAR) domains. This interaction leads to the CRACs opening and subsequent capacitative Ca²⁺ entry, inducing the formation of the Ca²⁺/CaM/calcineurin complex. This calcium influx enables the mobilization of various signaling pathways involving the activation of transcription factors such as NFAT and AP-1 and leads to T cell activation (proliferation, cytokine secretion) or exhaustion. T

lymphocyte activation or exhaustion depends on which transcription factors are activated or paired together. For instance, the Ca^{2+} /CaM/calcineurin complex can dephosphorylate NFAT, which, within minutes, translocates to the nucleus, where it binds to regulatory sequences and modulates the expression of several genes, including PD-1 and the cytokine $\text{IFN}\gamma$ [127,128,131,132]. An interesting study showed that when activated alone or paired with AP-1, the transcription factor NFAT allows the activation of T lymphocytes. However, another study showed that when paired with the transcription factors BATF or IRF4, NFAT leads to an exhausted phenotype, where T lymphocytes lose their ability to fight cancer cells, synthesize cytokines, and proliferate [133,134].

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

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

PD-L1 is expressed in approximately 30% to 60% of leukemic blasts, depending on the patient. An increase in PD-L1 expression in AML patients after MRD has already been shown; it has also been shown that PD-L1 expression is the reason why LSC can resist CD8 T lymphocyte attack after chemotherapy treatment [137,140]. Other important studies also linked the induction of PD-L1 expression by the cytokine $\text{IFN}\gamma$ secreted by T lymphocytes with AML blast calcium signaling. Indeed, the IFN receptor expressed by tumor cells can activate the Ca^{2+} /calmodulin/calcineurin pathway through the production of IP_3 , leading to the activation of NFAT, which can in turn activate the PD-L1 gene. As a result, AML cells expressing PD-L1 can inhibit T cells presenting the surface molecule PD-1 and prevent them from proliferating and secreting cytotoxic cytokines [141,142]. Additionally, calcium influx activates NFAT, which in turn activates the $\text{IFN}\gamma$ gene promoter, therefore inducing $\text{IFN}\gamma$ production. CD8 T lymphocytes represent an early source of NFAT-dependent $\text{IFN}\gamma$ production during the adaptive response [143]. Studies have shown that in AML, anthracyclines are likely to activate immunogenic cell death (ICD) through cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and the secretion of $\text{IFN}\gamma$. As said before, this secretion of $\text{IFN}\gamma$ allows T cell proliferation as well as an increased expression of PD-L1 on AML cells, and for now, a possible approach to preventing this adaptive resistance and diminishing the risk of relapse could be to associate immune checkpoint inhibition with chemotherapy [144,145].

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

In summary, the BM microenvironment is a regulator of AML cells that influences their functions and changes the course of the disease. Study of the direct interaction between the microenvironment and AML cells has provided growing evidence that (i) calcium signals from the BM microenvironment can release or activate AML cells and (ii) calcium signals from leukemic cells can remodel existing niches to maintain their proliferation and resistance. These findings and the enhanced sensitivity to cytotoxic chemotherapy with

related targeting agents suggest that such signals may represent candidate targets for novel therapeutic strategies [121,149–152].

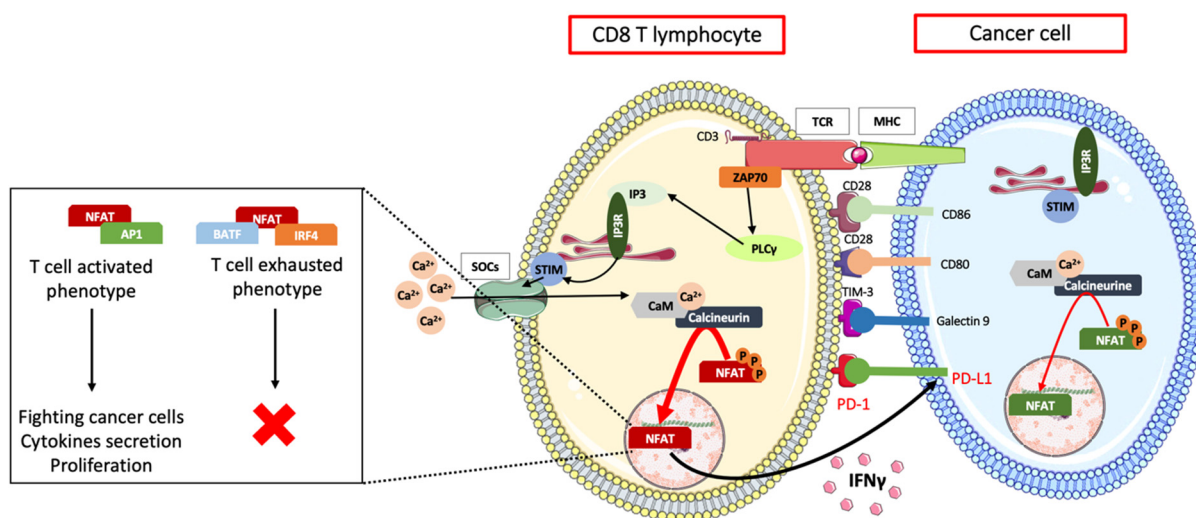


Figure 5. Cancer cell immune escape. The binding of the target cell's MHC or antigen to the T lymphocyte TCR complex induces the release of ER calcium stores, leading to Stim1 oligomerization and allowing calcium entry through plasma membrane CRAC channels. Capacitive Ca^{2+} entry induces the formation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

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

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

5.1. Chemotherapies, Calcium, and Mitochondria

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

Several studies have shown that even without specifically targeting TRPM2, mitochondrial activity is altered by potential therapeutic drugs used for the treatment of AML patients. Such an example was recently provided by Wang et al. [156], who developed a new drug, AKI604, that specifically inhibits Aurora kinase A (AURKA). Aurora kinases are known to be overexpressed in several cancers, including AML, where they participate in mitosis and cytokinesis. Aurora kinase inhibitors were thus developed, and one of them (AZD1152) was used in clinical studies as a potential treatment for AML patients after it was shown to decrease AML cell viability and proliferation and to induce apoptosis [157,158]. In their study, Wang et al. showed that AKI604 can revert the effect of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) on leukemia cells, namely increased proliferation. This result is particularly relevant since STAT5 is known to be aberrantly activated in the blasts of AML patients [159], to lead to decreased sensitivity to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) [160], and to control AURKA expression [161]. AKI604 treatment was associated with mitochondrial activity impairment, disruption of mitochondrial membrane potential, and an increase in ROS production. These effects were also associated with an increase in cytoplasmic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$), but the study unfortunately did not provide further clues as to the origin and consequences of this modification of calcium homeostasis. However, treatment with AKI604 decreased tumor growth in a xenograft model, thus proving its potential as a therapeutic drug. Another recent study proposed a combination of three drugs to improve AML patient survival, one of which (pimozide) is known as an inhibitor of voltage-gated calcium channels. While it was shown that the combination of the BH3 mimetic ABT-263, mTOR inhibitor AZD 8055, and pimozide was efficient in inducing cell death in resistant AML cell lines and that this effect involved ROS production and the disruption of mitochondrial activity, no evidence was provided regarding the precise impact of calcium homeostasis on this synergistic effect [162].

5.2. Modulation of ER Calcium Stores

As presented in this review, several reports have shown a link between potential chemotherapeutic drugs and mitochondrial activity. Drugs can, however, target other key players of the calcium signaling pathway, including inositol 1,4,5 trisphosphate receptors (IP3Rs), whose activation will result in the release of calcium by the ER, an increase in $[Ca^{2+}]_c$, and the stimulation of numerous calcium signaling pathways. One of those drugs is wogonoside, a flavonoid of natural origin, which was shown to have antiproliferative effects on AML cells via the upregulation of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) [163]. This initial study showed that wogonoside promotes PLSCR1 translocation into the nucleus,

where it binds the promoter region of IP3R1 and increases its expression. In a subsequent work, this team tried to better understand the role of calcium homeostasis in the observed effects of wogonoside. Using primary AML cells, they identified several targets modulated by wogonoside and related to its effects on cell proliferation and differentiation; specifically, they found that cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21Cip1) and 1B (p27Kip1) were upregulated and c-Myc was downregulated. Moreover, they closely monitored the impact of wogonoside on the cytosolic calcium concentration and showed that the drug increased $[Ca^{2+}]_c$ over time, reaching a peak at 72 h of treatment. Using 2-APB, a broad-spectrum calcium channel inhibitor also targeting IP3Rs, in combination with extracellular calcium removal, they concluded that this increase in $[Ca^{2+}]_c$ leading to AML cell differentiation was mostly due to calcium release from the ER via IP3R1 and not to calcium influx through the plasma membrane [37]. Interestingly, IP3R2 was also reported by another team to be overexpressed in cytogenetically normal AML and to represent a predictive biomarker associated with a worse prognosis and decreased overall survival [27]. These apparently contradictory observations illustrate the need to further investigate the roles of all IP3R isoforms in AML and of the associated calcium signaling pathways to better understand disease progression and the resistance of this cancer to current chemotherapies.

5.3. Chemotherapies Impacting Calcium Influx

Some drugs proposed for the treatment of AML were described as being able to increase $[Ca^{2+}]_c$ via their direct effect on plasma membrane receptors or calcium channels. Such an example is 4-aminopyridine (4-AP), a commonly used voltage-gated potassium channel inhibitor. The application of 4-AP to AML cell lines was shown to inhibit these channels and to induce apoptosis. However, upon further investigation, Wang et al. demonstrated that the proapoptotic effect of 4-AP was mostly mediated by the activation of the ATP-gated P_2X_7 receptor. Indeed, 4-AP application induces calcium entry through this ionotropic receptor located in the plasma membrane, leading to a $[Ca^{2+}]_c$ increase and to the induction of apoptosis, an effect completely abrogated in AML cells silenced for the P_2X_7 receptor [164]. A similar work led to the identification of nutraceutical glucopsychosine, a lipid derived from bovine milk, as a potential antileukemia compound. Glucopsychosine was shown to selectively induce apoptosis in a caspase-independent manner in AML cells, but not in normal hematopoietic cells, as a result of calpain activation. Calpain was activated here by an increase in $[Ca^{2+}]_c$ resulting from calcium entry through unidentified plasma membrane calcium channels [165]. Another study showed that the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib can also induce apoptosis when applied to AML cells by increasing $[Ca^{2+}]_c$ without directly disrupting ER- or mitochondria-associated calcium signaling. This increase in $[Ca^{2+}]_c$ was directly linked to the activation of specific plasma membrane calcium channels, namely SOCs, which represent the main calcium entry pathway in non-excitable cells [166]. The pharmacological tools and mRNA screenings used in this study led the authors to propose Orai3 as the main channel involved in the effects of tipifarnib. However, a later study proposed Orai2 and Orai1 as the main components of SOC channels in AML cells, again illustrating the need to better characterize the main calcium entry pathways in this model [167].

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

5.4. Future Directions

One of the main signaling pathways activated by extracellular calcium entry or increased intracellular calcium concentrations is the calmodulin/calcineurin/NFAT pathway (for review, see [169]). As shown above, many drugs proposed to treat AML patients

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

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

Molecules	Targets	Clinical Use	Clinical Impact	Mechanism	Ref
Amlodipine/ Diltiazem	L-type calcium channels	Yes (heart disease, hypertension)	Decreased AML patient survival	L-type calcium channels inhibitors	[154]
A23	TRPM2 channel	No	-	TRPM2 inhibitor makes AML cells more sensitive to chemotherapies in vitro (increases ROS production)	[25]
AKI604	Aurora kinase A (AURKA)	No	-	AURKA inhibitor impairs mitochondrial activity, increases ROS production and cytoplasmic calcium concentration, and decreases tumor growth in xenograft models	[156]
Pimozide	Voltage-gated calcium channels	No	-	In combination with ABT-263 and AZD 8055, pimozide impairs mitochondrial functions and induce resistant AML cell lines apoptosis	[162]
Wogonoside	IP3R1	No	-	Inhibits proliferation through PLSCR1 activation, IP3R1 upregulation, and the resulting increase in cytoplasmic calcium concentration leading to AML cell differentiation	[37,163]
4-AP	Voltage-gated potassium channel	No	-	Inhibition of voltage-gated potassium channels by 4-AP leads to plasma membrane depolarization, calcium entry into AML cells via ionotropic P_2X_7 receptor, and induction of apoptosis	[164]
Glucopsychosine	Unknown	No	-	Induces apoptosis in AML cells, but not in normal hematopoietic cells, via a calcium entry through unknown calcium channels	[165]
Tipifarnib	Farnesyltransferase	No	-	Tipifarnib inhibits farnesyltransferase and increases intracellular calcium concentration through SOC channels activation, leading to AML cell apoptosis	[166]

Another possible direction for future research is the use of drugs targeting calcium channels expressed by both AML and the tumor microenvironment cells. Indeed, as

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

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

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

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

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

References

1. Medinger, M.; Passweg, J.R. Acute Myeloid Leukaemia Genomics. *Br. J. Haematol.* **2017**, *179*, 530–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pollyea, D.A.; Bixby, D.; Perl, A.; Bhatt, V.R.; Altman, J.K.; Appelbaum, F.R.; de Lima, M.; Fathi, A.T.; Foran, J.M.; Gojo, I.; et al. NCCN Guidelines Insights: Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2021**, *19*, 16–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Roderick, H.L. Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 517–529. [[CrossRef](#)]
4. Clapham, D.E. Calcium Signaling. *Cell* **2007**, *131*, 1047–1058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Oliveira, A.G.; Guimarães, E.S.; Andrade, L.M.; Menezes, G.B.; Fatima Leite, M. Decoding Calcium Signaling across the Nucleus. *Physiology* **2014**, *29*, 361–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Patergnani, S.; Danese, A.; Bouhamida, E.; Aguiari, G.; Previati, M.; Pinton, P.; Giorgi, C. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cabanas, H.; Harnois, T.; Magaud, C.; Cousin, L.; Constantin, B.; Bourmeyster, N.; Déliot, N. Deregulation of Calcium Homeostasis in Bcr-Abl-Dependent Chronic Myeloid Leukemia. *Oncotarget* **2018**, *9*, 26309–26327. [[CrossRef](#)]
8. Luchsinger, L.L.; Strikoudis, A.; Danzl, N.M.; Bush, E.C.; Finlayson, M.O.; Satwani, P.; Sykes, M.; Yazawa, M.; Snoeck, H.-W. Harnessing Hematopoietic Stem Cell Low Intracellular Calcium Improves Their Maintenance In Vitro. *Cell Stem Cell* **2019**, *25*, 225–240. [[CrossRef](#)]
9. Fukushima, T.; Tanaka, Y.; Hamey, F.K.; Chang, C.-H.; Oki, T.; Asada, S.; Hayashi, Y.; Fujino, T.; Yonezawa, T.; Takeda, R.; et al. Discrimination of Dormant and Active Hematopoietic Stem Cells by G(0) Marker Reveals Dormancy Regulation by Cytoplasmic Calcium. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 4144–4158.e7. [[CrossRef](#)]
10. Zhao, M.; Li, L. Osteoblast Ablation Burns out Functional Stem Cells. *Blood* **2015**, *125*, 2590–2591. [[CrossRef](#)]
11. Bowers, M.; Zhang, B.; Ho, Y.; Agarwal, P.; Chen, C.-C.; Bhatia, R. Osteoblast Ablation Reduces Normal Long-Term Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal but Accelerates Leukemia Development. *Blood* **2015**, *125*, 2678–2688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Becchetti, A. Ion Channels and Transporters in Cancer. 1. Ion Channels and Cell Proliferation in Cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *301*, C255–C265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Déliot, N.; Constantin, B. Plasma Membrane Calcium Channels in Cancer: Alterations and Consequences for Cell Proliferation and Migration. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 2512–2522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chafouleas, J.G.; Lagacé, L.; Bolton, W.E.; Boyd, A.E., 3rd; Means, A.R. Changes in Calmodulin and Its MRNA Accompany Reentry of Quiescent (G0) Cells into the Cell Cycle. *Cell* **1984**, *36*, 73–81. [[CrossRef](#)]
15. Rasmussen, C.D.; Means, A.R. Calmodulin, Cell Growth and Gene Expression. *Trends Neurosci.* **1989**, *12*, 433–438. [[CrossRef](#)]
16. Takuwa, N.; Zhou, W.; Kumada, M.; Takuwa, Y. Ca(2+)-Dependent Stimulation of Retinoblastoma Gene Product Phosphorylation and P34cdc2 Kinase Activation in Serum-Stimulated Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 138–145. [[CrossRef](#)]
17. Yen, A.; Freeman, L.; Powers, V.; Van Sant, R.; Fishbaugh, J. Cell Cycle Dependence of Calmodulin Levels during HL-60 Proliferation and Myeloid Differentiation. No Changes during Pre-Commitment. *Exp. Cell Res.* **1986**, *165*, 139–151. [[CrossRef](#)]
18. Kahl, C.R.; Means, A.R. Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin-Dependent Pathways. *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 719–736. [[CrossRef](#)]

19. Monaco, S.; Rusciano, M.R.; Maione, A.S.; Soprano, M.; Gomathinayagam, R.; Todd, L.R.; Campiglia, P.; Salzano, S.; Pastore, L.; Leggiero, E.; et al. A Novel Crosstalk between Calcium/Calmodulin Kinases II and IV Regulates Cell Proliferation in Myeloid Leukemia Cells. *Cell Signal.* **2015**, *27*, 204–214. [[CrossRef](#)]
20. Kang, X.; Cui, C.; Wang, C.; Wu, G.; Chen, H.; Lu, Z.; Chen, X.; Wang, L.; Huang, J.; Geng, H.; et al. CAMKs Support Development of Acute Myeloid Leukemia. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 30. [[CrossRef](#)]
21. Tomono, M.; Toyoshima, K.; Ito, M.; Amano, H.; Kiss, Z. Inhibitors of Calcineurin Block Expression of Cyclins A and E Induced by Fibroblast Growth Factor in Swiss 3T3 Fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *353*, 374–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Buchholz, M.; Schatz, A.; Wagner, M.; Michl, P.; Linhart, T.; Adler, G.; Gress, T.M.; Ellenrieder, V. Overexpression of C-Myc in Pancreatic Cancer Caused by Ectopic Activation of NFATc1 and the Ca²⁺/Calcineurin Signaling Pathway. *EMBO J.* **2006**, *25*, 3714–3724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Prevarskaya, N.; Skryma, R.; Shuba, Y. Ion Channels and the Hallmarks of Cancer. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 107–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Padma, S.; Subramanyam, C. Clinical Significance of Serum Calcineurin in Acute Leukemia. *Clin. Chim. Acta* **2002**, *321*, 17–21. [[CrossRef](#)]
25. Chen, S.-J.; Bao, L.; Keefer, K.; Shanmughapriya, S.; Chen, L.; Lee, J.; Wang, J.; Zhang, X.-Q.; Hirschler-Laszkiwicz, I.; Merali, S.; et al. Transient Receptor Potential Ion Channel TRPM2 Promotes AML Proliferation and Survival through Modulation of Mitochondrial Function, ROS, and Autophagy. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Song, S.; Babicheva, A.; Zhao, T.; Ayon, R.J.; Rodriguez, M.; Rahimi, S.; Balistrieri, F.; Harrington, A.; Shyy, J.Y.-J.; Thistlethwaite, P.A.; et al. Notch Enhances Ca(2+) Entry by Activating Calcium-Sensing Receptors and Inhibiting Voltage-Gated K(+) Channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2020**, *318*, C954–C968. [[CrossRef](#)]
27. Shi, J.; Fu, L.; Wang, W. High Expression of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor, Type 2 (ITPR2) as a Novel Biomarker for Worse Prognosis in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *Oncotarget* **2015**, *6*, 5299–5309. [[CrossRef](#)]
28. Yamamura, H.; Yamamura, A.; Ko, E.A.; Pohl, N.M.; Smith, K.A.; Zeifman, A.; Powell, F.L.; Thistlethwaite, P.A.; Yuan, J.X.-J. Activation of Notch Signaling by Short-Term Treatment with Jagged-1 Enhances Store-Operated Ca(2+) Entry in Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2014**, *306*, C871–C878. [[CrossRef](#)]
29. Tohda, S.; Sakano, S.; Ohsawa, M.; Murakami, N.; Nara, N. A Novel Cell Line Derived from de Novo Acute Myeloblastic Leukaemia with Trilineage Myelodysplasia Which Proliferates in Response to a Notch Ligand, Delta-1 Protein. *Br. J. Haematol.* **2002**, *117*, 373–378. [[CrossRef](#)]
30. Li, G.-H.; Fan, Y.-Z.; Liu, X.-W.; Zhang, B.-F.; Yin, D.-D.; He, F.; Huang, S.-Y.; Kang, Z.-J.; Xu, H.; Liu, Q.; et al. Notch Signaling Maintains Proliferation and Survival of the HL60 Human Promyelocytic Leukemia Cell Line and Promotes the Phosphorylation of the Rb Protein. *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *340*, 7–14. [[CrossRef](#)]
31. Kannan, S.; Sutphin, R.M.; Hall, M.G.; Golfman, L.S.; Fang, W.; Nolo, R.M.; Akers, L.J.; Hammitt, R.A.; McMurray, J.S.; Kornblau, S.M.; et al. Notch Activation Inhibits AML Growth and Survival: A Potential Therapeutic Approach. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 321–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lobry, C.; Ntziachristos, P.; Ndiaye-Lobry, D.; Oh, P.; Cimmino, L.; Zhu, N.; Araldi, E.; Hu, W.; Freund, J.; Abdel-Wahab, O.; et al. Notch Pathway Activation Targets AML-Initiating Cell Homeostasis and Differentiation. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 301–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tohda, S.; Kogoshi, H.; Murakami, N.; Sakano, S.; Nara, N. Diverse Effects of the Notch Ligands Jagged1 and Delta1 on the Growth and Differentiation of Primary Acute Myeloblastic Leukemia Cells. *Exp. Hematol.* **2005**, *33*, 558–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Launay, S.; Gianni, M.; Kovács, T.; Bredoux, R.; Bruel, A.; Gélébart, P.; Zasadowski, F.; Chomienne, C.; Enouf, J.; Papp, B. Lineage-Specific Modulation of Calcium Pump Expression during Myeloid Differentiation. *Blood* **1999**, *93*, 4395–4405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Laouedj, M.; Tardif, M.R.; Gil, L.; Raquil, M.-A.; Lachhab, A.; Pelletier, M.; Tessier, P.A.; Barabé, F. S100A9 Induces Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells through TLR4. *Blood* **2017**, *129*, 1980–1990. [[CrossRef](#)]
36. Chapekar, M.S.; Hartman, K.D.; Knode, M.C.; Glazer, R.I. Synergistic Effect of Retinoic Acid and Calcium Ionophore A23187 on Differentiation, c-Myc Expression, and Membrane Tyrosine Kinase Activity in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL-60. *Mol. Pharmacol.* **1987**, *31*, 140–145. [[PubMed](#)]
37. Li, H.; Xu, J.; Zhou, Y.; Liu, X.; Shen, L.E.; Zhu, Y.U.; Li, Z.; Wang, X.; Guo, Q.; Hui, H. PLSCR1/IP3R1/Ca(2+) Axis Contributes to Differentiation of Primary AML Cells Induced by Wogonoside. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2768. [[CrossRef](#)]
38. O'Reilly, D.; Buchanan, P. Calcium Channels and Cancer Stem Cells. *Cell Calcium* **2019**, *81*, 21–28. [[CrossRef](#)]
39. Snoeck, H.-W. Calcium Regulation of Stem Cells. *EMBO Rep.* **2020**, *21*, e50028. [[CrossRef](#)]
40. Horsley, V.; Aliprantis, A.O.; Polak, L.; Glimcher, L.H.; Fuchs, E. NFATc1 Balances Quiescence and Proliferation of Skin Stem Cells. *Cell* **2008**, *132*. [[CrossRef](#)]
41. Aulestia, F.J.; Néant, I.; Dong, J.; Haiech, J.; Kilhoffer, M.-C.; Moreau, M.; Leclerc, C. Quiescence Status of Glioblastoma Stem-like Cells Involves Remodelling of Ca(2+) Signalling and Mitochondrial Shape. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bonora, M.; Kahsay, A.; Pinton, P. Mitochondrial Calcium Homeostasis in Hematopoietic Stem Cell: Molecular Regulation of Quiescence, Function, and Differentiation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2021**, *362*, 111–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Umemoto, T.; Hashimoto, M.; Matsumura, T.; Nakamura-Ishizu, A.; Suda, T. Ca(2+)-Mitochondria Axis Drives Cell Division in Hematopoietic Stem Cells. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 2097–2113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Zhang, X.; Su, J.; Jeong, M.; Ko, M.; Huang, Y.; Park, H.J.; Guzman, A.; Lei, Y.; Huang, Y.-H.; Rao, A.; et al. DNMT3A and TET2 Compete and Cooperate to Repress Lineage-Specific Transcription Factors in Hematopoietic Stem Cells. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 1014–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ng, S.W.K.; Mitchell, A.; Kennedy, J.A.; Chen, W.C.; McLeod, J.; Ibrahimova, N.; Arruda, A.; Popescu, A.; Gupta, V.; Schimmer, A.D.; et al. A 17-Gene Stemness Score for Rapid Determination of Risk in Acute Leukaemia. *Nature* **2016**, *540*, 433–437. [[CrossRef](#)]
46. Bachas, C.; Schuurhuis, G.J.; Assaraf, Y.G.; Kwidama, Z.J.; Kelder, A.; Wouters, F.; Snel, A.N.; Kaspers, G.J.L.; Cloos, J. The Role of Minor Subpopulations within the Leukemic Blast Compartment of AML Patients at Initial Diagnosis in the Development of Relapse. *Leukemia* **2012**, *26*, 1313–1320. [[CrossRef](#)]
47. Li, S.; Garrett-Bakelman, F.E.; Chung, S.S.; Sanders, M.A.; Hricik, T.; Rapaport, F.; Patel, J.; Dillon, R.; Vijay, P.; Brown, A.L.; et al. Distinct Evolution and Dynamics of Epigenetic and Genetic Heterogeneity in Acute Myeloid Leukemia. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 792–799. [[CrossRef](#)]
48. Fric, J.; Lim, C.X.; Mertes, A.; Lee, B.T.; Vigano, E.; Chen, J.; Zolezzi, F.; Poidinger, M.; Larbi, A.; Strobl, H.; et al. Calcium and Calcineurin-Nfat Signaling Regulate Granulocyte-Monocyte Progenitor Cell Cycle Via Flt3-L. *Stem Cells* **2014**. [[CrossRef](#)]
49. Metzelder, S.K.; Michel, C.; von Bonin, M.; Rehberger, M.; Hessmann, E.; Inselmann, S.; Solovey, M.; Wang, Y.; Sohlbach, K.; Brendel, C.; et al. NFATc1 as a Therapeutic Target in FLT3-ITD-Positive AML. *Leukemia* **2015**, *29*, 1470–1477. [[CrossRef](#)]
50. Farge, T.; Saland, E.; de Toni, F.; Aroua, N.; Hosseini, M.; Perry, R.; Bosc, C.; Sugita, M.; Stuani, L.; Fraisse, M.; et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 716–735. [[CrossRef](#)]
51. Samudio, I.; Harmancey, R.; Fiegl, M.; Kantarjian, H.; Konopleva, M.; Korchin, B.; Kaluarachchi, K.; Bornmann, W.; Duvvuri, S.; Taegtmeier, H.; et al. Pharmacologic Inhibition of Fatty Acid Oxidation Sensitizes Human Leukemia Cells to Apoptosis Induction. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 142–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gherardi, G.; Monticelli, H.; Rizzuto, R.; Mammucari, C. The Mitochondrial Ca(2+) Uptake and the Fine-Tuning of Aerobic Metabolism. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 554904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Baldrige, M.T.; King, K.Y.; Boles, N.C.; Weksberg, D.C.; Goodell, M.A. Quiescent Haematopoietic Stem Cells Are Activated by IFN-Gamma in Response to Chronic Infection. *Nature* **2010**, *465*, 793–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lombardi, A.A.; Gibb, A.A.; Arif, E.; Kolmetzky, D.W.; Tomar, D.; Luongo, T.S.; Jadia, P.; Murray, E.K.; Lorkiewicz, P.K.; Hajnóczky, G.; et al. Mitochondrial Calcium Exchange Links Metabolism with the Epigenome to Control Cellular Differentiation. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4509. [[CrossRef](#)]
55. Chen, J.; Kao, Y.-R.; Sun, D.; Todorova, T.I.; Reynolds, D.; Narayanagari, S.-R.; Montagna, C.; Will, B.; Verma, A.; Steidl, U. Myelodysplastic Syndrome Progression to Acute Myeloid Leukemia at the Stem Cell Level. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 103–110. [[CrossRef](#)]
56. Corces-Zimmerman, M.R.; Hong, W.-J.; Weissman, I.L.; Medeiros, B.C.; Majeti, R. Preleukemic Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Affect Epigenetic Regulators and Persist in Remission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 2548–2553. [[CrossRef](#)]
57. Koefler, H.P.; Leong, G. Preleukemia: One Name, Many Meanings. *Leukemia* **2017**, *31*, 534–542. [[CrossRef](#)]
58. Saeed, B.R.; Manta, L.; Raffel, S.; Pyl, P.T.; Buss, E.C.; Wang, W.; Eckstein, V.; Jauch, A.; Trumpp, A.; Huber, W.; et al. Analysis of Nonleukemic Cellular Subcompartments Reconstructs Clonal Evolution of Acute Myeloid Leukemia and Identifies Therapy-Resistant Preleukemic Clones. *Int. J. Cancer* **2021**, *148*, 2825–2838. [[CrossRef](#)]
59. Shlush, L.I.; Zandi, S.; Mitchell, A.; Chen, W.C.; Brandwein, J.M.; Gupta, V.; Kennedy, J.A.; Schimmer, A.D.; Schuh, A.C.; Yee, K.W.; et al. Identification of Pre-Leukaemic Haematopoietic Stem Cells in Acute Leukaemia. *Nature* **2014**, *506*, 328–333. [[CrossRef](#)]
60. Bencomo-Alvarez, A.E.; Rubio, A.J.; Gonzalez, M.A.; Eiring, A.M. Energy Metabolism and Drug Response in Myeloid Leukaemic Stem Cells. *Br. J. Haematol.* **2019**, *186*, 524–537. [[CrossRef](#)]
61. Gilliland, D.G.; Jordan, C.T.; Felix, C.A. The Molecular Basis of Leukemia. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* **2004**, 80–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Jones, C.L.; Stevens, B.M.; D’Alessandro, A.; Reisz, J.A.; Culp-Hill, R.; Nemkov, T.; Pei, S.; Khan, N.; Adane, B.; Ye, H.; et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell* **2018**, *34*, 724–740.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Chapuis, N.; Poulain, L.; Birsén, R.; Tamburini, J.; Bouscary, D. Rationale for Targeting Deregulated Metabolic Pathways as a Therapeutic Strategy in Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Maher, M.; Diesch, J.; Casquero, R.; Buschbeck, M. Epigenetic-Transcriptional Regulation of Fatty Acid Metabolism and Its Alterations in Leukaemia. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 405. [[CrossRef](#)]
65. Tabe, Y.; Konopleva, M.; Andreeff, M. Fatty Acid Metabolism, Bone Marrow Adipocytes, and AML. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 155. [[CrossRef](#)]
66. Tchong, M.; Roma, A.; Ahmed, N.; Smith, R.W.; Jayanth, P.; Minden, M.D.; Schimmer, A.D.; Hess, D.A.; Hope, K.; Rea, K.A.; et al. Very Long Chain Fatty Acid Metabolism Is Required in Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2021**, *137*, 3518–3532. [[CrossRef](#)]

67. Stevens, B.M.; Jones, C.L.; Pollyea, D.A.; Culp-Hill, R.; D'Alessandro, A.; Winters, A.; Krug, A.; Abbott, D.; Goosman, M.; Pei, S.; et al. Fatty Acid Metabolism Underlies Venetoclax Resistance in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Nat. Cancer* **2020**, *1*, 1176–1187. [[CrossRef](#)]
68. Zhong, W.; Xu, M.; Li, C.; Zhu, B.; Cao, X.; Li, D.; Chen, H.; Hu, C.; Li, R.; Luo, C.; et al. ORP4L Extracts and Presents PIP(2) from Plasma Membrane for PLC β 3 Catalysis: Targeting It Eradicates Leukemia Stem Cells. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 2166–2177. [[CrossRef](#)]
69. Csanády, L.; Töröcsik, B. Four Ca²⁺ Ions Activate TRPM2 Channels by Binding in Deep Crevices near the Pore but Intracellularly of the Gate. *J. Gen. Physiol.* **2009**, *133*, 189–203. [[CrossRef](#)]
70. Gutierrez, S.; Alvarado-Vázquez, P.A.; Eisenach, J.C.; Romero-Sandoval, E.A.; Boada, M.D. Tachykinins Modulate Nociceptive Responsiveness and Sensitization: In Vivo Electrical Characterization of Primary Sensory Neurons in Tachykinin Knockout (Tac1 KO) Mice. *Mol. Pain* **2019**, *15*, 1744806919845750. [[CrossRef](#)]
71. Steinhoff, M.S.; von Mentzer, B.; Geppetti, P.; Pothoulakis, C.; Bunnett, N.W. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 265–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ge, C.; Huang, H.; Huang, F.; Yang, T.; Zhang, T.; Wu, H.; Zhou, H.; Chen, Q.; Shi, Y.; Sun, Y.; et al. Neurokinin-1 Receptor Is an Effective Target for Treating Leukemia by Inducing Oxidative Stress through Mitochondrial Calcium Overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 19635–19645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Glass, C.; Wuertzer, C.; Cui, X.; Bi, Y.; Davuluri, R.; Xiao, Y.-Y.; Wilson, M.; Owens, K.; Zhang, Y.; Perkins, A. Global Identification of EVI1 Target Genes in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Feng, W.; Yang, X.; Wang, L.; Wang, R.; Yang, F.; Wang, H.; Liu, X.; Ren, Q.; Zhang, Y.; Zhu, X.; et al. P2X7 Promotes the Progression of MLL-AF9 Induced Acute Myeloid Leukemia by Upregulation of Pbx3. *Haematologica* **2021**, *106*, 1278–1289. [[CrossRef](#)]
75. Marchi, S.; Marinello, M.; Bononi, A.; Bonora, M.; Giorgi, C.; Rimessi, A.; Pinton, P. Selective Modulation of Subtype III IP₃R by Akt Regulates ER Ca²⁺ Release and Apoptosis. *Cell Death Dis.* **2012**, *3*, e304. [[CrossRef](#)]
76. Barazzuol, L.; Giamogante, F.; Calì, T. Mitochondria Associated Membranes (MAMs): Architecture and Physiopathological Role. *Cell Calcium* **2021**, *94*, 102343. [[CrossRef](#)]
77. Kuchay, S.; Giorgi, C.; Simoneschi, D.; Pagan, J.; Missiroli, S.; Saraf, A.; Florens, L.; Washburn, M.P.; Collazo-Lorduy, A.; Castillo-Martin, M.; et al. PTEN Counteracts FBXL2 to Promote IP3R3- and Ca(2+)-Mediated Apoptosis Limiting Tumour Growth. *Nature* **2017**, *546*, 554–558. [[CrossRef](#)]
78. Høyer-Hansen, M.; Bastholm, L.; Szyniarowski, P.; Campanella, M.; Szabadkai, G.; Farkas, T.; Bianchi, K.; Fehrenbacher, N.; Elling, F.; Rizzuto, R.; et al. Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase-Beta, and Bcl-2. *Mol. Cell* **2007**, *25*, 193–205. [[CrossRef](#)]
79. Xu, X.; Zhao, J.; Xu, Z.; Peng, B.; Huang, Q.; Arnold, E.; Ding, J. Structures of Human Cytosolic NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Reveal a Novel Self-Regulatory Mechanism of Activity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33946–33957. [[CrossRef](#)]
80. Waitkus, M.S.; Diplas, B.H.; Yan, H. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Gliomas. *Neuro. Oncol.* **2016**, *18*, 16–26. [[CrossRef](#)]
81. Sjöblom, T.; Jones, S.; Wood, L.D.; Parsons, D.W.; Lin, J.; Barber, T.D.; Mandelker, D.; Leary, R.J.; Ptak, J.; Silliman, N.; et al. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science* **2006**, *314*, 268–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Yan, H.; Parsons, D.W.; Jin, G.; McLendon, R.; Rasheed, B.A.; Yuan, W.; Kos, I.; Batinic-Haberle, I.; Jones, S.; Riggins, G.J.; et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 765–773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Yen, K.E.; Bittinger, M.A.; Su, S.M.; Fantin, V.R. Cancer-Associated IDH Mutations: Biomarker and Therapeutic Opportunities. *Oncogene* **2010**, *29*, 6409–6417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Gross, S.; Cairns, R.A.; Minden, M.D.; Driggers, E.M.; Bittinger, M.A.; Jang, H.G.; Sasaki, M.; Jin, S.; Schenkein, D.P.; Su, S.M.; et al. Cancer-Associated Metabolite 2-Hydroxyglutarate Accumulates in Acute Myelogenous Leukemia with Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 339–344. [[CrossRef](#)]
85. Marcucci, G.; Maharry, K.; Wu, Y.-Z.; Radmacher, M.D.; Mrózek, K.; Margeson, D.; Holland, K.B.; Whitman, S.P.; Becker, H.; Schwind, S.; et al. IDH1 and IDH2 Gene Mutations Identify Novel Molecular Subsets within de Novo Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2348–2355. [[CrossRef](#)]
86. Mardis, E.R.; Ding, L.; Dooling, D.J.; Larson, D.E.; McLellan, M.D.; Chen, K.; Koboldt, D.C.; Fulton, R.S.; Delehaunty, K.D.; McGrath, S.D.; et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1058–1066. [[CrossRef](#)]
87. Ward, P.S.; Cross, J.R.; Lu, C.; Weigert, O.; Abel-Wahab, O.; Levine, R.L.; Weinstock, D.M.; Sharp, K.A.; Thompson, C.B. Identification of Additional IDH Mutations Associated with Oncometabolite R(-)-2-Hydroxyglutarate Production. *Oncogene* **2012**, *31*, 2491–2498. [[CrossRef](#)]
88. McKenney, A.S.; Levine, R.L. Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Leukemia. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 3672–3677. [[CrossRef](#)]
89. Dang, L.; White, D.W.; Gross, S.; Bennett, B.D.; Bittinger, M.A.; Driggers, E.M.; Fantin, V.R.; Jang, H.G.; Jin, S.; Keenan, M.C.; et al. Cancer-Associated IDH1 Mutations Produce 2-Hydroxyglutarate. *Nature* **2009**, *462*, 739–744. [[CrossRef](#)]
90. Chen, J.; Yang, J.; Sun, X.; Wang, Z.; Cheng, X.; Lu, W.; Cai, X.; Hu, C.; Shen, X.; Cao, P. Allosteric Inhibitor Remotely Modulates the Conformation of the Orthosteric Pockets in Mutant IDH2/R140Q. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16458. [[CrossRef](#)]
91. Stein, E.M.; DiNardo, C.D.; Fathi, A.T.; Mims, A.S.; Pratz, K.W.; Savona, M.R.; Stein, A.S.; Stone, R.M.; Winer, E.S.; Seet, C.S.; et al. Ivosidenib or Enasidenib Combined with Intensive Chemotherapy in Patients with Newly Diagnosed AML: A Phase 1 Study. *Blood* **2021**, *137*, 1792–1803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

92. Prensner, J.R.; Chinnaiyan, A.M. Metabolism Unhinged: IDH Mutations in Cancer. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 291–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Shafat, M.S.; Gnanaswaran, B.; Bowles, K.M.; Rushworth, S.A. The Bone Marrow Microenvironment – Home of the Leukemic Blasts. *Blood Rev.* **2017**, *31*, 277–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Reinisch, A.; Chan, S.M.; Thomas, D.; Majeti, R. Biology and Clinical Relevance of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Semin. Hematol.* **2015**, *52*, 150–164. [[CrossRef](#)]
95. Adams, G.B.; Chabner, K.T.; Alley, I.R.; Olson, D.P.; Szczepiorkowski, Z.M.; Poznansky, M.C.; Kos, C.H.; Pollak, M.R.; Brown, E.M.; Scadden, D.T. Stem Cell Engraftment at the Endosteal Niche Is Specified by the Calcium-Sensing Receptor. *Nature* **2006**, *439*, 599–603. [[CrossRef](#)]
96. Mansour, A.; Abou-Ezzi, G.; Sitnicka, E.; Jacobsen, S.E.W.; Wakkach, A.; Blin-Wakkach, C. Osteoclasts Promote the Formation of Hematopoietic Stem Cell Niches in the Bone Marrow. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 537–549. [[CrossRef](#)]
97. Sugiyama, T.; Kohara, H.; Noda, M.; Nagasawa, T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* **2006**, *25*, 977–988. [[CrossRef](#)]
98. Lévesque, J.-P.; Helwani, F.M.; Winkler, I.G. The Endosteal ‘Osteoblastic’ Niche and Its Role in Hematopoietic Stem Cell Homing and Mobilization. *Leukemia* **2010**, *24*, 1979–1992. [[CrossRef](#)]
99. Le, P.M.; Andreeff, M.; Battula, V.L. Osteogenic Niche in the Regulation of Normal Hematopoiesis and Leukemogenesis. *Haematologica* **2018**, *103*, 1945–1955. [[CrossRef](#)]
100. Nervi, B.; Ramirez, P.; Rettig, M.P.; Uy, G.L.; Holt, M.S.; Ritchey, J.K.; Prior, J.L.; Piwnica-Worms, D.; Bridger, G.; Ley, T.J.; et al. Chemosensitization of Acute Myeloid Leukemia (AML) Following Mobilization by the CXCR4 Antagonist AMD3100. *Blood* **2009**, *113*, 10. [[CrossRef](#)]
101. Spoo, A.C.; Lübbert, M.; Wierda, W.G.; Burger, J.A. CXCR4 Is a Prognostic Marker in Acute Myelogenous Leukemia. *Blood* **2007**, *109*, 786–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Zeng, Z.; Xi Shi, Y.; Samudio, I.J.; Wang, R.-Y.; Ling, X.; Frolova, O.; Levis, M.; Rubin, J.B.; Negrin, R.R.; Estey, E.H.; et al. Targeting the Leukemia Microenvironment by CXCR4 Inhibition Overcomes Resistance to Kinase Inhibitors and Chemotherapy in AML. *Blood* **2009**, *113*, 6215–6224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Uy, G.L.; Rettig, M.P.; Motabi, I.H.; McFarland, K.; Trinkaus, K.M.; Hladnik, L.M.; Kulkarni, S.; Abboud, C.N.; Cashen, A.F.; Stockerl-Goldstein, K.E.; et al. A Phase 1/2 Study of Chemosensitization with the CXCR4 Antagonist Plerixafor in Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2012**, *119*, 3917–3924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Brown, E.M.; MacLeod, R.J. Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 239–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Lam, B.S.; Cunningham, C.; Adams, G.B. Pharmacologic Modulation of the Calcium-Sensing Receptor Enhances Hematopoietic Stem Cell Lodgment in the Adult Bone Marrow. *Blood* **2011**, *117*, 1167–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Brown, E.M. Extracellular Ca²⁺ Sensing, Regulation of Parathyroid Cell Function, and Role of Ca²⁺ and Other Ions as Extracellular (First) Messengers. *Physiol. Rev.* **1991**, *71*, 371–411. [[CrossRef](#)]
107. Linde, N.; Fluegen, G.; Aguirre-Ghiso, J.A. The Relationship Between Dormant Cancer Cells and Their Microenvironment. *Adv. Cancer Res.* **2016**, *132*, 45–71. [[CrossRef](#)]
108. Purton, L.E.; Dworkin, S.; Olsen, G.H.; Walkley, C.R.; Fabb, S.A.; Collins, S.J.; Chambon, P. RAR γ Is Critical for Maintaining a Balance between Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 1283–1293. [[CrossRef](#)]
109. Ghiaur, G.; Yegnasubramanian, S.; Perkins, B.; Gucwa, J.L.; Gerber, J.M.; Jones, R.J. Regulation of Human Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal by the Microenvironment’s Control of Retinoic Acid Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 16121–16126. [[CrossRef](#)]
110. Nghiem, P.; Ollick, T.; Gardner, P.; Schulman, H. Interleukin-2 Transcriptional Block by Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin Kinase. *Nature* **1994**, *371*, 347–350. [[CrossRef](#)]
111. Anderson, K.A.; Means, A.R. Defective Signaling in a Subpopulation of CD4⁺ T Cells in the Absence of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Si, J.; Mueller, L.; Collins, S.J. CaMKII Regulates Retinoic Acid Receptor Transcriptional Activity and the Differentiation of Myeloid Leukemia Cells. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1412–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Gao, Y.; Camacho, L.H.; Mehta, K. Retinoic Acid-Induced CD38 Antigen Promotes Leukemia Cells Attachment and Interferon- γ /Interleukin-1 β -Dependent Apoptosis of Endothelial Cells: Implications in the Etiology of Retinoic Acid Syndrome. *Leuk. Res.* **2007**, *31*, 455–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Bertagnolo, V.; Neri, L.M.; Marchisio, M.; Mischiati, C.; Capitani, S. Phosphoinositide 3-Kinase Activity Is Essential for All-Trans-Retinoic Acid-Induced Granulocytic Differentiation of HL-60 Cells. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 542–546.
115. Wu, X.; Shao, G.; Chen, S.; Wang, X.; Wang, Z.-Y. Studies on the Relationship between Protein Kinase C and Differentiation of Human Promyelocytic Leukemia Cells Induced by Retinoic Acid. *Leuk. Res.* **1989**, *13*, 869–874. [[CrossRef](#)]
116. Yen, A.; Roberson, M.S.; Varvayanis, S.; Lee, A.T. Retinoic Acid Induced Mitogen-Activated Protein (MAP)/Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Kinase-Dependent MAP Kinase Activation Needed to Elicit HL-60 Cell Differentiation and Growth Arrest. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3163–3172.
117. Su, M.; Alonso, S.; Jones, J.W.; Yu, J.; Kane, M.A.; Jones, R.J.; Ghiaur, G. All-Trans Retinoic Acid Activity in Acute Myeloid Leukemia: Role of Cytochrome P450 Enzyme Expression by the Microenvironment. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127790. [[CrossRef](#)]

118. Bragado, P.; Estrada, Y.; Parikh, F.; Krause, S.; Capobianco, C.; Farina, H.G.; Schewe, D.M.; Aguirre-Ghiso, J.A. TGF- β 2 Dictates Disseminated Tumour Cell Fate in Target Organs through TGF- β -RIII and P38 α / β Signalling. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 1351–1361. [[CrossRef](#)]
119. Bruserud, Ø.; Tsykunova, G.; Hernandez-Valladares, M.; Reikvam, H.; Tvedt, T.H.A. Therapeutic Use of Valproic Acid and All-Trans Retinoic Acid in Acute Myeloid Leukemia—Literature Review and Discussion of Possible Use in Relapse after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 423. [[CrossRef](#)]
120. Kim, Y.; Jeung, H.-K.; Cheong, J.-W.; Song, J.; Bae, S.H.; Lee, J.I.; Min, Y.H. All-Trans Retinoic Acid Synergizes with Enasidenib to Induce Differentiation of IDH2-Mutant Acute Myeloid Leukemia Cells. *Yonsei Med. J.* **2020**, *61*, 762. [[CrossRef](#)]
121. Ghiaur, G.; Wroblewski, M.; Loges, S. Acute Myelogenous Leukemia and Its Microenvironment: A Molecular Conversation. *Semin. Hematol.* **2015**, *52*, 200–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Ciciarello, M.; Corradi, G.; Loscocco, F.; Visani, G.; Monaco, F.; Cavo, M.; Curti, A.; Isidori, A. The Yin and Yang of the Bone Marrow Microenvironment: Pros and Cons of Mesenchymal Stromal Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Benito, J.; Ramirez, M.S.; Millward, N.Z.; Velez, J.; Harutyunyan, K.G.; Lu, H.; Shi, Y.-X.; Matre, P.; Jacamo, R.; Ma, H.; et al. Hypoxia-Activated Prodrug TH-302 Targets Hypoxic Bone Marrow Niches in Preclinical Leukemia Models. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1687–1698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Van Oosterwijk, J.G.; Buelow, D.R.; Drenberg, C.D.; Vasilyeva, A.; Li, L.; Shi, L.; Wang, Y.-D.; Finkelstein, D.; Shurtleff, S.A.; Janke, L.J.; et al. Hypoxia-Induced Upregulation of BMX Kinase Mediates Therapeutic Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 369–380. [[CrossRef](#)]
125. Jensen, P.O.; Mortensen, B.T.; Hodgkiss, R.J.; Iversen, P.O.; Christensen, I.J.; Helledie, N.; Larsen, J.K. Increased Cellular Hypoxia and Reduced Proliferation of Both Normal and Leukaemic Cells during Progression of Acute Myeloid Leukaemia in Rats. *Cell Prolif.* **2000**, *33*, 381–395. [[CrossRef](#)]
126. Portwood, S.; Lal, D.; Hsu, Y.-C.; Vargas, R.; Johnson, M.K.; Wetzler, M.; Hart, C.P.; Wang, E.S. Activity of the Hypoxia-Activated Prodrug, TH-302, in Preclinical Human Acute Myeloid Leukemia Models. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6506–6519. [[CrossRef](#)]
127. Prakriya, M.; Feske, S.; Gwack, Y.; Srikanth, S.; Rao, A.; Hogan, P.G. Orai1 Is an Essential Pore Subunit of the CRAC Channel. *Nature* **2006**, *443*, 230–233. [[CrossRef](#)]
128. Yeromin, A.V.; Zhang, S.L.; Jiang, W.; Yu, Y.; Safrina, O.; Cahalan, M.D. Molecular Identification of the CRAC Channel by Altered Ion Selectivity in a Mutant of Orai. *Nature* **2006**, *443*, 226–229. [[CrossRef](#)]
129. Sipkins, D.A.; Wei, X.; Wu, J.W.; Runnels, J.M.; Côté, D.; Means, T.K.; Luster, A.D.; Scadden, D.T.; Lin, C.P. In Vivo Imaging of Specialized Bone Marrow Endothelial Microdomains for Tumour Engraftment. *Nature* **2005**, *435*, 969–973. [[CrossRef](#)]
130. Eyles, J.; Puaux, A.-L.; Wang, X.; Toh, B.; Prakash, C.; Hong, M.; Tan, T.G.; Zheng, L.; Ong, L.C.; Jin, Y.; et al. Tumor Cells Disseminate Early, but Immunosurveillance Limits Metastatic Outgrowth, in a Mouse Model of Melanoma. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 2030–2039. [[CrossRef](#)]
131. Feske, S. Calcium Signalling in Lymphocyte Activation and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 690–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Wolf, I.M.A.; Guse, A.H. Ca²⁺ Microdomains in T-Lymphocytes. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Man, K.; Gabriel, S.S.; Liao, Y.; Gloury, R.; Preston, S.; Henstridge, D.C.; Pellegrini, M.; Zehn, D.; Berberich-Siebelt, F.; Febbraio, M.A.; et al. Transcription Factor IRF4 Promotes CD8+ T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **2017**, *47*, 1129–1141.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Martinez, G.J.; Pereira, R.M.; Åijö, T.; Kim, E.Y.; Marangoni, F.; Pipkin, M.E.; Togher, S.; Heissmeyer, V.; Zhang, Y.C.; Crotty, S.; et al. The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8 + T Cells. *Immunity* **2015**, *42*, 265–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Oestreich, K.J.; Yoon, H.; Ahmed, R.; Boss, J.M. NFATc1 Regulates PD-1 Expression upon T Cell Activation. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 4832–4839. [[CrossRef](#)]
136. Ritprajak, P.; Azuma, M. Intrinsic and Extrinsic Control of Expression of the Immunoregulatory Molecule PD-L1 in Epithelial Cells and Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol.* **2015**, *51*, 221–228. [[CrossRef](#)]
137. Saudemont, A.; Quesnel, B. In a Model of Tumor Dormancy, Long-Term Persistent Leukemic Cells Have Increased B7-H1 and B7.1 Expression and Resist CTL-Mediated Lysis. *Blood* **2004**, *104*, 2124–2133. [[CrossRef](#)]
138. Schneider, H.; Smith, X.; Liu, H.; Bismuth, G.; Rudd, C.E. CTLA-4 Disrupts ZAP70 Microcluster Formation with Reduced T Cell/APC Dwell Times and Calcium Mobilization. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 40–47. [[CrossRef](#)]
139. Chen, X.; Cherian, S. Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis. *Clin. Lab. Med.* **2017**, *37*, 753–769. [[CrossRef](#)]
140. Wu, Y.; Chen, M.; Wu, P.; Chen, C.; Xu, Z.P.; Gu, W. Increased PD-L1 Expression in Breast and Colon Cancer Stem Cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2017**, *44*, 602–604. [[CrossRef](#)]
141. Nair, J.S.; DaFonseca, C.J.; Tjernberg, A.; Sun, W.; Darnell, J.E.; Chait, B.T.; Zhang, J.J. Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 Phosphorylation in Response to IFN-. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5971–5976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Berthon, C.; Driss, V.; Liu, J.; Kuranda, K.; Leleu, X.; Jouy, N.; Hetuin, D.; Quesnel, B. In Acute Myeloid Leukemia, B7-H1 (PD-L1) Protection of Blasts from Cytotoxic T Cells Is Induced by TLR Ligands and Interferon-Gamma and Can Be Reversed Using MEK Inhibitors. *Cancer Immunol. Immunother.* **2010**, *59*, 1839–1849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

143. Teixeira, L.K.; Fonseca, B.P.F.; Vieira-de-Abreu, A.; Barboza, B.A.; Robbs, B.K.; Bozza, P.T.; Viola, J.P.B. IFN- Production by CD8+ T Cells Depends on NFAT1 Transcription Factor and Regulates Th Differentiation. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5931–5939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Stahl, M.; Goldberg, A.D. Immune Checkpoint Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Novel Combinations and Therapeutic Targets. *Curr. Oncol. Rep.* **2019**, *21*, 37. [[CrossRef](#)]
145. Sehgal, A.; Whiteside, T.L.; Boyiadzis, M. Programmed Death-1 Checkpoint Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15*, 1191–1203. [[CrossRef](#)]
146. Payne, K.K.; Keim, R.C.; Graham, L.; Idowu, M.O.; Wan, W.; Wang, X.-Y.; Toor, A.A.; Bear, H.D.; Manjili, M.H. Tumor-Reactive Immune Cells Protect against Metastatic Tumor and Induce Immunoediting of Indolent but Not Quiescent Tumor Cells. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *100*, 625–635. [[CrossRef](#)]
147. Zhang, L.; Gajewski, T.F.; Kline, J. PD-1/PD-L1 Interactions Inhibit Antitumor Immune Responses in a Murine Acute Myeloid Leukemia Model. *Blood* **2009**, *114*, 1545–1552. [[CrossRef](#)]
148. Segovia, M.; Russo, S.; Jeldres, M.; Mahmoud, Y.D.; Perez, V.; Duhalde, M.; Charnet, P.; Rousset, M.; Victoria, S.; Veigas, F.; et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammation. *Cancer Cell* **2019**, *35*, 767–781.e6. [[CrossRef](#)]
149. Rashidi, A.; Uy, G.L. Targeting the Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia. *Curr. Hematol. Malign. Rep.* **2015**, *10*, 126–131. [[CrossRef](#)]
150. Behrmann, L.; Wellbrock, J.; Fiedler, W. Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche—Take a Closer Look. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 444. [[CrossRef](#)]
151. Karantanou, C.; Godavarthy, P.S.; Krause, D.S. Targeting the Bone Marrow Microenvironment in Acute Leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2018**, *59*, 2535–2545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Isidori, A.; Salvestrini, V.; Ciciarello, M.; Loscocco, F.; Visani, G.; Parisi, S.; Lecciso, M.; Ocadlikova, D.; Rossi, L.; Gabucci, E.; et al. The Role of the Immunosuppressive Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia Development and Treatment. *Expert Rev. Hematol.* **2014**, *7*, 807–818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Chae, Y.K.; Dimou, A.; Pierce, S.; Kantarjian, H.; Andreeff, M. The Effect of Calcium Channel Blockers on the Outcome of Acute Myeloid Leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2014**, *55*, 2822–2829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Zhang, H.; Yu, P.; Lin, H.; Jin, Z.; Zhao, S.; Zhang, Y.; Xu, Q.; Jin, H.; Liu, Z.; Yang, W.; et al. The Discovery of Novel ACA Derivatives as Specific TRPM2 Inhibitors That Reduce Ischemic Injury Both In Vitro and In Vivo. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 3976–3996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Wang, J.-X.; Zhang, L.; Huang, Z.-W.; Zhang, X.-N.; Jiang, Y.-Y.; Liu, F.-J.; Long, L.; Xue, M.-J.; Lu, G.; Liu, Q.; et al. Aurora Kinase Inhibitor Restrains STAT5-Activated Leukemic Cell Proliferation by Inducing Mitochondrial Impairment. *J. Cell Physiol.* **2020**, *235*, 8358–8370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Löwenberg, B.; Muus, P.; Ossenkoppele, G.; Rousselot, P.; Cahn, J.-Y.; Ifrah, N.; Martinelli, G.; Amadori, S.; Berman, E.; Sonneveld, P.; et al. Phase 1/2 Study to Assess the Safety, Efficacy, and Pharmacokinetics of Barasertib (AZD1152) in Patients with Advanced Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2011**, *118*, 6030–6036. [[CrossRef](#)]
158. Yang, J.; Ikezoe, T.; Nishioka, C.; Tasaka, T.; Taniguchi, A.; Kuwayama, Y.; Komatsu, N.; Bandobashi, K.; Togitani, K.; Koeffler, H.P.; et al. AZD1152, a Novel and Selective Aurora B Kinase Inhibitor, Induces Growth Arrest, Apoptosis, and Sensitization for Tubulin Depolymerizing Agent or Topoisomerase II Inhibitor in Human Acute Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Blood* **2007**, *110*, 2034–2040. [[CrossRef](#)]
159. Birkenkamp, K.U.; Geugien, M.; Lemmink, H.H.; Kruijer, W.; Vellenga, E. Regulation of Constitutive STAT5 Phosphorylation in Acute Myeloid Leukemia Blasts. *Leukemia* **2001**, *15*, 1923–1931. [[CrossRef](#)]
160. Warsch, W.; Kollmann, K.; Eckelhart, E.; Fajmann, S.; Cerny-Reiterer, S.; Hölbl, A.; Gleixner, K.V.; Dworzak, M.; Mayerhofer, M.; Hoermann, G.; et al. High STAT5 Levels Mediate Imatinib Resistance and Indicate Disease Progression in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **2011**, *117*, 3409–3420. [[CrossRef](#)]
161. Hung, L.-Y.; Tseng, J.T.; Lee, Y.-C.; Xia, W.; Wang, Y.-N.; Wu, M.-L.; Chuang, Y.-H.; Lai, C.-H.; Chang, W.-C. Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Interacts with Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) in Activating Aurora-A Gene Expression. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4337–4351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Wang, Z.; Mi, T.; Bradley, H.L.; Metts, J.; Sabnis, H.; Zhu, W.; Arbiser, J.; Bunting, K.D. Pimozide and Imipramine Blue Exploit Mitochondrial Vulnerabilities and Reactive Oxygen Species to Cooperatively Target High Risk Acute Myeloid Leukemia. *Antioxidants* **2021**, *10*, 956. [[CrossRef](#)]
163. Chen, Y.; Hui, H.; Yang, H.; Zhao, K.; Qin, Y.; Gu, C.; Wang, X.; Lu, N.; Guo, Q. Wogonoside Induces Cell Cycle Arrest and Differentiation by Affecting Expression and Subcellular Localization of PLSCR1 in AML Cells. *Blood* **2013**, *121*, 3682–3691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Wang, W.; Xiao, J.; Adachi, M.; Liu, Z.; Zhou, J. 4-Aminopyridine Induces Apoptosis of Human Acute Myeloid Leukemia Cells via Increasing $[Ca^{2+}]_i$ through P2X7 Receptor Pathway. *Cell Physiol. Biochem.* **2011**, *28*, 199–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Angka, L.; Lee, E.A.; Rota, S.G.; Hanlon, T.; Sukhai, M.; Minden, M.; McMillan, E.M.; Quadriatero, J.; Spagnuolo, P.A. Glucopsychosine Increases Cytosolic Calcium to Induce Calpain-Mediated Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells. *Cancer Lett.* **2014**, *348*, 29–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

166. Yanamandra, N.; Buzzeo, R.W.; Gabriel, M.; Hazlehurst, L.A.; Mari, Y.; Beaupre, D.M.; Cuevas, J. Tipifarnib-Induced Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia and Multiple Myeloma Cells Depends on Ca^{2+} Influx through Plasma Membrane Ca^{2+} Channels. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2011**, *337*, 636–643. [[CrossRef](#)]
167. Diez-Bello, R.; Jardin, I.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Orai1 and Orai2 Mediate Store-Operated Calcium Entry That Regulates HL60 Cell Migration and FAK Phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 1064–1070. [[CrossRef](#)]
168. Manteniatis, S.; Wojcik, S.; Göthert, J.R.; Dürig, J.; Dührsen, U.; Gisselmann, G.; Hatt, H. Deorphanization and Characterization of the Ectopically Expressed Olfactory Receptor OR51B5 in Myelogenous Leukemia Cells. *Cell Death Discov.* **2016**, *2*, 16010. [[CrossRef](#)]
169. Yeh, Y.-C.; Parekh, A.B. CRAC Channels and Ca^{2+} -Dependent Gene Expression. In *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*; Kozak, J.A., Putney, J.W.J., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2018; pp. 93–106, ISBN 978-1-315-15259-2.
170. He, X.; Dou, A.; Feng, S.; Roman-Rivera, A.; Hawkins, C.; Lawley, L.; Zhang, J.; Wunderlich, M.; Mizukawa, B.; Halene, S.; et al. Cyclosporine Enhances the Sensitivity to Lenalidomide in MDS/AML In Vitro. *Exp. Hematol.* **2020**, *86*, 21–27.e2. [[CrossRef](#)]
171. Borella, G.; Da Ros, A.; Borile, G.; Porcù, E.; Tregnago, C.; Benetton, M.; Marchetti, A.; Bisio, V.; Montini, B.; Michielotto, B.; et al. Targeting the Plasticity of Mesenchymal Stromal Cells to Reroute the Course of Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2021**, *138*, 557–570. [[CrossRef](#)]

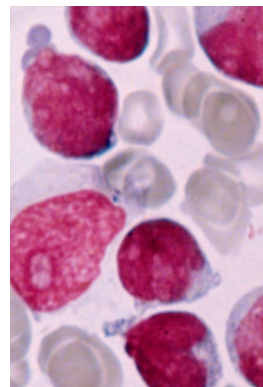
► La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une hémopathie maligne caractérisée par des aberrations génétiques de certains précurseurs hématopoïétiques de la lignée myéloïde qui entraînent un défaut de maturation et/ou de fonctionnement. Malgré une chimiothérapie intensive entraînant une rémission complète chez 50 à 80 % des patients, la rechute survient dans la majorité des cas. Bien que la signalisation calcique soit bien décrite dans les cancers solides, l'étude de cibles pertinentes dépendant du calcium a retenu peu d'attention dans la LAM jusqu'à aujourd'hui. L'objectif de cette revue est d'offrir une piste de réflexion sur l'identification de canaux calciques spécifiques et de voies de signalisation associées impliquées dans la LAM, et ainsi de promouvoir la recherche de nouvelles approches thérapeutiques efficaces ciblant spécifiquement ces voies. ◀

La leucémie aiguë myéloïde

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une tumeur maligne hématologique hétérogène aux niveaux biologique, moléculaire et clinique. La LAM est caractérisée par une amplification clonale et une perte de différenciation des précurseurs myéloïdes (les blastes) dans la moelle osseuse (MO) et le sang périphérique. Il s'agit d'une maladie dans laquelle plus de 50 % des patients sont âgés de plus de 65 ans. Des efforts considérables ont été déployés pour décrypter les aberrations génétiques associées à la leucémie, telles que les translocations et les inversions chromosomiques, ainsi que les multiples mutations somatiques acquises qui affectent des gènes ayant différentes fonctions. Ces identifications génétiques améliorent le pronostic de la maladie, mais le taux de survie des patients présentant une LAM, qui dépend largement de leur âge,

LAM fatale ? La signalisation calcique à la rescousse !

Marie-Océane Laguillaumie^{*1}, Clara Lewuillon^{*1},
Yasmine Touil^{§1}, Loïc Lemonnier^{§2,3}, Thierry Idziorek^{§1}



¹Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France.

²Univ. Lille, Inserm, U1003 - PHYCEL - physiologie cellulaire, F-59000 Lille, France.

³Univ. Lille, laboratoire d'excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.

*participation équivalente

§co-auteurs principaux
yasmine.touil@inserm.fr
loic.lemonnier@inserm.fr
thierry.idziorek@inserm.fr

reste faible en raison d'un manque de thérapie efficace [1].

La LAM a pour origine la transformation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la MO. Les mutations primaires généralement acquises existent déjà dans le clone fondateur. Elles surviennent dans des gènes impliqués dans le processus épigénomique, tels que *DNMT3A* (*DNA methyl-transferase 3α*), *ASXL1* (*additional sex combs like 1*), *TET2* (*ten-eleven-translocation 2*), *IDH1* et *IDH2* (isocitrate déhydrogénases 1 et 2). Les mutations secondaires, impliquant *NPM1* (nucléophosmine) ou des molécules de signalisation (par exemple, *FLT3* [*FMS-like tyrosine kinase 3*], ou la famille des gènes *RAS*), surviennent en revanche plus tardivement au cours de la leucémogénèse. Des aberrations génétiques différentes (dont *c-Myc* ou *MYC* [*cellular Myelocytomatosis*]) ont conduit à subdiviser la LAM en classes distinctes, notamment la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) et la LAM liée au syndrome myélodysplasique [2].

Malgré les progrès remarquables de la recherche, la LAM reste une maladie difficile à guérir. En effet, dans une publication récente résumant treize années d'essais cliniques, Oliva *et al.* ont montré que les traitements de la LAM entraînent toujours une rechute pour une proportion importante de patients. Plus précisément, 46,8 % des patients traités par chimiothérapie d'induction présentent une rechute, ce taux passant à 29,4 % lorsque les patients ont reçu une greffe de cellules souches [3]. Il y a donc un intérêt à comprendre les mécanismes qui gouvernent ces résistances pour découvrir de nouveaux moyens de traiter cette maladie.

La signalisation calcique et le cancer

Il est admis que les ions calcium (Ca^{2+}) sont les principaux seconds messagers des cellules et jouent un rôle crucial dans leur destin et leur

survie. L'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire repose sur l'activité de divers canaux, pompes et échangeurs, qui maintiennent une concentration bien définie de calcium dans le cytoplasme et les organites cellulaires, tels que le réticulum endoplasmique (RE), les mitochondries, les lysosomes et le noyau [4-6]. L'activation transitoire ou soutenue de cette machinerie régule les changements dans la durée et les concentrations de calcium intracellulaire, gouvernant ainsi les processus physiologiques qui en dépendent.

Les altérations de la signalisation et de l'homéostasie du calcium affectent de nombreuses fonctions cellulaires et sont impliquées dans diverses maladies, dont le cancer. Il a ainsi été montré que ces altérations entraînent des processus cruciaux participant à la prolifération cellulaire incontrôlée et à la tumorigenèse. Ces processus comprennent la transcription des gènes, la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, le métabolisme, l'apoptose, l'autophagie et la migration cellulaire. Ils peuvent en outre favoriser le développement de la résistance aux thérapies anticancéreuses [7].

Les altérations de la signalisation calcique ont été largement étudiées dans les cancers solides. Elles sont cependant beaucoup moins connues dans les hémopathies malignes, telles que la leucémie myéloïde, à quelques exceptions près, comme dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) dans laquelle l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL (produit du gène de fusion *breakpoint cluster region-Abelson*)¹ semble réguler l'homéostasie du calcium [8]. Dans les LAM, Kang *et al.* ont montré qu'une forte expression des CAMK, les protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} et de son « récepteur », la calmoduline, est associée à une faible probabilité de survie globale chez les patients et que l'inhibition de l'activité kinase de l'enzyme réduit le développement de la leucémie *in vitro* et *in vivo* [9]. De même, une forte expression de deux protéines de la famille S100 (*S100 calcium-binding protein*), S100A8 et S100A9, a été associée aux cellules de LAM se trouvant en contact avec des cellules stromales de la niche leucémique [10]. Leur dérégulation est d'ailleurs décrite comme un facteur de mauvais pronostic et entraîne une résistance accrue aux chimiothérapies. L'inhibition indirecte de leur expression, en agissant sur les voies de signalisation JAK/STAT3 (*Janus kinase/signal transducer and activator of translation 3*), pourrait avoir un intérêt thérapeutique.

Bien que la signalisation calcique soit un facteur connu pour contribuer aux caractéristiques du cancer [11], peu d'essais cliniques ont porté sur des cibles calciques pertinentes. En effet, la plupart des études ont décrit l'impact sur les LAM de médicaments déjà utilisés pour d'autres maladies, tels que les inhibiteurs de VGCC (*voltage-gated calcium channels*) pour les maladies cardiovasculaires ou l'hypertension. Cela est parfaitement illustré par Chae *et al.* dans le cadre d'une étude rétrospective de 12 ans portant sur l'effet des inhibiteurs des canaux calciques [12], dans laquelle le seul effet rapporté est une survie globale plus faible pour les patients

traités par des inhibiteurs de canaux calciques de type L, l'amlodipine ou le diltiazem. Ces observations montrent ainsi que des études spécifiques sont nécessaires afin d'identifier les canaux calciques et les voies de signalisation associées impliqués dans la LAM avant le développement d'un traitement efficace ciblant spécifiquement ces voies.

En tenant compte des connaissances actuelles sur les chimiothérapies dans les cellules leucémiques, notre objectif est ici de détailler les molécules thérapeutiques susceptibles d'affecter le calcium mitochondrial, les réserves calciques réticulaires et l'influx de calcium dans les cellules (Figure 1 et Tableau 1).

Chimiothérapies, calcium et fonction des mitochondries

Au cours des dernières années, certaines études ont commencé, en se concentrant sur l'impact de l'homéostasie calcique, à fournir des preuves du rôle de la signalisation calcique et du contexte génique initial sur la progression de la LAM. Un bon exemple de ces études est fourni par Chen *et al.* [13] qui ont montré que le canal TRPM2 (*transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2*), perméable au calcium, est surexprimé dans les cellules de patients présentant une LAM et dans les cellules de lignées cellulaires de LAM, par rapport aux précurseurs sains. Dans les cellules monocytaires humaines U937 dont le gène *TRPM2* a été inactivé (cellules *TRPM2* KO), ces auteurs ont de plus montré une diminution de la prolifération associée à une réduction significative de la fonction mitochondriale, marquée par une baisse des taux de consommation d'oxygène et de production d'ATP (adénosine triphosphate) et une augmentation des niveaux de ROS (*reactive oxygen species*). Dans ces cellules, les effets observés étaient accompagnés d'une diminution du potentiel de la membrane mitochondriale et de l'absorption du calcium mitochondrial, indiquant ainsi une modification profonde de l'homéostasie calcique en fonction du niveau d'expression du gène *TRPM2*. Les auteurs ont également observé que les cellules *TRPM2* KO étaient plus sensibles à la doxorubicine, une anthracycline utilisée en chimiothérapie, qui induit une forte augmentation de la production de ROS par les cellules. Dans ce modèle, l'effet de la délétion du gène *TRPM2* était lié une altération des processus d'autophagie cellulaire, par la modulation de l'expression des facteurs de transcription CREB (*C-AMP response element-binding protein*) et ATF4 (*activating transcription factor 4*). Cette étude montre ainsi que *TRPM2* pourrait être une cible intéressante pour le traitement de la LAM. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucun inhibiteur spécifique de ce canal, bien que le composé A23 ait récemment

¹ Le gène de fusion *BCR-ABL*, aussi appelé gène de Philadelphie ou chromosome Ph1, est le résultat d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. *BCR-ABL* code une protéine de fusion possédant une activité tyrosine kinase dérégulée qui active divers mécanismes participant à la multiplication cellulaire. Ce gène est présent dans toutes les leucémies myéloïdes chroniques (LMC).

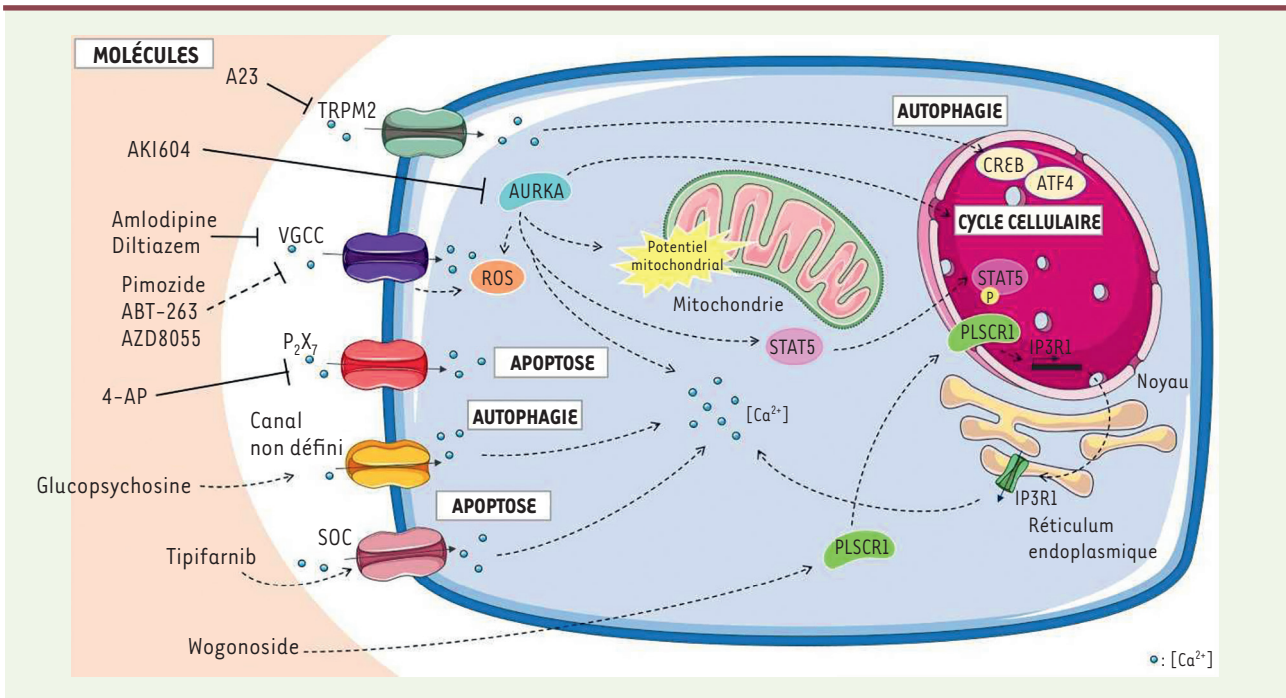


Figure 1. Représentation schématique des principales molécules possédant un potentiel thérapeutique et ciblant les voies de signalisation calcique dans les cellules de LAM (voir Tableau 1). TRPM2 : transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; AURKA : Aurora kinase A ; PLSCR1 : phospholipid scramblase 1 ; IP3R1 : inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 ; P₂X₇R : P2X purinoceptor 7 ; SOC : store-operated channels ; STAT5 : signal transducer and activator of transcription 5 ; CREB : C-AMP response element-binding protein ; ATF4 : activating transcription factor 4 ; VGCC : voltage-gated calcium channels.

été proposé comme une nouvelle piste prometteuse pour le développement de futurs inhibiteurs de TRPM2 cliniquement pertinents [14].

Plusieurs études ont par ailleurs montré que, même sans cibler spécifiquement TRPM2, l'activité mitochondriale peut être affectée par des molécules qui sont utilisées pour le traitement des patients présentant une LAM. Un tel exemple a été fourni récemment par Wang *et al.* [15] qui ont développé un nouveau médicament, le AKI604, qui inhibe spécifiquement l'Aurora kinase A (AURKA). Les Aurora kinases sont connues pour être surexprimées dans plusieurs cancers, dont la LAM, où elles participent à la mitose et à la cytokinèse. Des inhibiteurs de kinases Aurora ont donc été développés. L'un d'entre eux, l'AZD1152, a été utilisé dans des études cliniques comme traitement potentiel pour les patients présentant une LAM, après qu'il ait été démontré qu'il diminuait la viabilité et la prolifération des cellules de LAM et induisait l'apoptose de ces cellules [16-17]. Dans leur étude, Wang *et al.* ont ainsi montré que l'AKI604 pouvait inverser l'effet de STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) sur la prolifération des cellules leucémiques. Ce résultat est particulièrement pertinent puisque STAT5 est activé de manière aberrante dans les blastes des patients présentant une LAM [18], et pour entraîner une diminution de la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) [19] et contrôler l'expression d'AURKA [20]. Le traitement par l'AKI604 a été associé à une altération de l'activité mitochondriale, à une perturbation du potentiel de la membrane mitochondriale et à une augmenta-

tion de la production de ROS. Ces effets ont également été liés à une augmentation de la concentration calcique cytoplasmique ($[Ca^{2+}]_c$), mais l'étude n'a malheureusement pas apporté d'éléments supplémentaires permettant de comprendre l'origine et les conséquences de cette modification de l'homéostasie calcique. Dans un modèle de xéno greffe, le traitement par l'AKI604 a néanmoins diminué la croissance tumorale, prouvant ainsi son potentiel thérapeutique. Une autre étude récente a proposé une combinaison de trois molécules pour améliorer la survie des patients présentant une LAM, dont l'un (le pimozide) est un inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendants. Bien qu'il ait été démontré que l'association de l'ABT-263, un mimétique du domaine BH3 (le domaine d'interaction BH3 de certains membres de la famille BCL-2 [*B-cell lymphoma-2*]), de l'AZD 8055, un inhibiteur de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), et du pimozide, est efficace pour induire une mort cellulaire dans des lignées résistantes de LAM, et que cet effet implique la production de ROS et la perturbation de l'activité mitochondriale, aucun élément n'a été fourni concernant l'impact précis de l'homéostasie calcique sur cet effet synergique [21].

Molécules	Cibles	Utilisation clinique	Impact clinique	Mécanismes	Références
amlodipine / diltiazem	Canaux calciques de type L	Oui (maladies cardiovasculaires, hypertension)	Diminue la survie des patients présentant une LAM	Inhibiteurs des canaux calciques de type L	[12]
A23	Canal TRPM2	Non	-	Inhibiteur de TRPM2 rendant les cellules LAM plus sensibles aux chimiothérapies <i>in vitro</i> (augmente la production de ROS).	[13]
AKI604	Aurora kinase A (AURKA)	Non	-	Inhibiteur d'AURKA bloquant l'activité mitochondriale, augmentant la production de ROS et le taux de calcium cytoplasmique, diminuant la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes.	[15]
pimozide	Canaux calciques voltage-dépendants	Non	-	En combinaison avec l'ABT-263 et l'AZD 8055, le pimozide inhibe les fonctions mitochondriales et induit l'apoptose de cellules de lignées de LAM résistantes.	[21]
wogonoside	IP3R1	Non	-	Inhibe la prolifération via l'activation de PLSCR1, la surexpression d'IP3R1 et l'augmentation du taux de calcium cytosolique en résultant, induisant la différenciation des cellules de LAM.	[22,23]
4-AP	Canaux potassiques voltage-dépendants	Non	-	L'inhibition des canaux potassiques voltage-dépendants par le 4-AP entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique, l'entrée de calcium dans les cellules de LAM via les récepteurs ionotropiques P ₂ X ₇ , et induit l'apoptose.	[25]
glucopsychosine	Inconnues	Non	-	Induit l'apoptose des cellules de LAM, mais pas des cellules hématopoïétiques normales, via une entrée de calcium par des canaux non identifiés.	[26]
tipifarnib	Farnésyl-transférase	Non	-	Inhibe la farnésyl-transférase et augmente la concentration calcique intracellulaire via l'activation des canaux SOC, induisant l'apoptose des cellules de LAM.	[27]

Tableau 1. Résumé des principales molécules présentant un potentiel thérapeutique et ciblant des voies de signalisation calciques dans les cellules de LAM. TRPM2 : transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; AURKA : Aurora kinase A ; PLSCR1 : phospholipid scramblase 1 ; IP3R1 : inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 ; P₂X₇R : P2X purinoceptor 7 ; SOC : store-operated channels.

Modulation des réserves de calcium du réticulum endoplasmique

Plusieurs études ont montré un lien entre activité mitochondriale et chimiothérapies. Ces traitements peuvent toutefois cibler d'autres acteurs clés de la voie de signalisation du calcium, notamment les récepteurs de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3R), dont l'activation entraînera la libération de calcium par le réticulum endoplasmique (RE), une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_c$, et la stimulation de nombreuses voies de signalisation calciques. L'un de ces traitements, le wogonoside, un flavonoïde d'origine naturelle ayant des effets antiprolifératifs sur les cellules de LAM via l'activation de la phospholipide scramblase 1 (PLSCR1) a été étudié par Chen *et al.* [22]. Le wogonoside favorise en effet la translocation de la PLSCR1 dans le noyau, dans lequel la protéine se lie à la région promotrice du gène codant l'IP3R1, augmentant son expression. Chen *et al.* ont tenté de mieux comprendre le rôle de l'homéostasie calcique dans les effets du wogonoside. En utilisant des cellules primaires de LAM, ils ont identifié plusieurs cibles qui étaient modulées par le wogonoside et étaient liées à ses effets sur la prolifération et la différenciation cellulaires. Ils ont en effet constaté que les inhibiteurs 1 (p21Cip1) et 1B (p27Kip1) de la cycline-dépendante kinase étaient stimulés, et que c-Myc était inhibé. Avec le temps de traitement, le wogonoside augmente la $[Ca^{2+}]_c$, atteignant un pic à 72 heures. En utilisant le 2-APB, un inhibiteur des canaux calciques ciblant également les IP3R, en combinaison avec la suppression du calcium extracellulaire, ces auteurs ont montré que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ induite par le wogonoside, conduisant à la différenciation des cellules de LAM, était principalement due à la libération de calcium du RE via l'IP3R1 et non à l'influx de calcium à travers la membrane plasmique [23]. Shi *et al.* ont par ailleurs observé que l'IP3R2 était surexprimé dans les LAM cytogénétiquement normales et qu'il représentait un biomarqueur prédictif associé à un pronostic plus défavorable et à une survie globale réduite [24]. Ces observations apparemment contradictoires illustrent la nécessité de continuer à étudier les rôles de toutes les isoformes d'IP3R dans la LAM, et des voies de signalisation calcique associées, afin de mieux comprendre la progression de la maladie et la résistance de ce cancer aux chimiothérapies actuelles.

Les chimiothérapies ayant un impact sur l'influx de calcium

Certaines molécules proposées pour le traitement de la LAM augmentent la concentration intracellulaire de calcium ($[Ca^{2+}]_c$) via leur effet direct sur des récepteurs membranaires ou sur des canaux calciques. C'est le cas de la 4-aminopyridine (4-AP), un inhibiteur des canaux potassiques voltage-dépendants couramment utilisé. L'application de 4-AP sur des cellules de lignées cellulaires de LAM permet d'inhiber ces canaux et d'induire l'apoptose des cellules. Cependant, Wang *et al.* ont démontré que l'effet proapoptotique de la 4-AP reposait principalement sur l'activation du récepteur purinergique P_2X_7 (*P2X purinoceptor 7*). En effet, le traitement des cellules par la 4-AP induit une entrée de calcium via ce récepteur ionotropique situé dans la

membrane plasmique, conduisant à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ et à l'induction de l'apoptose, un effet qui est abrogé dans les cellules de LAM traitées avec un siARN ciblant le récepteur P_2X_7 [25]. Dans un travail similaire, Angka *et al.* ont identifié la nutraceutique glucopsychosine, un lipide dérivé du lait de vache, comme étant un composé anti-leucémique potentiel. La glucopsychosine induit une apoptose caspase-indépendante sélectivement dans les cellules de LAM, mais pas dans les cellules hématopoïétiques normales, en raison de l'activation de la calpaïne dans les cellules leucémiques. La calpaïne est activée par une augmentation de $[Ca^{2+}]_c$ résultant de l'entrée de calcium par des canaux calciques qui n'ont pas été identifiés [26]. Le tipifarnib, un inhibiteur de la farnesyltransférase, est une autre molécule qui peut également induire l'apoptose des cellules de LAM en augmentant la concentration de $[Ca^{2+}]_c$ sans perturber directement la signalisation calcique associée au RE ou à la mitochondrie. Cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ est directement liée à l'activation de canaux calciques spécifiques, les canaux SOC (*store-operated channels*), qui représentent la principale voie d'entrée du calcium dans les cellules non excitables [27]. Dans cette étude, les outils pharmacologiques et les criblages par ARNm ont conduit les auteurs à proposer Orai3 (*ORAI calcium release-activated calcium modulator 3*) comme le principal canal impliqué dans les effets du tipifarnib. Cependant, une étude ultérieure a proposé Orai2 et Orai1 comme principaux composants des canaux SOC dans les cellules de LAM, illustrant à nouveau la nécessité de mieux caractériser les principales voies d'entrée du calcium dans ce modèle [28].

Dans certains cas, la modulation du calcium peut résulter de l'expression ectopique de protéines. Un exemple est celui donné par le récepteur olfactif OR51B5 (*olfactory receptor family 51 subfamily B member 5*) qui est exprimé dans les cellules de LAM. Sa présence dans ces cellules entraîne une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ et une inhibition de la prolifération cellulaire. Des canaux calciques de type T et de type L seraient impliqués [29]. S'ils sont confirmés, ces derniers résultats pourraient conduire à envisager de nouvelles cibles pour des thérapies innovantes ciblant soit ce récepteur, soit les voies de signalisation qui lui sont associées.

Les futures directions

L'une des principales voies de signalisation activées par l'entrée de calcium extracellulaire, ou l'augmentation des concentrations de calcium intracellulaire, est la voie calmoduline/calcineurine/NFAT (*nuclear factor of*

activated T cells) (pour revue, voir [30]). Comme nous l'avons présenté, de nombreux médicaments proposés aux patients présentant une LAM induisent des variations importantes de la $[Ca^{2+}]_c$, ce qui devrait avoir un impact considérable sur cette voie de signalisation. Une étude récente de He *et al.* a montré que les chimiothérapies peuvent également avoir un impact direct sur cette voie de signalisation. Le lénalidomide, un médicament utilisé pour traiter le myélome multiple mais dont l'efficacité dans la LAM est modeste, présente une activité cytotoxique accrue sur les cellules de LAM lorsqu'il est associé à la cyclosporine, un inhibiteur bien connu de la calcineurine [31]. Ce résultat suggère qu'une combinaison de traitements incluant des modulateurs de la voie calcimoduline/calcineurine/NFAT pourrait représenter un moyen d'améliorer l'efficacité des chimiothérapies actuellement utilisées pour traiter les patients présentant une LAM. Bien que séduisante, cette hypothèse reste cependant à confirmer avec d'autres médicaments déjà connus pour moduler la signalisation calcique de la LAM.

Une autre direction possible pour de futures recherches est l'utilisation de médicaments ciblant les canaux calciques exprimés à la fois par les cellules de LAM et par les cellules du microenvironnement tumoral. En effet, les cellules des différentes niches modulent directement le destin des cellules de la LAM, et peuvent favoriser sa progression vers des stades plus agressifs ainsi que sa survie face aux chimiothérapies. Borella *et al.* ont montré que la lercanidipine, un inhibiteur du canal calcique CaV1.2 (*calcium voltage-gated channel subunit alpha1 c*), peut diminuer la prolifération des cellules de la LAM et des cellules stromales mésenchymateuses. La combinaison de cet agent à double cibles avec l'agent chimiothérapeutique cytarabine, également appelée Ara-C ou cytosine arabinoside, réduit d'ailleurs de manière significative la croissance tumorale dans un modèle préclinique, cet effet de synergie étant beaucoup plus important que celui que l'on observe lorsque chaque molécule est appliquée séparément [32]. En conclusion, ces études soulignent le rôle critique de la signalisation calcique dans la LAM, et l'énorme potentiel d'une meilleure compréhension des voies dépendant du calcium lors de la conception de la prochaine génération de traitements ciblant non seulement les cellules de la LAM, mais aussi leur microenvironnement. ♦

SUMMARY

Lethal AML? Calcium signalling to the rescue!

Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by genetic aberrations in hematopoietic precursors of the myeloid lineage which lead to their defective maturation/function. While intensive chemotherapy protocols result in complete remission in 50 % to 80 % of AML patients, relapse occurs in the majority of cases. While calcium signalling is a well-known contributor to cancer hallmarks, few AML related studies have focused on relevant calcium targets. Our purpose here is to highlight calcium channels and associated signalling pathways involved in AML, in order to promote the development of treatments specifically targeting these pathways. ♦

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par l'Inserm, le CNRS, le Contrat de Plan État-Région (CPER) 2015-2020, la Ligue contre le cancer (Septentrion), la Ligue nationale contre le cancer, la Fondation

ARC, et l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL). M-O.L. et C.L. sont co-financées par le Centre Hospitalier de Lille et la Région Hauts-de-France.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Medinger M, Passweg JR. Acute myeloid leukaemia genomics. *Br J Haematol* 2017 ; 179 : 530–42.
2. Pollyea DA, Bixby D, Perl A, *et al.* NCCN Guidelines Insights: Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw* 2021 ; 19 : 16–27.
3. Oliva EN, Ronnebaum SM, Zaidi O, *et al.* A systematic literature review of disease burden and clinical efficacy for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Am J Blood Res* 2021 ; 11 : 325–60.
4. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 ; 4 : 517–29.
5. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 2007 ; 131 : 1047–58.
6. Oliveira AG, Guimarães ES, Andrade LM, *et al.* Decoding calcium signaling across the nucleus. *Physiology (Bethesda)* 2014 ; 29 : 361–8.
7. Patergnani S, Danese A, Bouhamida E, *et al.* Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int J Mol Sci* 2020 ; 21.
8. Cabanas H, Harnois T, Magaud C, *et al.* Deregulation of calcium homeostasis in Bcr-Abl-dependent chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* 2018 ; 9 : 26309–27.
9. Kang X, Cui C, Wang C, Wu G, *et al.* CAMKs support development of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2018 ; 11 : 30.
10. Böttcher M, Panagiotidis K, Bruns H, *et al.* Bone marrow stroma cells promote induction of a chemoresistant and prognostic unfavorable S100A8/A9high AML cell subset. *Blood Adv* 2022 ; 6 : 5685–97.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 ; 144 : 646–74.
12. Chae YK, Dimou A, Pierce S, *et al.* The effect of calcium channel blockers on the outcome of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014 ; 55 : 2822–9.
13. Chen S-J, Bao L, Keefer K, *et al.* Transient receptor potential ion channel TRPM2 promotes AML proliferation and survival through modulation of mitochondrial function, ROS, and autophagy. *Cell Death Dis* 2020 ; 11 : 247.
14. Zhang H, Yu P, Lin H, *et al.* The Discovery of Novel ACA Derivatives as Specific TRPM2 Inhibitors that Reduce Ischemic Injury Both In Vitro and In Vivo. *J Med Chem* 2021 ; 64 : 3976–96.
15. Wang J-X, Zhang L, Huang Z-W, *et al.* Aurora kinase inhibitor restrains STAT5-activated leukemic cell proliferation by inducing mitochondrial impairment. *J Cell Physiol* 2020 ; 235 : 8358–70.
16. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, *et al.* AZD1152, a novel and selective aurora B kinase inhibitor, induces growth arrest, apoptosis, and sensitization for tubulin depolymerizing agent or topoisomerase II inhibitor in human acute leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2007 ; 110 : 2034–40.
17. Löwenberg B, Muus P, Ossenkoppele G, *et al.* Phase 1/2 study to assess the safety, efficacy, and pharmacokinetics of barsertib (AZD1152) in patients with advanced acute myeloid leukemia. *Blood* 2011 ; 118 : 6030–6.
18. Birkenkamp KU, Geugien M, Lemmink HH, *et al.* Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia* 2001 ; 15 : 1923–31.
19. Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, *et al.* High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2011 ; 117 : 3409–20.
20. Hung L-Y, Tseng JT, Lee Y-C, *et al.* Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res* 2008 ; 36 : 4337–51.
21. Wang Z, Mi T, Bradley HL, *et al.* Pimozide and Imipramine Blue Exploit Mitochondrial Vulnerabilities and Reactive Oxygen Species to Cooperatively Target High Risk Acute Myeloid Leukemia. *Antioxidants (Basel)* 2021 ; 10.
22. Chen Y, Hui H, Yang H, *et al.* Wogonoside induces cell cycle arrest and differentiation by affecting expression and subcellular localization of PLSCR1 in AML cells. *Blood* 2013 ; 121 : 3682–91.
23. Li H, Xu J, Zhou Y, *et al.* PLSCR1/IP3R1/Ca(2+) axis contributes to differentiation of primary AML cells induced by wogonoside. *Cell Death Dis* 2017 ; 8 : e2768.

RÉFÉRENCES

24. Shi J, Fu L, Wang W. High expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2 (ITPR2) as a novel biomarker for worse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2015 ; 6 : 5299-309.
25. Wang W, Xiao J, Adachi M, et al. 4-aminopyridine induces apoptosis of human acute myeloid leukemia cells via increasing [Ca²⁺]_i through P2X7 receptor pathway. *Cell Physiol Biochem* 2011 ; 28 : 199-208.
26. Angka L, Lee EA, Rota SG, et al. Glucopsychosine increases cytosolic calcium to induce calpain-mediated apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Lett* 2014 ; 348 : 29-37.
27. Yanamandra N, Buzzeo RW, Gabriel M, et al. Tipifarnib-induced apoptosis in acute myeloid leukemia and multiple myeloma cells depends on Ca²⁺ influx through plasma membrane Ca²⁺ channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2011 ; 337 : 636-43.
28. Diez-Bello R, Jardin I, Salido GM, et al. Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017 ; 1864 : 1064-70.
29. Mantioti S, Wojcik S, Göthert JR, et al. Deorphanization and characterization of the ectopically expressed olfactory receptor OR51B5 in myelogenous leukemia cells. *Cell Death Discov* 2016 ; 2 : 16010.
30. Yeh Y-C, Parekh AB. CRAC Channels and Ca²⁺-Dependent Gene Expression. In : Kozak JA, Putney JW, editors. *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*. Boca Raton (FL) : CRC Press/Taylor & Francis, 2018 : pp. 93-106.
31. He X, Dou A, Feng S, et al. Cyclosporine enhances the sensitivity to lenalidomide in MDS/AML in vitro. *Exp Hematol* 2020 ; 86 : 21-7.e2.
32. Borella G, Da Ros A, Borile G, et al. Targeting the plasticity of mesenchymal stromal cells to reroute the course of acute myeloid leukemia. *Blood* 2021 ; 138 : 557-70.

TIRÉS À PART

T. Idziorek

www.myobase.org

Catalogue en ligne disponible gratuitement sur Internet publié par l'AFM-Téléthon.
Retrouvez facilement toutes les références bibliographiques sur les maladies neuromusculaires, les situations de handicap qu'elles génèrent et leurs aspects psychologiques.

Myobase donne un accès libre à 75 % du fonds documentaire collecté depuis 1990, représentant plus de 40 000 références spécifiques du domaine des maladies neuromusculaires.

> **articles** de la littérature biomédicale et psycho-sociale

> **livres, thèses**

> **guides** d'associations et **rapports** institutionnels d'agences internationales

> **brèves en français**, synthèses des articles médico-scientifiques internationaux les plus pertinents

> **publications AFM-Téléthon** destinées aux professionnels de santé ou aux personnes atteintes de maladie neuromusculaire et à leur entourage

UN OUTIL ERGONOMIQUE, UNE INTERFACE BILINGUE

- Laissez-vous guider par les **tutoriels**
- Lancez une **recherche** et affinez votre sélection grâce aux filtres

TOUT MYOBASE

Rechercher...

Recherche avancée

Historique

FILTRES

Type de document

- Article [3443]
- Publication AFM [176]
- Thèse/Mémoire [107]
- Brève [102]

► PUBLICATIONS AFM-Téléthon

► BRÈVES

► DOCUMENTS DE SYNTHÈSE

► INSTITUT DES BIOTHÉRAPIES PUBLICATIONS

- **Partagez** les résultats de votre recherche

UN ACCÈS facile et simple

Rechercher avec des opérateurs :

- guillemets pour une expression "**maladie de pompe**"
- **+** pour signifier **ET**, et retrouver tous les documents contenant les deux mots "**fauteuil +électrique**"
- **-** pour signifier **NON** et enlever le mot de la recherche : "**autonomie -établissement**"



Fils RSS

Les Fils RSS vous permettent de suivre quotidiennement les nouveautés de Myobase, mais aussi ...



Alertes Myobase

Les Alertes rassemblent une sélection des dernières acquisitions de Myobase et paraissent deux fois...



Veille Neuromusculaire

Publiée tous les 15 jours par le Service de documentation de l'AFM-Téléthon, La "V..."

- Cliquez sur l'**onglet thématique** qui vous convient (haut de la page d'accueil)
- Créez vos alertes personnalisées en ouvrant un **compte personnel**
- Téléchargez la **Veille Neuromusculaire**
- Abonnez-vous aux **flux RSS**

CHAPITRE 2) ARTICLE : *Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure*

AVANT PROPOS

La leucémie aiguë myéloïde est une hémopathie maligne dont le risque de rechute est particulièrement élevé. Une des causes majeures de ce phénomène est le développement de mécanismes de résistance aux thérapies. Pourtant, ces processus sont encore peu élucidés.

Dans ce contexte, le laboratoire a mis en évidence le rôle de l'ATP binding cassette de sous-famille B 1 (ABCB1) chez les patients atteints de LAM, en soulignant notamment son association avec les marqueurs de cellules souches associés à un pronostic défavorable.

Grâce à cette étude publiée dans le journal International Journal of Molecular Sciences en mai 2022, nous avons montré l'importance du canal calcique ORAI1 (*ORAI calcium release-activated calcium modulator 1*) dans l'entrée calcique dépendant du stock réticulaire (SOCE), à savoir la principale voie d'entrée de calcium dans les cellules non excitables. Cette étude a été menée sur deux lignées cellulaires humaines de LAM (KG1 et U937), ainsi que dans des cellules primaires de patients.

D'après nos résultats, l'entrée calcique capacitive évolue en fonction du stade de différenciation, du niveau d'activité de l'ABCB1 ainsi que de la proportion de cellules souches leucémiques. Enfin, nos travaux mettent en évidence que l'expression du canal ORAI1 ainsi que de l'amplitude du courant SOCE sont modulées lorsque les cellules développent une résistance à l'apoptose après utilisation de la cytarabine (Ara-C), agent chimiothérapeutique.

L'entrée calcique médiée par les canaux ORAI1 pourrait donc représenter un marqueur de progression de la LAM et signaler l'apparition d'une résistance au traitement.



Article

Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure

Clara Lewuillon ¹, Aurélie Guillemette ¹, Sofia Titah ¹, Faruk Azam Shaik ^{2,3}, Nathalie Jouy ⁴,
Ossama Labiad ¹, Valerio Farfariello ^{5,6}, Marie-Océane Laguillaumie ¹, Thierry Idziorek ¹,
Adeline Barthélémy ¹, Pauline Peyrouze ¹, Céline Berthon ¹, Mehmet Cagatay Tarhan ^{3,7}, Meyling Cheok ¹,
Bruno Quesnel ^{1,†}, Loïc Lemonnier ^{5,6,*} and Yasmine Touil ^{1,*}

- ¹ CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR 9020, UMR-S 1277—Canther—Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Université de Lille, F-59000 Lille, France; clara.lewuillon@inserm.fr (C.L.); aurelie.guillemette@inserm.fr (A.G.); sofia.titah@gmail.com (S.T.); ossama.labiad@inserm.fr (O.L.); marie-oceane.laguillaumie@inserm.fr (M.-O.L.); thierry.idziorek@inserm.fr (T.I.); ade.barthelemy@gmail.com (A.B.); pauline.peyrouze@inserm.fr (P.P.); celine.berthon@chu-lille.fr (C.B.); meyling.cheok@inserm.fr (M.C.); bruno.quesnel@chu-lille.fr (B.Q.)
- ² Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), F-59000 Lille, France; farukaz29@gmail.com
- ³ LIMMS/CNRS-IIS IRL2820, The University of Tokyo, Tokyo 153-8505, Japan; cagatay.tarhan@junia.com
- ⁴ UMS 2014/US41 Plateformes Lilloises En Biologie Et Sante, Université de Lille, F-59000 Lille, France; nathalie.jouy@inserm.fr
- ⁵ Inserm, U1003-PHYCEL-Physiologie Cellulaire, Université de Lille, F-59000 Lille, France; valerio.farfariello@inserm.fr
- ⁶ Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Université de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France
- ⁷ CNRS, Centrale Lille, Junia, Université Polytechnique Hauts-de-France, UMR 8520—IEMN—Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie, Université de Lille, F-59000 Lille, France
- * Correspondence: loic.lemonnier@inserm.fr (L.L.); yasmine.touil@inserm.fr (Y.T.)
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Lewuillon, C.; Guillemette, A.; Titah, S.; Shaik, F.A.; Jouy, N.; Labiad, O.; Farfariello, V.; Laguillaumie, M.-O.; Idziorek, T.; Barthélémy, A.; et al. Involvement of ORAI1/SOCE in Human AML Cell Lines and Primary Cells According to ABCB1 Activity, LSC Compartment and Potential Resistance to Ara-C Exposure. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5555. <https://doi.org/10.3390/ijms23105555>

Academic Editor: Michio Asahi

Received: 15 April 2022

Accepted: 13 May 2022

Published: 16 May 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Acute myeloid leukemia (AML) is a hematological malignancy with a high risk of relapse. This issue is associated with the development of mechanisms leading to drug resistance that are not yet fully understood. In this context, we previously showed the clinical significance of the ATP binding cassette subfamily B-member 1 (ABCB1) in AML patients, namely its association with stemness markers and an overall worth prognosis. Calcium signaling dysregulations affect numerous cellular functions and are associated with the development of the hallmarks of cancer. However, in AML, calcium-dependent signaling pathways remain poorly investigated. With this study, we show the involvement of the ORAI1 calcium channel in store-operated calcium entry (SOCE), the main calcium entry pathway in non-excitable cells, in two representative human AML cell lines (KG1 and U937) and in primary cells isolated from patients. Moreover, our data suggest that in these models, SOCE varies according to the differentiation status, ABCB1 activity level and leukemic stem cell (LSC) proportion. Finally, we present evidence that ORAI1 expression and SOCE amplitude are modulated during the establishment of an apoptosis resistance phenotype elicited by the chemotherapeutic drug Ara-C. Our results therefore suggest ORAI1/SOCE as potential markers of AML progression and drug resistance apparition.

Keywords: calcium; SOCE; AML; ORAI1; ABCB1; leukemic stem cells; NFAT; Ara-C

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a complex hematological malignancy characterized by defective maturation of myeloid primitive cells (blasts). Because AML disease displays genetic, epigenetic and subclonal heterogeneity, it leads to high phenotypic variability,

decreasing therapeutic efficiency. Current intensive chemotherapy combining cytarabine (Ara-C) with anthracycline molecules induces complete remission (<5% blasts in the bone marrow) in 70% of patients. Moreover, patients can now benefit (i) from targeted therapies, as well as in cases of unfavorable prognostic factors or even refractory disease, and (ii) from allogeneic hematopoietic stem cell (HSC) transplants or donor lymphocyte transfusion. Despite these tremendous efforts to improve therapeutic efficiency, AML related to relapse leading to death still occurs in more than 50% of cases within 5 years, and these numbers increase up to 80% for subjects over 80 years of age [1]. Mechanisms of anti-leukemia drug resistance that could explain treatment failures have, however, not yet been fully elucidated.

We have previously shown the clinical significance of ATP binding cassette subfamily B-member 1 (ABCB1), also known as permeability glycoprotein and multidrug resistance (P-gp or MDR1), in a cohort of patients with de novo AML [2]. ABCB1 activity and expression were linked to a worse prognosis and leukemic stem cell (LSC) compartment proportion. However, we showed that ABCB1 does not directly mediate chemotherapy resistance and can represent a bystander effect related to other chemoresistance mechanisms [2]. Deciphering these mechanisms related to the ABCB1 phenotype and underlying chemoresistance in AML is crucial to better eradicate disease relapse, which is particularly frequent in this hematological malignancy.

Dysregulation in calcium signaling and/or homeostasis affects numerous cellular functions and has been shown to be involved in cancer initiation and progression. Altered calcium signaling can lead to cancer development via its impact on various processes, including gene transcription, regulation of cell cycle engagement, proliferation, differentiation and apoptosis, all of which potentially contribute to the development of resistance to cancer therapies [3].

One of the main calcium entry pathways into cells is store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), also known as capacitative calcium entry, mediated by store-operated channels (SOCs). SOCE involves the activation of plasma membrane ORAI calcium channels [4]. We and others have previously shown that ORAI1 mediates SOCE in cancer cell lines and plays a role in proliferation and chemoresistance [5–7].

Alterations in calcium signaling have been extensively studied in solid cancers [3]. In hematological malignancies such as myeloid leukemia, few studies have reported data regarding dysregulation in calcium signaling pathways and the associated cellular functions [8]. In AML, the roles of ORAI calcium channels have rarely been investigated [8], in contrast to the calcium/calcineurin/Nuclear factor of Activated T cells (NFAT) pathway, one of the main signaling pathways activated by calcium [9]. It has been reported that primary AML cells exhibit variable NFAT expression according to the stage of differentiation and disease progression [9]. Indeed, NFAT was shown to be overexpressed in primary leukemic blasts at disease relapse compared with diagnosis [10]. Interestingly, inhibition of NFAT nuclear translocation increased the sensitivity of AML cells to chemotherapy drugs from patients bearing the internal tandem duplication of the FLT3 receptor (FLT3ITD), a frequent and disease driver mutation, thus emphasizing a potential link between calcium signaling and chemoresistance [11].

Here, we demonstrate for the first time, to our knowledge, the involvement of ORAI1 in SOCE in human AML cell lines and primary cells according to their differentiation status, ABCB1 activity and LSC compartment proportion. We also show the contribution of ORAI1 (i) to AML cell cycle engagement and (ii) to apoptosis resistance against Ara-C treatment.

2. Results

2.1. *ORAI1 and ABCB1 Gene Expression Varies in AML Patients at Diagnosis According to the Differentiation Stage and Prognosis of the Disease*

2.1.1. *ORAI1 and ABCB1 Are Overexpressed in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Isolated from AML Patients*

We first analyzed *ORAI1* and *ABCB1* gene expression by RT-qPCR in PBMCs isolated from nine AML patients (Table S1) at the time of initial diagnosis (>80% of leukemic cells)

compared with PBMCs from healthy donors. We found that *ORAI1* gene expression was increased in leukemic cells compared with normal cells (normal PBMCs $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.4$ vs. 3.91 for leukemic cells, $p = 0.032$) (Figure 1a). In the same manner, *ABCB1* gene expression was also significantly increased in leukemic blasts compared with normal PBMCs (normal PBMCs $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.14$ vs. 3.86 for leukemic cells, $p = 0.0063$) (Figure 1b).

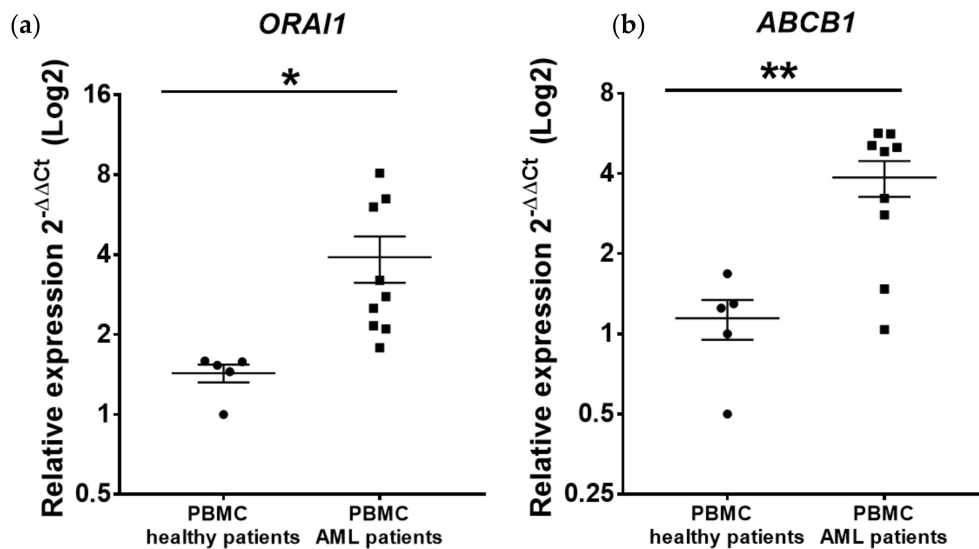


Figure 1. Expression of *ORAI1* and *ABCB1* in human AML primary cells compared with healthy primary PBMCs. qRT-PCR detection of *ORAI1* (a) and *ABCB1* (b) gene expression in AML primary cells isolated from 9 patients at disease diagnosis compared with normal primary PBMCs isolated from 5 healthy donors. The expression levels of *ORAI1* and *ABCB1* relative to beta-2 microglobulin (*B2M*) for each sample were normalized to the *ORAI1* and *ABCB1* levels in healthy PBMCs. The relative expression ratio for each gene was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with healthy PBMCs.

2.1.2. *ORAI1* and *ABCB1* Gene Expression Varies with the Stage of AML Differentiation and Prognostic Classification

In addition to the fresh AML primary samples collected by our laboratory, we analyzed RNA-seq datasets from a cohort of human AML samples at diagnosis ($n = 439$, [12]) available in the public domain (<https://www.cbioportal.org>) for *ORAI1* and *ABCB1* gene expression. We first compared AML patient samples according to the stage of leukemic cell differentiation (French–American–British (FAB) classification), i.e., from the M0 undifferentiated stage to the M5 monocytic differentiated stage. We observed an increase in *ORAI1* expression associated with late stages of AML differentiation (one-way ANOVA ($F(5.79) = 18.07$, $p < 0.0001$) (Figure 2a), while in an opposite manner, *ABCB1* expression was downregulated in a more advanced stage of differentiation (one-way ANOVA ($F(5.76) = 4.2$, $p = 0.002$) (Figure 2b).

AML patients were then classified as favorable ($n = 117$), intermediate ($n = 143$) and adverse risk ($n = 157$) based on the 2017 European Leukemia Net (ELN) risk stratification (Figure 2c). We analyzed *ORAI1* and *ABCB1* gene expression in these three ELN classes, and we observed a significant increase in *ABCB1* in AML patient samples with adverse risk (one-way ANOVA ($F(2.414) = 21.16$, $p < 0.0001$)), while *ORAI1* gene expression was downregulated in this ELN class (one-way ANOVA ($F(2.414) = 7.547$, $p = 0.0006$)) (Figure 2d,e).

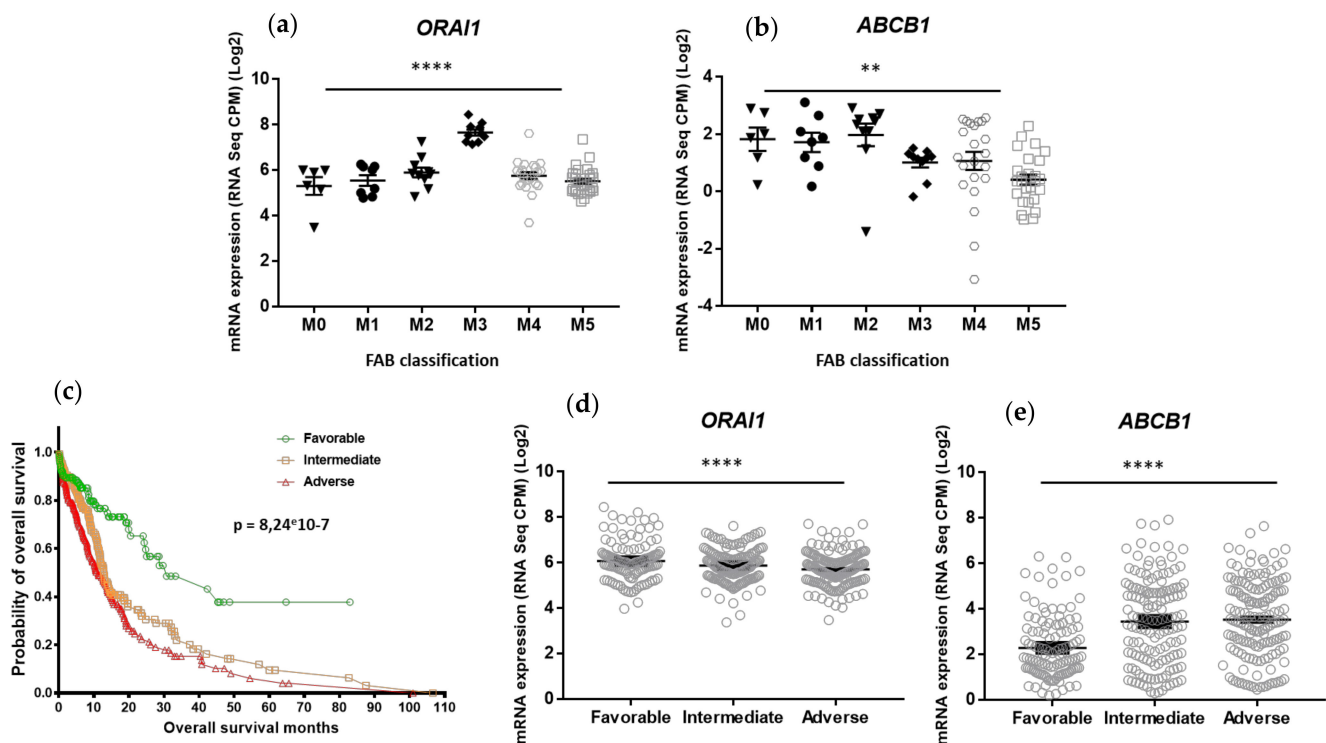


Figure 2. Differential expression patterns of *ORAI1* and *ABCB1* in AML primary cells isolated from patients at the time of disease diagnosis, according to the FAB classification and ELN 2017 risk stratification. (a–e) RNA-seq data were generated by Tyner et al. [12] from samples derived from patients with AML at disease diagnosis. RNA-Seq data were obtained from public domain AML datasets (<https://www.cbioportal.org>, accessed on 15 March 2022). Data were extracted as described by [13,14] for *ORAI1* and *ABCB1* expression in AML primary cells according to the FAB classification (a,b). Overall survival of 439 adult patients with de novo AML according to ELN2017 risk stratification (favorable, intermediate, adverse). The p value is based on the log rank test. (c). Data were extracted for *ORAI1* (d) and *ABCB1* (e) expression according to ELN2017 risk stratification. Normalized expression values are presented as CPM; p values are from one-way ANOVA tests comparing the different means (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

2.1.3. AML with High *ABCB1* and Low *ORAI1* Gene Expression Shows Reduced Expression of *CD33* (Differentiation Marker) and *CDK4/CDK6* (G0–G1 Transition Phase Regulators)

We next analyzed the expression of genes related to AML differentiation (*CD33*) and to cell cycle regulation, more specifically to G0–G1 transition phase regulators (*CDK4* and *CDK6*), in AML patient samples discriminated by their level of expression of *ORAI1* (*ORAI1^{low}* and *ORAI1^{high}*, $n = 219$ and $n = 220$, respectively) (Figure 3a) or *ABCB1* (*ABCB1^{low}* and *ABCB1^{high}*, $n = 220$ and $n = 219$, respectively) (Figure 3e) genes. We found that both *ABCB1^{high}* and *ORAI1^{low}* AML were associated with lower expression of *CD33* (Log (2) = 6.661 vs. 5.761, $p < 0.0001$ and Log (2) = 6.436 vs. 6.003, $p = 0.0007$, respectively) and *CDK4* (Log (2) = 5.658 vs. 5.464, $p = 0.0211$ and Log (2) = 5.698 vs. 5.424, $p = 0.0011$, respectively) genes (Figure 3). Regarding the *CDK6* gene, only *ORAI1^{low}* AML displayed lower expression than *ORAI1^{high}* AML (Figure 3d,h). Interestingly, *ABCB1^{high}* AML samples displayed an overexpression of several leukemic stem cell markers previously identified and established as the 17-gene stemness signature [15] (Table S2) and underexpression of the *ORAI1* calcium channel gene (Log (2) = 3.471 vs. 3.741, $p < 0.001$) (Figure 3i).

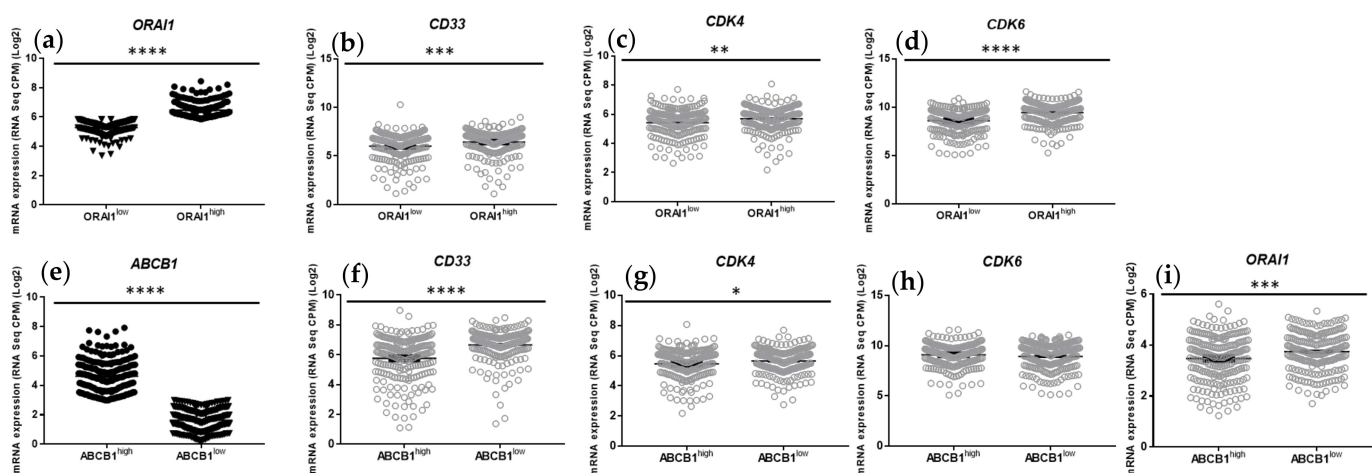


Figure 3. Expression of *CD33*, *CDK4* and *CDK6* in primary AML cells isolated from patients at the time of diagnosis, according to *ABCB1* and *ORAI1* gene expression. (a–i) RNA-seq data were generated by Tyner et al. [12] from samples derived from patients with AML. RNA-Seq data were obtained from public domain AML datasets (<https://www.cbioportal.org>). Data were extracted as described in [13,14] for *ORAI1* and *ABCB1* expression, and 2 groups ($n = 220$ and $n = 219$) of AML patients were discriminated according to high or low levels of *ORAI1* (a) and *ABCB1* (e) expression. Data were extracted for *CD33*, *CDK4* and *CDK6* gene expression in the *ORAI1*^{low} and *ORAI1*^{high} AML and in the *ABCB1*^{low} and *ABCB1*^{high} AML patient subgroups. Normalized expression values are presented as CPM; p values were obtained from Student's t tests between means (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Collectively, these data point out a possible link between the high gene expression of *ABCB1* and the low expression of *ORAI1* with (i) an undifferentiated stage of AML, (ii) lower expression of G0–G1 transition phase regulators, (iii) higher expression of genes related to the leukemic stem cell phenotype and (iv) an overall worse prognosis for patients.

2.2. Involvement of *ORAI1* in SOCE in AML Cell Lines According to *ABCB1* Activity, Stem Cell Phenotype and Cell Cycle Engagement

2.2.1. *ABCB1* Activity Reflects Stemness Markers and Cell Cycle Engagement in AML Cells

We have previously shown in numerous cohorts of AML patients that *ABCB1* gene expression is strongly linked to *ABCB1* activity, the LSC proportion and a worse disease prognosis [2]. Consequently, we next questioned the role of *ORAI1* in SOCE in leukemic cells with higher *ABCB1* activity and/or an enrichment in stemness markers.

Therefore, we investigated whether *ORAI1* contributes to SOCE in two representative AML human cell lines, KG1 and U937, which display opposite features regarding (i) stage of differentiation, (ii) *ABCB1* expression and (iii) LSC size compartment [16,17]. We first analyzed the CD34 + CD38[−] (i.e., LSC) subpopulation in the KG1 and U937 AML cell lines by qRT-PCR, LSC-associated and *ABCB1* gene expression and flow cytometry. As previously reported, the immature KG1 acute myeloid leukemia cell line overexpressed LSC-associated and *ABCB1* genes and made up an important CD34 + CD38[−] LSC subpopulation (10.4%). In contrast, the U937 monocytic differentiated leukemia cell line exhibited a downregulation of LSC markers and a decrease in *ABCB1* gene expression (Table 1).

Table 1. Relative expression of LSC genes, *ABCB1* and LSC compartment proportion in KG1 and U937 AML cell lines. RT-qPCR was performed to analyze the relative expression of the indicated genes as described in the Materials and Methods section. The percentage of LSCs (CD34 + CD38[−]) was also analyzed by flow cytometry. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

AML Cell Lines	«LSC» Gene Expression				MDR Gene Expression	Percent of «LSC»
	<i>LAPTMB4</i>	<i>NYNRIN</i>	<i>MMRN1</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>ABCB1</i>	CD34+/CD38 [−]
KG1	1	1	1	1	1	10.4 ± 0.8 ***
U937	Not expressed	Not expressed	0.05 ± 0.01 ***	0.37 ± 0.3 *	0.001 ± 0.0002 ****	0.04 ± 0.01

We next evaluated *ABCB1* activity in both AML cell lines using the functional Rhodamine 123 (Rh123) exclusion assay. The exclusion rate of the Rh123 fluorescent probe was assessed by flow cytometry. With this method, we characterized two distinct cell populations among U937 and KG1 cells (Figure 4a). Cells displaying a high fluorescence intensity (i.e., cells that did not exclude the Rh123 probe) were considered Rh123^{high} cells, reflecting lower *ABCB1* activity. Cells with a lower fluorescence intensity, noted Rh123^{low}, excluded the probe, reflecting higher *ABCB1* activity. A discrete population of Rh123^{low} cells was identified among the differentiated U937 cell line (2.9 ± 0.8%), while a majority of the immature KG1 cells were characterized as Rh123^{low} (99.9 ± 0.05%) (Figure 4a).

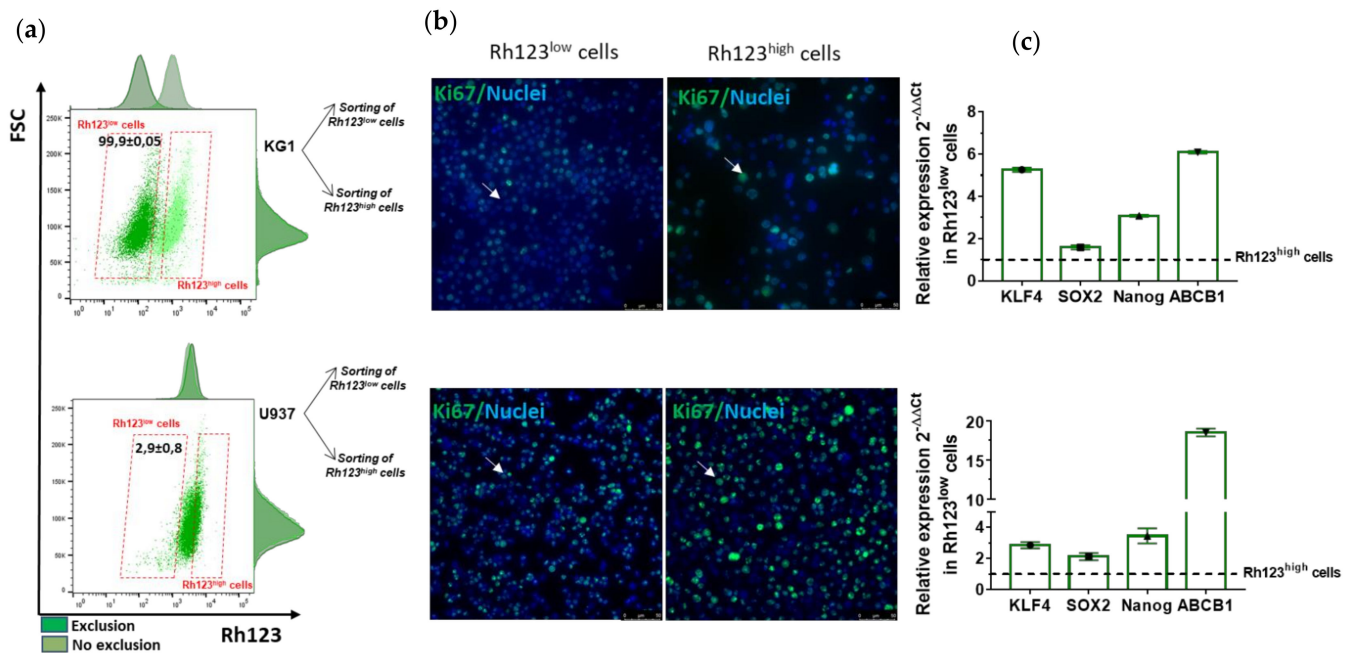


Figure 4. Flow cytometry identification of Rh123^{low} (*ABCB1*^{high}) populations enriched with quiescent cells and stem cell markers in KG1 and U937 AML cell lines. (a) KG1 and U937 leukemic cells were incubated with 0.1 µg/mL Rh123 probe for 20 min. After 60 min of exclusion of the Rh123 probe, the Rh123^{low} cell subpopulation appeared/is highlighted. (b) Ki67 (Alexa Fluor 488, green) and nuclear (Hoechst, blue) staining was then performed on cells sorted by FACS based on Rh123 probe exclusion. Ki67-negative or Ki67-low-expressing cells were considered quiescent cells or slow-cycling cells, respectively. White arrows indicate quiescent cells in the Rh123^{low} compartment and cycling cells in the Rh123^{high} cell compartment. (c) Stemness-associated gene expression was analyzed by RT-qPCR and is shown in the Rh123^{low} cells relative to the expression of the corresponding genes in Rh123^{high} cells. The relative expression ratio for each gene was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The calculated values represent the expression level of each gene relative to the expression of *B2M* used herein as an endogenous control. Histograms present the mean results from three independent experiments.

We and others have previously identified an enrichment of stem-like characteristics (e.g., quiescence and overexpression of stemness genes) in normal hematopoietic cells, tumor cell lines and primary cancer cells using the Rhodamine (Rh123) functional exclusion assay [18,19].

Rh123^{low} and Rh123^{high} U937 and KG1 sorted cells were then subjected to immunostaining and qPCR. Immunocytochemistry revealed a significant difference in the expression level of the nuclear protein Ki67, which is expressed during the cell cycle, between the Rh123^{low} and Rh123^{high} populations in both leukemia cell lines (Figure 4b). The absence or the low fluorescence intensity of the Ki67 protein observed in Rh123^{low} cells was associated with quiescence or slow cycling, respectively. An enrichment of stemness characteristics within KG1 and U937 Rh123^{low} cells was further confirmed by qPCR analysis, which showed a higher expression level of the stemness genes *KFL4*, *SOX2* and *NANOG* (Figure 4c). As expected, *ABCB1* gene expression was highly increased in KG1 and U937 Rh123^{low} cells (Figure 4c).

In addition, we performed flow cytometry immunophenotyping of the Rh123^{low} and Rh123^{high} populations in both cell lines with regard to CD34 and CD38 surface marker expression (Table 2). We observed an enrichment of the CD34 + CD38– stem-cell-like phenotype in the Rh123^{low} cell compartment (a 34-fold and 5-fold increase in U937 and KG1 cells, respectively).

Table 2. LSC compartment identified by CD34 + CD38– phenotype combined with the Rh123 exclusion assay in KG1 and U937 AML cell lines. Percentage of Rh123^{low} and Rh123^{high} cell compartments associated with or without CD34 and CD38 surface markers analyzed by flow cytometry. Means were compared between KG1 and U937 cells. ** $p \leq 0.01$.

AML Cell Lines	Rh123 ^{high}	Rh123 ^{low}	CD34+/CD38–	Rh123 ^{high} CD34+/CD38–	Rh123 ^{low} CD34+/CD38–
KG1	0.09 ± 0.05 **	99.9 ± 0.05 **	10.4 ± 0.8 **	0.0025 ± 0.02	10.4 ± 0.8 **
U937	97.1 ± 0.8	2.9 ± 0.8	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.003

Collectively, these results showed that the Rh123^{low} cell compartment in both cell lines reflected common characteristics regarding *ABCB1* activity or the LSC phenotype. Importantly, despite all the common features between the Rh123^{low} compartment, we observed a marked difference between the proportions of quiescent Ki67-negative cells, which were more pronounced in the U937 Rh123^{low} population, while the number of slow-cycling cells (Ki67^{low}) was increased in KG1 Rh123^{low} cells (Figure 4).

2.2.2. The Involvement of ORAI1 in SOCE in AML Cell Lines Depends on *ABCB1* Activity and LSC Status

We first assessed the contribution of ORAI1 to SOCE in the U937 and KG1 leukemia cell lines. Both cell lines were either treated with Synta66 (SOC inhibitor) or transfected with siORAI1 (100 nM, 48 h) or siCTL and were then loaded with the fluorescent ratiometric Indo-AM calcium dye. The 13 min kinetics were monitored by flow cytometry, during which thapsigargin (1 μM), an inhibitor of SERCA pumps, was added after 2 min in the absence of extracellular calcium followed by the addition of extracellular Ca²⁺ (2 mM) after 9 min. This protocol with thapsigargin induces depletion of the endoplasmic reticulum (ER) calcium stores and activation of SOCE visualized at the time when calcium is added to the extracellular calcium. As shown in Figures S1 and S2, we monitored over time the ratio of F400/F475 fluorescence intensity reflecting cytosolic calcium levels in both cell lines. Application of the SOC channel inhibitor Synta66 (10 μM) and *ORAI1* silencing in KG1 and U937 cells elicited a marked decrease in SOCE (Figure S1 and S2), thus confirming the involvement of the ORAI1 channel in SOCE in AML cell lines.

We next evaluated the level of expression of the ORAI1 calcium channel in the sorted Rh123^{low} and Rh123^{high} populations. As shown in Figure 5a,b, KG1 and U937 Rh123^{low}

cells, which displayed high ABCB1 expression and activity, exhibited lower levels of ORAI1 expression and activity.

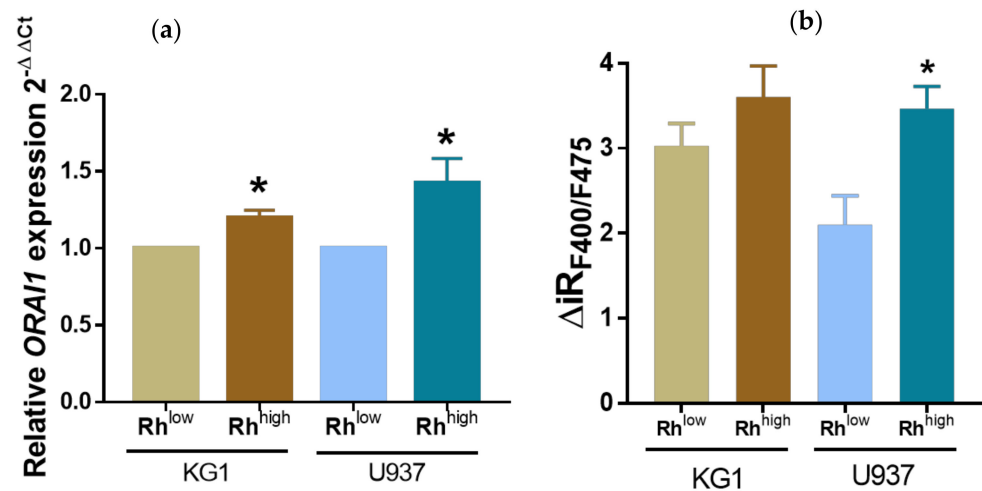


Figure 5. SOCE is downregulated in the KG1 and U937 Rh123^{low} cell subpopulations. (a) Relative *ORAI1* expression in KG1 and U937 Rh123^{low} and Rh123^{high} cell subpopulations determined by RT-qPCR. *ORAI1* relative expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. * $p < 0.05$. (b) $[Ca^{2+}]_i$ was monitored by flow cytometry, and the F400/F475 ratio reflected calcium capacitive entry in KG1 and U937 Rh123^{low} and Rh123^{high} cell subpopulations. The graphs represent the means of 3 independent experiments. * $p \leq 0.05$.

The advantage of the multiparameter flow cytometry technique is the possibility of performing a functional assay of rhodamine exclusion while simultaneously monitoring intracellular calcium levels without unnecessary additional sorting experiments. As shown in Figure 5b, we observed a slight decrease in SOCE in KG1 and U937 Rh123^{low} cells compared with Rh123^{high} cells. Application of the SOC channel inhibitor Synta66 (10 μ M) led to a dramatic decrease in SOCE amplitude in KG1 and U937 Rh123^{low} and Rh123^{high} compartments. Interestingly, the inhibition elicited by Synta66 was similar in both compartments, indicating similar SOCE properties in the Rh123^{low} and Rh123^{high} populations (Figure S3).

2.2.3. ORAI Is Involved in AML Cell Line Proliferation and Cell Cycle Engagement

While it has been described that SOC inhibitors can induce proliferation defects in cancer cell lines [20], the involvement of SOC channels in AML cell proliferation remains largely unknown [8]. However, the role of $[Ca^{2+}]_i$ and associated signaling pathways in cell cycle engagement and/or proliferation of AML primary cells and cell lines has been investigated [8]. Using the SOC channel inhibitor Synta66, we observed a small but significant decrease in KG1 and U937 proliferation after a 24 h treatment compared with control cells (Figure 6a,b) without any significant cell death engagement. Similar to Synta66 application, siRNA against *ORAI1* also induced a decrease in proliferation in both AML cell lines (Figure 6c).

SOC inhibition by Synta66 or with the abolition of *ORAI1* expression (siRNA) did not induce any significant change in ABCB1 activity (% of Rh123^{low} cells) or the proportion of CD34 + CD38⁻ leukemic stem cells in either AML cell line (Table S3). We then stained the cells for Ki67/PI simultaneously with CD34 and CD38 surface markers to check cell cycle engagement, particularly the size of the LSC compartment, after treatment with Synta66. Interestingly, we observed a significant increase in the proportion of quiescent CD34 + CD38⁻ leukemic stem cells in the U937 cell line (Figure 6d). In the CD34 + CD38⁻ KG1 cell compartment, the number of Ki67-negative cells was decreased (Figure 6d) due to an accumulation in the G1 phase of the cell cycle (data not shown).

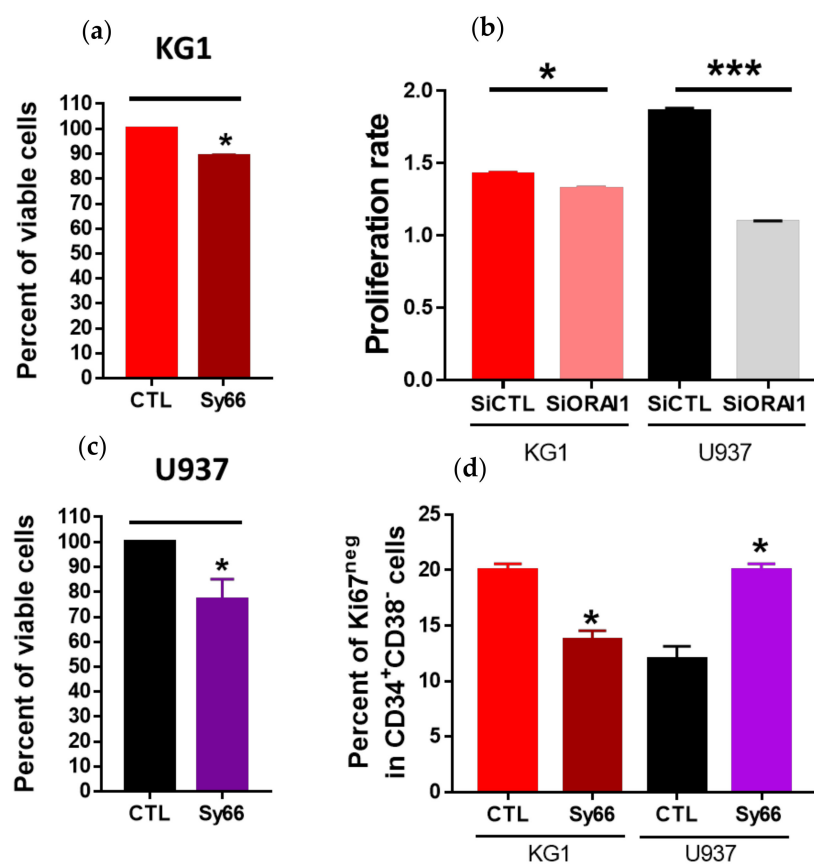


Figure 6. SOCs/ORAI1 are involved in proliferation of KG1 and U937 cells and in the quiescence state of LSC. KG1 (a) and U937 (c) viability (Trypan blue) under control conditions or after 24 h of treatment with synta66 (10 μ M). (b) Proliferation rate of KG1 and U937 cells transfected with control or ORAI1 siRNA. (d) Percentage of Ki67^{neg} cells in CD34⁺CD38⁻ LSCs treated or not treated for 24 h with synta66 (10 μ M). For each experiment, three independent experiments were performed. *** $p \leq 0.001$. * $p \leq 0.05$.

2.3. Cytarabine (Ara-C) Has an Impact on SOCE in AML Cell Lines and Primary Cells Depending on ABCB1 Activity, the LSC Proportion and/or Cell Cycle Engagement

We next evaluated the impact of cytarabine (Ara-C), a chemotherapeutic agent currently used in the treatment of AML, on KG1 and U937 cell lines and primary cells to determine the role and contribution of ABCB1 activity or LSC proportion in the response to this drug.

2.3.1. Effect of Ara-C on the AML Cell Cycle and LSC Proportion

As expected, a 24 h treatment with Ara-C inhibited U937 and KG1 cell proliferation in a dose-dependent manner. U937 cells were more sensitive to the treatment than KG1 cells, with the latter displaying higher ABCB1 activity and a higher proportion of LSCs (Figure S4). We also performed a cell cycle analysis by flow cytometry (Ki67/PI double staining) and observed that KG1 cells accumulated in the G1 phase ($46.2\% \pm 2.1$ vs. $65.8\% \pm 1.4$, CTL and 1 μ M Ara-C, respectively) with a slight increase in cell death ($2.6\% \pm 0.3$ vs. $6.3\% \pm 0.8$ of cells in subG1 with 1 μ M Ara-C) (Figure 7 and Figure S5). U937 cells showed a more significant increase in cell death than KG1 cells after cytarabine treatment ($16.9\% \pm 2.5$ of cells in subG1 at 1 μ M Ara-C compared to $6.3\% \pm 0.8$ for U937 and KG1, respectively). Moreover, we did not observe any change in the percentage of cells in the G0 phase of the cycle after treatment with Ara-C for either cell line (Figure 7 and Figure S5).

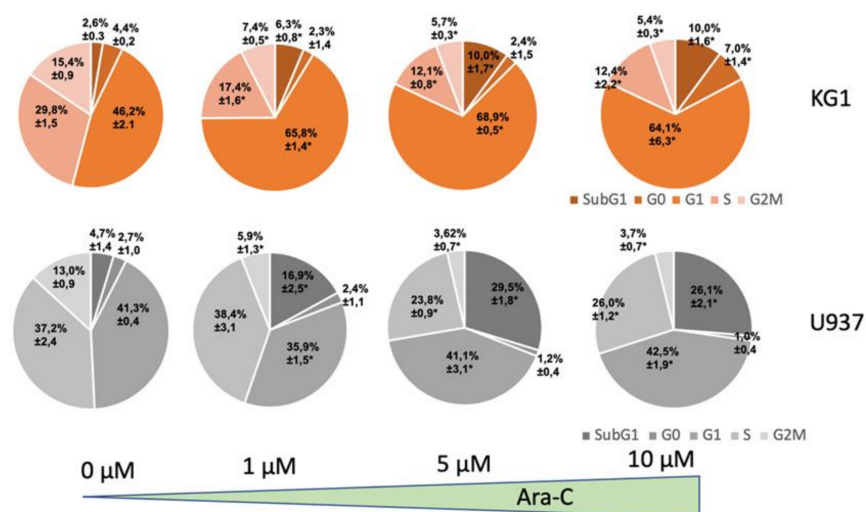


Figure 7. Effect of Ara-C on the KG1 and U937 cell cycle. Cell cycle analysis by flow cytometry of KG1 and U937 AML cell lines with KI67/PI double staining. Cells were either in a control condition or treated with Ara-C at the indicated concentrations for 24 h. Three independent experiments were performed. * $p \leq 0.05$.

Ara-C treatment increased the Rh123^{low} cells and decreased the Rh123^{high} cell compartments in a dose-dependent manner for U937 cells but not for KG1 cells (Table S5). However, the proportion of CD34+ CD38– KG1 cells increased in a dose-dependent manner with this treatment (Table S5). As expected, our cell cycle results (% of cells in SubG1) showed that cells undergoing cell death were cells with low ABCB1 activity (Rh123^{high}), while CD34+ CD38– and Rh123^{low} cells were more resistant to Ara-C.

2.3.2. Effect of Ara-C on SOCE in AML Leukemic Cells

The Effect of Ara-C on SOCE in AML Cell Lines Depends on ABCB1 Activity and the LSC Phenotype

Considering the difference in chemosensitivity and LSC compartment size between KG1 and U937 cells and the potential role of SOC activity in these features, our next goal was to functionally study the impact of Ara-C on SOCE in both cell lines according to ABCB1 activity. To assess SOCE in viable cells only, we measured SOCE by flow cytometry in cells treated or not with Ara-C and stained with a viability dye.

In the more chemoresistant KG1 Rh123^{low} cells (high ABCB1 activity), Ara-C exposure induced a slight increase in capacitative calcium entry in a dose-dependent manner, without any significant impact on the basal calcium level (Figure 8 and Figure S6). In contrast, the more chemosensitive U937 Rh123^{high} cells (low ABCB1 activity) displayed a marked decrease in SOCE with a slight increase in basal calcium levels after Ara-C treatment. Increased SOC activity could therefore be linked to resistance mechanisms mobilized by AML leukemic cells. Surprisingly, when we assessed SOC activity in the minority cell compartment among KG1 and U937 cells regarding the ABCB1 activity level (i.e., KG1 Rh123^{high} and U937 Rh123^{low} cells), these cells displayed either no change (KG1) or a decrease (U937) in SOCE following Ara-C treatment (Figure 8 and Figure S6).

We next evaluated *ORAI1* gene expression in KG1 and U937 cells following Ara-C exposure. We observed a significant increase in *ORAI1* expression in KG1 cells and a significant decrease in U937 cells (Figure 9), in agreement with the observed Ara-C functional effects on SOCE in both leukemia cell lines.

Because the calcineurin–NFAT signaling pathway is closely associated with SOCE and ORAI channels in several models, we next evaluated NFAT localization in both KG1 and U937 AML cell lines treated or not treated with Ara-C for 24 h. Under control conditions, NFAT was predominantly localized in KG1 cytoplasm and in U937 nuclei, as shown in Figure 9. After Ara-C exposure, KG1 exhibited a translocation of NFAT to the nucleus

(Figure 9). Conversely, U937 cells treated with Ara-C displayed a predominant cytoplasmic distribution of NFAT (Figure 9).

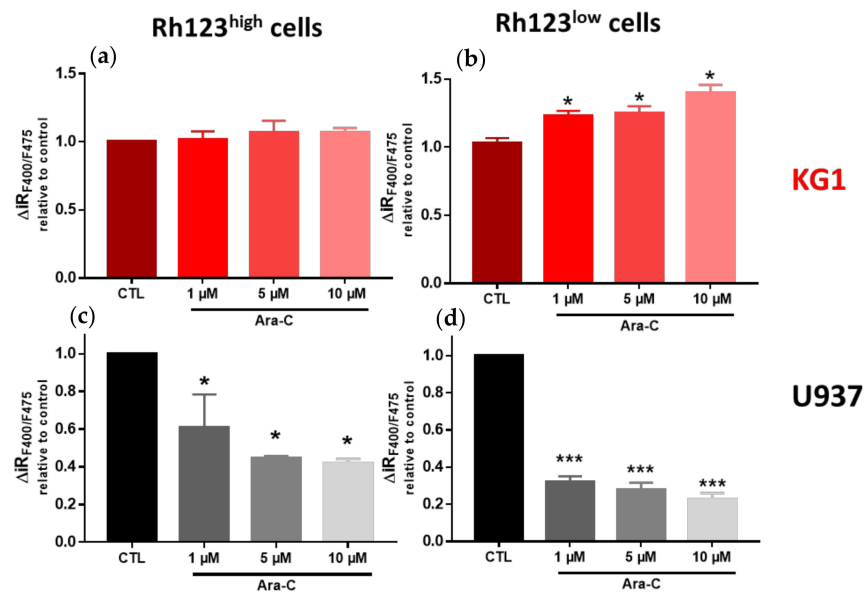


Figure 8. Effect of Ara-C on SOCE in Rh123^{high} and Rh123^{low} KG1 and U937 cell subpopulations. Cells were treated for 24 h with Ara-C at the indicated concentrations. For each condition, three independent experiments were performed. Flow cytometric analysis of the impact of Ara-C on SOC channel activity in the Rh123^{high} (a,c) and Rh123^{low} (b,d) KG1 and U937 cell subpopulations. The delta of the F400/F475 ratio reflects the capacitative Ca²⁺ entry in the Rh123^{high} and Rh123^{low} cell subpopulations. * $p \leq 0.05$; *** $p < 0.001$.

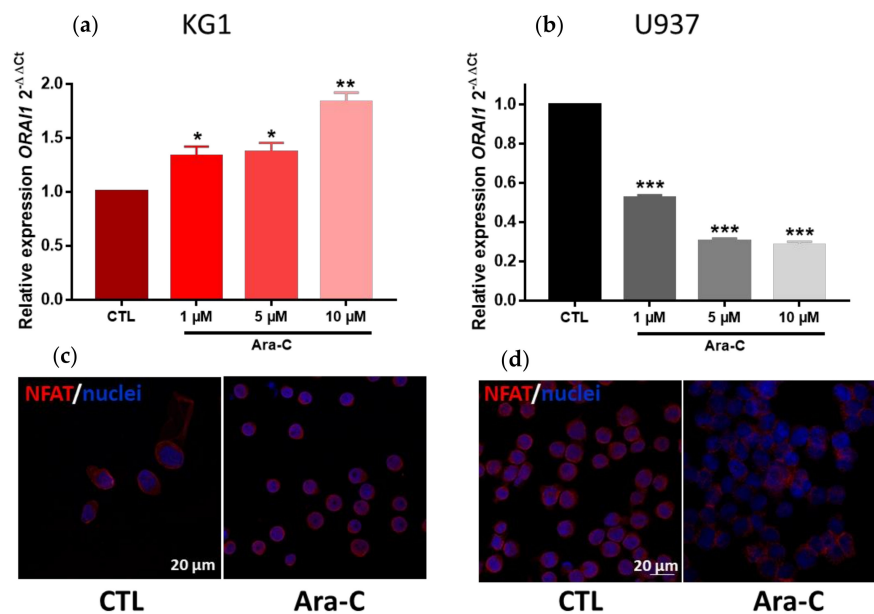


Figure 9. Effect of Ara-C on ORAI1 expression and NFAT localization. Relative expression of the calcium channel ORAI1 in KG1 (a) and U937 (b) leukemic cell lines. ORAI1 expression was analyzed by RT-qPCR. The relative expression ratio for ORAI1 was calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Confocal microscopy showing NFAT expression and localization (Alexa Fluor 488, red) and nuclei (Hoechst, blue) in control and Ara-C-treated (5 μM) KG1 (c) or U937 (d) cells. The scale bar is indicated.

Ara-C Affects SOCE in Primary AML Cells from Patients According to ABCB1 Activity and LSC Phenotype

We first performed a Rh123 exclusion assay and CD34 + CD38[−] immunophenotyping in AML primary cells from nine patients (Table S1) to screen their ABCB1 activity and LSC compartment proportion. We next evaluated the Ara-C effect on high ABCB1 activity and LSC-enriched AML primary cells (AML patient #1) compared with lower ABCB1 activity and poorly LSC-enriched AML cells (AML patient #2) (Table S6).

As expected, Ara-C exposure induced a slight decrease in AML#1 primary cell viability and a more pronounced decrease in AML#2 cells (Figure S7). Similarly, cell death was significantly higher in AML#2 Ara-C-treated cells than in AML#1 cells (48 vs. 20% of subG1, respectively) (Figure S7).

In the more chemoresistant and LSC-enriched AML#1 Rh123^{low} cells (high ABCB1 activity), Ara-C treatment provoked a slight increase in capacitive calcium entry (Figure 10). Conversely, the more chemosensitive AML#2 cells (low ABCB1 activity) displayed a significant decrease in SOCE subsequent to Ara-C treatment (Figure 10).

We then evaluated *ORAI1* gene expression in AML#1 and AML#2 primary cells following Ara-C exposure, and we observed, in agreement with the Ara-C effect on SOCE, a significant increase in AML#1 cells with high ABCB1 activity and a significant decrease in AML#2 primary cells (Figure 10).

Interestingly, we observed similar SOCE and *ORAI1* expression modulation in primary cells and KG1/U937 cell lines according to their respective ABCB1 activity, LSC status and differentiation stage.

To verify NFAT localization, we performed immunocytochemistry staining, and we observed results similar to those obtained with KG1 and U937 cell lines, namely, a predominant redistribution of NFAT in the nucleus of AML#1 cells and in the cytoplasm of AML#2 cells after Ara-C treatment, as shown in Figure S8.

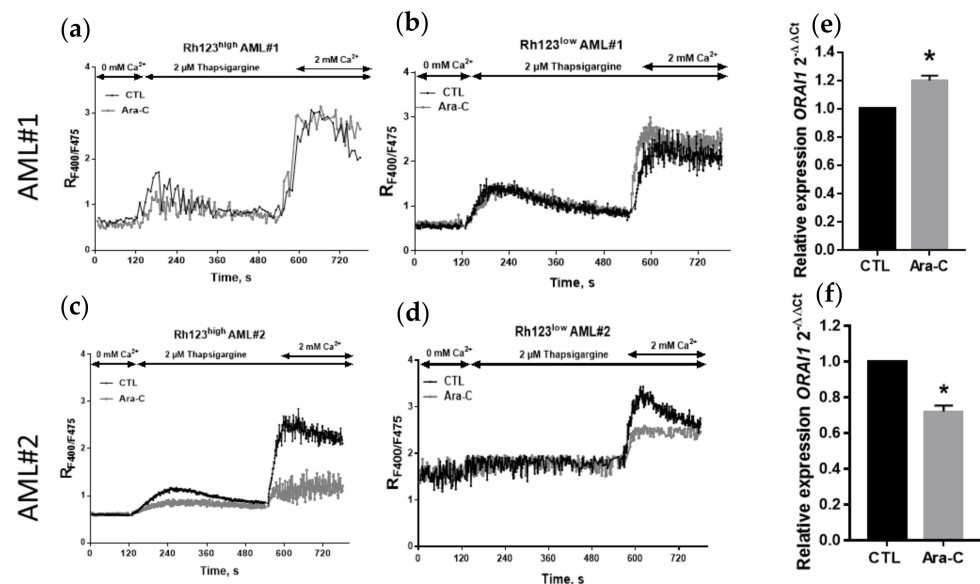


Figure 10. Effect of Ara-C on SOCE and *ORAI1* expression in AML#1 and AML#2 primary cells according to ABCB1 activity. Cells were treated or not for 24 h with 5 μ M Ara-C. Three independent experiments were performed. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ analyzed by flow cytometry (Indo-AM) upon SOC activation in AML#1 and AML#2 Rh123^{high} (a,d,c) and Rh123^{low} (b,d) primary cells. Each point represents the mean of 3 independent experiments including between 1000 and 10,000 cells. Relative expression of *ORAI1* in AML patient #1 and #2 cells (e,f). *ORAI1* expression was analyzed by RT-qPCR. The relative expression ratio was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. * $p < 0.05$.

3. Discussion

In this study, we present new data supporting that ORAI1 calcium channels mediate SOCE in human AML cell lines and primary cells from patients. We show that ORAI1/SOCE plays a role in AML cell proliferation and in G0–G1 cell cycle engagement according to the LSC phenotype. We also demonstrate a link between ORAI1 expression and/or activity and AML cell differentiation stage, ABCB1 activity and the LSC compartment. Furthermore, our data suggest that Ara-C treatment modulates SOCE in AML cell lines and primary cells via ORAI1 expression regulation. Using KG1 and U937 AML cell lines, two models with distinct ABCB1 activity and LSC compartment proportions, we observed opposite responses to Ara-C treatment with regard to ORAI1 expression and SOCE modulation. The more chemoresistant ABCB1^{high} and LSC-enriched KG1 AML cells displayed an increase in SOCE and ORAI1 expression following Ara-C treatment, while the chemosensitive ABCB1^{low} and poorly LSC-enriched U937 cells exhibited the opposite responses. Interestingly, we observed similar behaviors in primary AML cells obtained from patients at the time of diagnosis and presenting the same opposite features.

We have previously shown the clinical significance of ABCB1 in a cohort of patients with *de novo* AML and highlighted the link between ABCB1 expression and activity with LSC gene expression and risk stratification [2]. However, ABCB1 was not directly linked to drug resistance, prompting us to propose a bystander effect of these particular MDRs in chemoresistance mechanisms. Interestingly, in this study, we present new data obtained from public datasets [12], corresponding to the RNA-Seq analyses of a cohort of 439 AML patients at diagnosis, linking high ABCB1 expression and low ORAI1 expression with (i) an undifferentiated stage of AML, (ii) a lower expression of CDK4 and CDK6 (i.e., G0–G1 transition phase regulators), (iii) a higher expression of genes related to the LSC phenotype and (iv) an overall worse prognosis of the disease. In addition, we analyzed the genetic phenotypes associated to the different ABCB1 and ORAI1 expression levels. We observed in the ABCB1^{high} group a significant increase in AML subgroups bearing RUNX1, TP53 and GATA2 mutations, and a decrease in AML patients presenting NPM1 and FLT3-ITD mutations. In the ORAI1^{low} group, NPM1 and FLT3-ITD mutations were seldom observed, while AML bearing the RUNX1 mutation was over-represented. These observations were in agreement with ELN 2017 risk stratification: FLT3-ITD and NPM1 mutations are associated with good prognosis, while TP53, GATA2 and RUNX1 are correlated with an adverse risk.

We functionally confirmed these observations not only in the two representative AML cell lines KG1 and U937 but also in primary cells (AML#1 and AML#2) isolated from leukemia patients at the time of diagnosis based on their expression levels of ABCB1 and LSC-associated markers. In agreement with our results obtained by screening a public dataset, the slow-cycling immature KG1 AML and AML#1 primary cells displayed high ABCB1 activity and an enrichment of their LSC compartment while underexpressing ORAI1. In contrast, fast-cycling differentiated U937 and AML#2 primary cells exhibited lower ABCB1 activity and a discrete number of LSCs while overexpressing ORAI1.

More precisely, we identified two distinct cell subpopulations among KG1 and U937 cells in regard to ABCB1 activity, namely, the Rh123^{low} and Rh123^{high} populations. The Rh123^{low} cell compartment in each cell line shared common characteristics regarding ABCB1 activity and the LSC phenotype characterized herein by expression markers (e.g., SOX2, KLF4, NANOG), surface markers (CD34 + CD38-) and Ki67 expression levels. Interestingly, we observed that ORAI1 expression was downregulated in Rh123^{low} cells compared with their Rh123^{high} counterparts. Emerging roles of Ca²⁺ in cancer stem cell (CSC) population maintenance and stemness have been reported, and some studies have proposed a link between ORAI1 and the regulation of the CSC compartment [21]. For instance, it has been shown that ORAI1 and SOCE, through NFAT activation, promote stemness in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. Specifically, the ALDH^{high} CSC population expressed more ORAI1 proteins, and a study showed that ectopic expression of ORAI1 in nontumorigenic immortalized oral epithelial cells resulted in increased proliferation, self-renewal, and tumor-initiating capacities [22]. These data therefore con-

tradict our observations in the Rh123^{low} population, which was enriched in LSCs and expressed less ORAI1. However, similar to our results, it has been reported that SOCE inhibition triggers glioblastoma stem cells to adopt a quiescent state, suggesting that the transition from proliferation to quiescence involves the remodeling of Ca²⁺ signaling [23]. In our study, while the proportion of LSCs was not altered by SOCE modulation through ORAI1 silencing, LSCs were more engaged in quiescence in U937 CD34 + CD38[−] LSC stem cells. In hematopoietic stem cells (HSCs), two elegant studies on how intracellular calcium levels dictate cell fate (i.e., quiescence or cycling state) have shown opposite results [8]. Bonora et al. demonstrated an increase in the intracellular Ca²⁺ concentration during the switch from the G0 to G1 state and that cycling HSCs display active NFAT and TET2 degradation [24]. Conversely, Fukushima et al. proposed that the intracellular Ca²⁺ concentration decreases during the G0 to G1 transition, leading to an increase in CDK4/6 activity, and that the calmodulin (CaM)/CaM kinase (CaMK) pathway is involved in HSC quiescence [25]. These apparently contradictory results could be explained by the difficulty in discriminating between different stages of “activation” of normal and cancer stem cells. In addition, symmetric and asymmetric CSC divisions could also increase the level of complexity to understand the regulation of CSCs/LSCs by calcium signaling. Combined with the heterogeneity of responses observed in different organs and tissues, these reports emphasize the need to better understand calcium remodeling during the transition between the different activation stages of LSCs.

While alterations in calcium signaling have been extensively studied in solid cancers, only a few studies have explored the dysregulation of calcium-dependent signaling pathways in AML, and none have investigated calcium-dependent resistance mechanisms [8]. Regarding the molecular nature of SOCE in AML, to our knowledge, only one study has proposed that ORAI1 and ORAI2 mediate SOCE in the HL60 AML cell line while demonstrating their role in proliferation and migration [26]. In the present study, we are the first group to provide evidence of the involvement of ORAI1 in AML cell lines and in primary cells according to the AML differentiation state, ABCB1 activity and LSC compartment. Moreover, our results reveal the upregulation of ORAI1 and SOCE in chemoresistant ABCB1^{high} KG1 AML cells and in ABCB1^{high} AML primary cells after Ara-C exposure. However, Ara-C had the opposite effect in chemosensitive ABCB1^{low} U937 cells and ABCB1^{low} AML primary cells by inducing the downregulation of ORAI1 and SOCE. Several hypotheses can be formulated to explain these apparently contradictory results. First, the cell cycle engagement state of the two Rh123^{low} cell compartments from the KG1 and U937 cell lines is different. As previously mentioned, we observed a marked difference between the proportions of quiescent Ki67-negative cells, which were more pronounced in the U937 Rh123^{low} population, while the number of slow-cycling cells (Ki67^{low}) was increased in KG1 Rh123^{low} cells. The difference in proportion in “true” quiescent G0 cells could explain the different behaviors in regard to SOCE modulation in response to Ara-C treatment. Moreover, the difference in basal ORAI1 expression levels between the two cell lines (significantly lower in KG1 than in U937 cells) may also explain the opposite response to Ara-C exposure regarding SOCE modulation. Nevertheless, further investigations are needed to better understand these differences between the two cell lines.

In a recent work, Borella et al. showed that lercanidipine, a CaV1.2 calcium channel inhibitor, combined with the chemotherapeutic agent Ara-C significantly decreased AML growth in a preclinical model, and that this effect was far more robust than when each molecule was applied separately [27]. These data emphasize the possible clinical value of calcium channel inhibition to increase AML chemosensitivity. However, based on our results, the basal level of ORAI1 channel expression, LSC size compartment, G0 quiescent state and ABCB1 activity could represent additional mechanisms of chemoresistance in AML that should also be considered when studying this issue.

The data presented herein clearly demonstrate that ORAI1 is expressed in both AML cell lines and in primary cells isolated from AML patients. We have shown the overexpression of ORAI1 in these leukemic cells compared with normal primary cells (PBMCs)

isolated from healthy patients. These results suggest that AML cells, through ORAI1 up-regulation, may acquire additional characteristics, such as apoptosis resistance. Previous studies have reported contradictory roles for SOCE and ORAI1 in apoptosis regulation. While it has been shown that SOCE and ORAI1 contribute to apoptosis induction by diverse stress-associated stimuli [6,28], other studies have demonstrated their prosurvival and antiapoptotic roles [29]. Our results in AML cells are, however, similar to our previous observations in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells, where ORAI1 also mediates SOCE and exhibits prosurvival and antiapoptotic roles in cell lines exposed to chemotherapy drugs. In this study on PDAC, we also demonstrated that drugs used in clinics (5-FU, gemcitabine) increase SOCE via the upregulation of ORAI1 and STIM1 [5]. Our data therefore show that in these two cancer models (i.e., AML and PDAC), the ORAI1 expression level is significantly higher than that in “normal” cells and is modified when cells are exposed to chemotherapy drugs.

It has been suggested that calcium channels display functional specificity in the activation of Ca^{2+} -dependent transcription factors and the induction of gene expression. In this context, numerous studies have associated ORAI1-mediated Ca^{2+} entry with NFAT nuclear translocation and NFAT-dependent gene expression [30]. The precise role of NFAT in AML is still poorly documented. Nevertheless, it has been shown that the differentiation status of AMLs could impact NFAT expression levels [9]. A study on leukemic blasts isolated from AML patients was performed to determine the expression level (RNA-Seq) of NFAT isoforms according to differentiation status (FAB classification). NFATc2/c3 isoforms were found to be overexpressed at the early stage of differentiation. Moreover, it has been shown that NFAT inhibition increases the sensitivity to chemotherapy of primary AML leukemic blasts with an FL3-ITD mutation [11]. Interestingly, NFAT overexpression was observed in AML primary cells from patients during relapse compared with samples at the diagnostic stage [9]. While these data point to a possible role of NFAT in AML chemoresistance and AML progression, a majority of these studies only described NFAT gene expression without examining NFAT protein levels and intracellular distribution. In our study, ABCB1^{high} and LSC-enriched chemoresistant cells (KG1 and AML#1 cells) displayed a preferential cytoplasmic localization of NFAT, while the ABCB1^{low} and LSC-enriched chemosensitive cells (U937 and AML#2 cells) presented a mostly nuclear distribution. Interestingly, Ara-C exposure induced NFAT translocation to the nucleus in ABCB1^{high} cells and cytoplasmic redistribution in ABCB1^{low} cells. These observations are in perfect agreement with the effect of Ara-C on SOCE in these cells, thus strongly suggesting a close functional link between SOCE activity and NFAT regulation in AML cells.

There is growing evidence that NFAT signaling cooperates with mutations of the Fms-related tyrosine kinase receptor 3 (FLT3) receptor in AML. Internal tandem duplication of the FLT3 receptor (FLT3ITD) is present in approximately 25% of AML cases and confers particularly poor outcomes for patients compared with other AML subtypes [31]. While NFAT was found to negatively regulate genes that control cell cycle entry, such as Cdk4 and Cdk6, in normal myeloid cells, this activity was dependent on Flt3 ligand (Flt3-L) signaling and phospholipase PLC γ 1-dependent calcium influx. Understanding the relationship between FLT3-L and NFAT activity could therefore be of utmost interest within the context of leukemia. Further investigations are thus required to better characterize the contribution of NFAT to the proliferation and quiescence of leukemic cells and LSCs and its possible role in chemoresistance.

In summary, our study presents for the first time the contribution of ORAI1, SOCE and the associated NFAT transcription factor in human AML cell lines and primary cells according to ABCB1 activity, LSC compartment and Ara-C chemoresistance. Further studies are needed to better understand the precise contribution of the ORAI1/SOCE/NFAT axis to LSC/leukemic cell cycle engagement and the specific mechanisms of apoptosis regulation by SOCE and ORAI1 to potentially reveal novel strategies targeting these proteins and improving current AML treatment efficiency.

4. Materials and Methods

Cell culture. KG1 and U937 cell lines were purchased from the ATCC® (CCL-246™ and CRL-1593.2™, respectively). These cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 1% penicillin streptomycin antibiotic cocktail (Gibco) and fetal bovine serum (FBS) (Gibco) at different concentrations according to the cell line needs (20 and 10% FBS for the KG1 and U937 cell lines, respectively). Cells were treated at the indicated concentrations with Ara-C (provided by Lille Hospital) or Synta66 (Sigma–Aldrich, Burlington, MA, USA).

Patient samples. Healthy and AML patient blood samples were processed as previously described [32] to collect peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Briefly, blood was first diluted in PBS (Gibco) and then gently added to human Pancoll solution (Pan Biotech, Aidenbach, Germany). After centrifugation, PBMCs were collected and used for experiments or frozen in 90% SVF and 10% DMSO solution in liquid nitrogen until use. After thawing, the cells were treated with DNase (Qiagen, Germantown, MD, USA) at a final concentration of 50 µg/mL and in RPMI supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic cocktail.

Rhodamine 123 (Rh123) exclusion assay, ABCB1 activity. The Rh123 exclusion assay was performed as previously described [19]. Briefly, cells were adjusted to a concentration of 10⁶ per milliliter and loaded with 0.1 µg/mL Rh123 (Sigma–Aldrich, lex 488 nm and λem 531 nm) in RPMI 1640 medium for 20 min at 37 °C in the dark for probe inclusion. After removing Rh123 from the medium, an exclusion step was performed at 37 °C for an additional 60 min. A positive control (cells with maximal Rh123 intensity) was obtained by keeping cells on ice or treating them with 0.1 µM verapamil (Sigma) to prevent Rh123 exclusion. Debris and cell doublets were excluded from the analysis, and cells were gated according to the positive control presenting the highest fluorescence intensity level. Cells with fluorescence intensity equal to the positive control were considered Rh123^{high} (lowest ABCB1 activity). Cells with the lowest Rh123 intensity were considered Rh123^{low} (highest ABCB1 activity). Acquisition was performed on an LSR-Fortessa X20 flow cytometer (BD Biosciences, Haryana, India).

Calcium influx assay by flow cytometry. Cells were loaded with the ratiometric dye indo-1-AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as a Ca²⁺ indicator. One million cells per milliliter were loaded with 0.7 µM indo-1-AM in the corresponding medium for 30 min at 37 °C in the dark and then washed. The evolution of the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) was measured every 5 s as the F400 nm/F475 nm (RF400/F475) ratio of fluorescence with a flow cytometer UV light. Baseline [Ca²⁺]_i was acquired in a 0 mM Ca²⁺ solution containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM glucose, and 10 mM HEPES (pH 7.4). After 120 s, the cells were treated with 1 µM of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) inhibitor thapsigargin (Focus Biomolecules). After 420 s of treatment with thapsigargin, a Ca²⁺-containing solution was added to the cells (final [Ca²⁺]_e 2 mM). Fluorescence was monitored with an LSR-Fortessa X20 flow cytometer, and median fluorescence values (*n* = 1000–10,000 cells for each time point) were extracted for further analysis. The Ca²⁺ release ($\Delta rRF400/F475$) and capacitative calcium entry (also noted SOCE for store-operated calcium entry) ($\Delta iRF400/F475$) were calculated as previously described [20]. Graphs were plotted using GraphPad Prism software.

Immunophenotyping. After rinsing, the cells were stained with fluorochrome-conjugated antibodies (all from Biolegend, San Diego, CA, USA) for 30 min at room temperature (RT) in PBS with 10% SVF. Antibodies were used at a 1:100 dilution (except for the PE-Cy7-conjugated CD33 antibody used at a 1.25:1000 dilution), and matching isotype antibodies were used at the same final concentration. Then, the cells were rinsed and resuspended in PBS before being analyzed by flow cytometry. Compensation beads (Invitrogen) were used to establish a matrix of compensation. Gating was determined based on negative control cell staining with corresponding isotype antibodies. Depending on the protocol, two panels of antibodies were used. If combined with Rh123 exclusion and calcium

influx assays, allophycocyanin (APC)-conjugated CD34 and phycoerythrin (PE)-conjugated CD38 antibodies were used. If combined with the calcium influx and cell viability assays, APC-conjugated CD34, PE-conjugated TIM3, PE-Cy7-conjugated CD33 and Brilliant Violet 421 (BV421)-conjugated CD38 antibodies were used. To assess their viability, cells were loaded with a DyeTM 750/777 Fixable Viability Staining Kit for 30 min at RT and protected from light.

Proliferation assay. Proliferation status was determined by nuclear Ki67 protein staining with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Ki67 antibody (Abcam, Cambridge, UK). Cells were first fixed with a 4% paraformaldehyde solution (Sigma–Aldrich) for 10 min at RT and then washed and incubated for 30 min at RT with 0.1% Triton X100 (Sigma–Aldrich) and 10% SVF solution supplemented with PBS. After washing, the cells were incubated with APC-conjugated CD34, BV421-conjugated CD38, PE-Cy7-conjugated CD33, PE-conjugated TIM3 antibodies (all from Biolegend) and FITC-conjugated Ki67 antibody (Abcam) in 0.1% Triton X100 and 10% SVF solution in PBS for 30 min at 4 °C in the dark. Cells were stained with the antibodies used at a 1:100 dilution (except for the PE-Cy7-conjugated CD33 used at a 1.25:100 dilution) or with matching isotypes at the same final concentration. Cells were then placed on ice before flow cytometry analysis.

Cell cycle analysis. Cells were adjusted to a concentration of 10^6 per milliliter to be fixed and permeabilized with 70% ethanol (Sigma) for 30 min at -20 °C. Cells were stained for 30 min at RT in the dark with 50 µg/mL propidium iodide (Sigma–Aldrich) and 5 µg/mL RNase (Qiagen) in PBS. To determine the percentage of cells in the G0 phase of the cell cycle, cells were preincubated with the FITC-conjugated Ki67 antibody (Abcam) at a 1:100 dilution or with matching isotype at the same final concentration in PBS with 10% SVF for 30 min at 4 °C in the dark. Then, the cells were kept on ice until analysis by flow cytometry.

Cell sorting. Subsequently, for the Rh123 exclusion assay, U937 and KG1 cells were washed and resuspended to a concentration of 5×10^6 cells per milliliter in culture cell medium without phenol red and 1% SVF (Sigma–Aldrich). Rh123^{low} and Rh123^{high} cells were sorted on a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences). Gating was determined based on the positive control loaded with the Rh123 probe without the exclusion step. After sorting, the cells were kept at 37 °C before being used in further experiments.

Flow cytometry data analysis. Data were analyzed using FlowJo software (TreeStar). Live cells were discriminated from dead cells using a viability probe (DyeTM 750/777). Cell subpopulations were discriminated according to their rhodamine exclusion and/or cell-surface marker expression. Calcium mobilization was analyzed in the different gated subpopulations.

Immunocytochemistry. Cells were immobilized on 0.01% poly-lysine (Sigma–Aldrich)-coated coverslips at a concentration of 10^6 cells per coverslip for 10 min (or 24 h if treated) at 37 °C before being fixed with a 4% PAF solution (Sigma–Aldrich) for 10 min at RT. After washing, the cells were treated with a 0.1% Triton X-100 saturation/permeabilization solution for 10 min at RT. PBS-Tween (0.1% of Tween in PBS, Merck) was used to wash the cells for 5 min before incubating them in blocking buffer (1% BSA in PBS, Sigma–Aldrich) for 60 min at RT. Primary polyclonal rabbit anti-human NFAT antibody (1:100 dilution, Abcam) was directly added to the blocking buffer for 60 min at RT. After washing with PBS-T, FITC-conjugated Ki67 (1:100 dilution, Abcam) and Alexa Fluor 568 donkey anti-rabbit secondary antibody (1:2000 dilution, Invitrogen, Waltham, MA, USA) were subsequently added for another 60 min at RT. Negative controls were performed by replacing the primary antibody and fluorochrome-conjugated antibody with irrelevant antibodies of the same isotype. To visualize nuclei, 10 µg/mL Hoechst (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added for 10 min at RT. The coverslips were mounted on microscope slides with Fluoroshield mounting medium (Abcam). For confocal microscopy, cell images were obtained using a confocal laser scanning microscope (LSM 700, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) with a Plan Apochromat 40×/1.3 numerical aperture oil immersion objective (Hoechst,

Frankfurt, Germany, λ_{ex} 343 nm, λ_{em} 483 nm, NFAT λ_{ex} 568 nm, λ_{em} 605 nm and Ki67 λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 532 nm). Images were analyzed with Zeiss LSM Image Browser software.

siRNA-mediated gene knockdown. To evaluate the role of the ORAI1 calcium channel in SOCE, five million KG1 or U937 cells were transfected by electroporation in transfection buffer (LONZA Amaxa[®] Cell Line Nucleofactor[™] Kit V, Basel, Switzerland) with 100 nM control or ORAI1-specific siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) to downregulate ORAI1 expression. After passing the cells through the Amaxa Nucleofactor[™] II electroporator, they were cultured in 6-well plates. Forty-eight hours post-transfection, the cells were collected, and *ORAI1* expression was assessed by qRT-PCR. The gene silencing efficiency was approximately 90% and 95% for KG1 and U937 cell lines, respectively (Figure S9).

RNA Extraction, qRT-PCR. RNA extraction was performed following the manufacturer's protocol (Qiagen RNeasy Mini Kit). RNA was transcribed into cDNA using random hexamers and the High Capacity Reverse Transcription kit from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). All qRT-PCRs were performed using TaqMan fluorescent probes (human *ORAI1*, *MMRN1*, *LAPTM4B*, *NYNRIN*, *KLF4*, *SOX2*, *NANOG*, *DNMT3B*, *ABCB1* and *BETA-2 MICROGLOBULIN* or *B2M*) provided by Applied Biosystems, Bedford, MA, USA. Duplex qPCR was performed, and discrimination of the genes of interest from the reference gene was allowed owing to 2 distinct fluorophore dyes, FAM and VIC probes for the genes of interest and the reference gene, respectively. The relative expression ratio for each gene was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The calculated values represent the expression level for each gene relative to the expression of *B2M*, which was used as the endogenous control. No expression denotes no detection in 50 ng of cDNA.

Analysis of public datasets. RNA-seq datasets of human AML samples at diagnosis ($n = 439$) [12] are available in the public domain (<https://www.cbioportal.org>, accessed on 15 March 2022). The RNA-seq expression unit used was counts per million reads mapped (CPM). Raw data were extracted and analyzed as previously described [13,14].

Statistical analyses. All results are expressed as the means \pm SEM of at least 3 independent experiments with 3 replicates each. For public dataset analysis, the number of patient samples is indicated. Comparisons between means were assessed using the Student's *t* test for unpaired data or one-way ANOVA. For the Student's *t* test, if unequal variance was observed, then Welch's correction was applied. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant. Asterisks denote * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 and *** *p* < 0.001. The leukemic stem cell (LSC) score was determined as described previously [15].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23105555/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, L.L. and Y.T.; methodology, C.L., A.G., S.T., F.A.S., O.L., N.J., V.F. and M.-O.L.; software, C.L., A.G. and S.T.; validation, C.L. and A.G.; formal analysis, C.L., A.G., S.T. and Y.T.; resources, C.B., T.I., M.C.T., P.P., A.B. and M.C.; writing—original draft preparation, C.L., L.L. and Y.T.; writing—review and editing, B.Q., L.L. and Y.T.; visualization, C.L. and Y.T.; supervision, B.Q., L.L. and Y.T.; project administration, Y.T.; funding acquisition, L.L., B.Q. and Y.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from Contrat de Plan Etat-Région CPER Cancer 2015–2020, INSERM, CNRS, Ligue contre le cancer (Septentrion), Ligue nationale contre le cancer, Fondation ARC, the University of Lille and the Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL). C.L. and M.-O.L. are financed by Lille Hospital and by the Hauts de France Region. F.A.S. is financed by the Institut de Recherche sur Le Cancer de Lille (IRCL).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Etablissement Français du Sang (EFS), Lille Hospital, Tumorothèque C2RC (protocol code: CSTMT079 and PLER/2021/005, date of approval, 01 January 2022), Oregon Health & Science University (OHSU), University of Utah, University of Texas Medical Center (UT Southwestern), Stanford University,

University of Miami, University of Colorado, University of Florida, National Institutes of Health (NIH), Fox Chase Cancer Center and University of Kansas (KUMC). Samples from public datasets [12] were sent to the coordinating center (OHSU; IRB#9570; #4422; NCT01728402; date of approval 18 February 2022).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: Data are available in a publicly accessible repository that does not issue DOIs. Publicly available datasets were analyzed in this study. These data can be found here: <https://www.cbioportal.org>, accessed on 15 March 2022.

Acknowledgments: We would also like to thank Emilie Floquet and Pascaline Segard for their technical assistance.

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

References

- Döhner, H.; Estey, E.; Grimwade, D.; Amadori, S.; Appelbaum, F.R.; Büchner, T.; Dombret, H.; Ebert, B.L.; Fenaux, P.; Larson, R.A.; et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **2017**, *129*, 424–447. [CrossRef] [PubMed]
- Boyer, T.; Gonzales, F.; Barthélémy, A.; Marceau-Renaut, A.; Peyrouze, P.; Guihard, S.; Lepelley, P.; Plesa, A.; Nibourel, O.; Delattre, C.; et al. Clinical Significance of ABCB1 in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Study. *Cancers* **2019**, *11*, 1323. [CrossRef] [PubMed]
- Patergnani, S.; Danese, A.; Bouhamida, E.; Aguiari, G.; Previati, M.; Pinton, P.; Giorgi, C. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8323. [CrossRef] [PubMed]
- Park, C.Y.; Hoover, P.J.; Mullins, F.M.; Bachhawat, P.; Covington, E.D.; Raunser, S.; Walz, T.; Garcia, K.C.; Dolmetsch, R.E.; Lewis, R.S. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* **2009**, *136*, 876–890. [CrossRef]
- Kondratska, K.; Kondratskyi, A.; Yassine, M.; Lemonnier, L.; Lepage, G.; Morabito, A.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2263–2269. [CrossRef]
- Flourakis, M.; Lehen'kyi, V.; Beck, B.; Raphaël, M.; Vandenberghe, M.; Abeele, F.V.; Roudbaraki, M.; Lepage, G.; Mauroy, B.; Romanin, C.; et al. Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e75. [CrossRef]
- Chalmers, S.B.; Monteith, G.R. ORAI channels and cancer. *Cell Calcium* **2018**, *74*, 160–167. [CrossRef]
- Lewuillon, C.; Laguillaumie, M.O.; Quesnel, B.; Idziorek, T.; Touil, Y.; Lemonnier, L. Put in a “Ca(2+)II” to Acute Myeloid Leukemia. *Cells* **2022**, *11*, 543. [CrossRef] [PubMed]
- Patterson, S.D.; Huang, X.; Jørgensen, H.G.; Michie, A.M. Transcriptional Regulation by the NFAT Family in Acute Myeloid Leukaemia. *Hemato* **2021**, *2*, 556–571. [CrossRef]
- Li, S.; Garrett-Bakelman, F.E.; Chung, S.S.; Sanders, M.A.; Hricik, T.; Rapaport, F.; Patel, J.; Dillon, R.; Vijay, P.; Brown, A.L.; et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 792–799. [CrossRef]
- Metzelder, S.K.; Michel, C.; von Bonin, M.; Rehberger, M.; Hessmann, E.; Inselmann, S.; Solovey, M.; Wang, Y.; Sohlbach, K.; Brendel, C.; et al. NFATc1 as a therapeutic target in FLT3-ITD-positive AML. *Leukemia* **2015**, *29*, 1470–1477. [CrossRef] [PubMed]
- Tyner, J.W.; Tognon, C.E.; Bottomly, D.; Wilmot, B.; Kurtz, S.E.; Savage, S.L.; Long, N.; Schultz, A.R.; Traer, E.; Abel, M.; et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature* **2018**, *562*, 526–531. [CrossRef] [PubMed]
- Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [CrossRef] [PubMed]
- Gao, J.; Aksoy, B.A.; Dogrusoz, U.; Dresdner, G.; Gross, B.; Sumer, S.O.; Sun, Y.; Jacobsen, A.; Sinha, R.; Larsson, E.; et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal* **2013**, *6*, p11. [CrossRef]
- Ng, S.W.; Mitchell, A.; Kennedy, J.A.; Chen, W.C.; McLeod, J.; Ibrahimova, N.; Arruda, A.; Popescu, A.; Gupta, V.; Schimmer, A.D.; et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* **2016**, *540*, 433–437. [CrossRef]
- Huang, S.D.; Yuan, Y.; Tang, H.; Liu, X.H.; Fu, C.G.; Cheng, H.Z.; Bi, J.W.; Yu, Y.W.; Gong, D.J.; Zhang, W.; et al. Tumor cells positive and negative for the common cancer stem cell markers are capable of initiating tumor growth and generating both progenies. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54579. [CrossRef]
- Nakano, A.; Tsuji, D.; Miki, H.; Cui, Q.; El Sayed, S.M.; Ikegame, A.; Oda, A.; Amou, H.; Nakamura, S.; Harada, T.; et al. Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27222. [CrossRef]

18. Touil, Y.; Segauola, Z.; Thuru, X.; Galiègue-Zouitina, S.; Tierny, D.; Quesnel, B. Aggressiveness Potential of Spontaneous Canine Mucosal Melanoma Can Dictate Distinct Cancer Stem Cell Compartment Behaviors in Regard to Their Initial Size and Expansion Abilities. *Stem Cells Dev.* **2020**, *29*, 919–928. [[CrossRef](#)]
19. Touil, Y.; Zuliani, T.; Wolowczuk, I.; Kuranda, K.; Prochazkova, J.; Andrieux, J.; Le Roy, H.; Mortier, L.; Vandomme, J.; Jouy, N.; et al. The PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low-Rhodamine123-retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity. *Stem Cells* **2013**, *31*, 641–651. [[CrossRef](#)]
20. Dubois, C.; Kondratska, K.; Kondratskyi, A.; Morabito, A.; Mesilmany, L.; Farfariello, V.; Toillon, R.A.; Ziental Gelus, N.; Laurence, E.; Vanden Abeele, F.; et al. ORAI3 silencing alters cell proliferation and promotes mitotic catastrophe and apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Biochim. Et Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **2021**, *1868*, 119023. [[CrossRef](#)]
21. Terrié, E.; Coronas, V.; Constantin, B. Role of the calcium toolkit in cancer stem cells. *Cell Calcium* **2019**, *80*, 141–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lee, S.H.; Rigas, N.K.; Lee, C.R.; Bang, A.; Srikanth, S.; Gwack, Y.; Kang, M.K.; Kim, R.H.; Park, N.H.; Shin, K.H. Orai1 promotes tumor progression by enhancing cancer stemness via NFAT signaling in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43239–43255.e4147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Aulestia, F.J.; Néant, I.; Dong, J.; Haiech, J.; Kilhoffer, M.C.; Moreau, M.; Leclerc, C. Quiescence status of glioblastoma stem-like cells involves remodelling of Ca(2+) signalling and mitochondrial shape. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bonora, M.; Kahsay, A.; Pinton, P. Mitochondrial calcium homeostasis in hematopoietic stem cell: Molecular regulation of quiescence, function, and differentiation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2021**, *362*, 111–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fukushima, T.; Tanaka, Y.; Hamey, F.K.; Chang, C.H.; Oki, T.; Asada, S.; Hayashi, Y.; Fujino, T.; Yonezawa, T.; Takeda, R.; et al. Discrimination of Dormant and Active Hematopoietic Stem Cells by G(0) Marker Reveals Dormancy Regulation by Cytoplasmic Calcium. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 4144–4158. [[CrossRef](#)]
26. Diez-Bello, R.; Jardin, I.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation. *Biochim. Et Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 1064–1070. [[CrossRef](#)]
27. Borella, G.; Da Ros, A.; Borile, G.; Porcù, E.; Tregnago, C.; Benetton, M.; Marchetti, A.; Bisio, V.; Montini, B.; Michielotto, B.; et al. Targeting the plasticity of mesenchymal stromal cells to reroute the course of acute myeloid leukemia. *Blood* **2021**, *138*, 557–570. [[CrossRef](#)]
28. Bachas, C.; Schuurhuis, G.J.; Assaraf, Y.G.; Kwidama, Z.J.; Kelder, A.; Wouters, F.; Snel, A.N.; Kaspers, G.J.; Cloos, J. The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse. *Leukemia* **2012**, *26*, 1313–1320. [[CrossRef](#)]
29. Liu, H.; Hughes, J.D.; Rollins, S.; Chen, B.; Perkins, E. Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* **2011**, *91*, 753–760. [[CrossRef](#)]
30. Kar, P.; Samanta, K.; Kramer, H.; Morris, O.; Bakowski, D.; Parekh, A.B. Dynamic assembly of a membrane signaling complex enables selective activation of NFAT by Orai1. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, 1361–1368. [[CrossRef](#)]
31. Lagunas-Rangel, F.A.; Chávez-Valencia, V. FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia. *Med. Oncol.* **2017**, *34*, 114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Boyer, T.; Gonzales, F.; Plesa, A.; Peyrouze, P.; Barthelemy, A.; Guihard, S.; Quesnel, B.; Roumier, C.; Preudhomme, C.; Cheok, M. Flow Cytometry to Estimate Leukemia Stem Cells in Primary Acute Myeloid Leukemia and in Patient-derived-xenografts, at Diagnosis and Follow Up. *J. Vis. Exp. JoVE* **2018**, *26*, 56976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abravanel DL, Belka GK, Pan TC, Pant DK, Collins MA, Sterner CJ, Chodosh LA. Notch promotes recurrence of dormant tumor cells following HER2/neu-targeted therapy. *J Clin Invest*. 2015 Jun;125(6):2484-96. doi: 10.1172/JCI74883. PMID: 25961456; PMCID: PMC4497740.

Adam AP, George A, Schewe D, Bragado P, Iglesias BV, Ranganathan AC, Kourtidis A, Conklin DS, Aguirre-Ghiso JA. Computational identification of a p38SAPK-regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence. *Cancer Res*. 2009 Jul 15;69(14):5664-72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3820. PMID: 19584293; PMCID: PMC2720524.

Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res*. 2003 Apr 1;63(7):1684-95. PMID: 12670923.

Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov;7(11):834-46. doi: 10.1038/nrc2256. PMID: 17957189; PMCID: PMC2519109.

Aguirre-Ghiso JA. Translating the Science of Cancer Dormancy to the Clinic. *Cancer Res*. 2021 Sep 15;81(18):4673-4675. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1407. PMID: 34429327; PMCID: PMC8562555.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8. doi: 10.1073/pnas.0530291100. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6890. PMID: 12629218; PMCID: PMC153034.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjörd JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jäger N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, López-Otín C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdés-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative; ICGC Breast Cancer Consortium; ICGC MMML-Seq Consortium; ICGC PedBrain; Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichten P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):415-21. doi: 10.1038/nature12477. Erratum in: *Nature*. 2013 Oct 10;502(7470):258. Imielinski, Marcin [corrected to Imielinski, Marcin]. PMID: 23945592; PMCID: PMC3776390.

Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhhattar R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell*. 2007 Nov 16;131(4):633-6. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.039. PMID: 18022353.

Alpert A, Moore LS, Dubovik T, Shen-Orr SS. Alignment of single-cell trajectories to compare cellular expression dynamics. *Nat Methods*. 2018 Apr;15(4):267-270. doi: 10.1038/nmeth.4628. PMID: 29529018.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544. PMID: 27069254.

Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res*. 1992 Mar 15;52(6):1399-405. PMID: 1540948.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199-206. doi: 10.1200/JCO.2009.23.4799. PMID: 19917835; PMCID: PMC2793035.

Barata C, Rotemberg V, Codella NCF, Tschandl P, Rinner C, Akay BN, Apalla Z, Argenziano G, Halpern A, Lallas A, Longo C, Malvehy J, Puig S, Rosendahl C, Soyer HP, Zalaudek I, Kittler H. A reinforcement learning model for AI-based decision support in skin cancer. *Nat Med*. 2023 Aug;29(8):1941-1946. doi: 10.1038/s41591-023-02475-5. PMID: 37501017; PMCID: PMC10427421.

Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer*. 2010 May;46(7):1181-8. doi: 10.1016/j.ejca.2010.02.027. PMID: 20304630; PMCID: PMC2856784.

Barkan D, Green JE. An in vitro system to study tumor dormancy and the switch to metastatic growth. *J Vis Exp*. 2011 Aug 11;(54):2914. doi: 10.3791/2914. PMID: 21860375; PMCID: PMC3211127.

Barkan D, Kleinman H, Simmons JL, Asmussen H, Kamaraju AK, Hoenorhoff MJ, Liu ZY, Costes SV, Cho EH, Lockett S, Khanna C, Chambers AF, Green JE. Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6241-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6849. PMID: 18676848; PMCID: PMC2561279.

Barkan D, Kleinman H, Simmons JL, Asmussen H, Kamaraju AK, Hoenorhoff MJ, Liu ZY, Costes SV, Cho EH, Lockett S, Khanna C, Chambers AF, Green JE. Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Res*. 2008 Aug 1;68(15):6241-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6849. PMID: 18676848; PMCID: PMC2561279.

Barkas N, Petukhov V, Nikolaeva D, Lozinsky Y, Demharter S, Khodosevich K, Kharchenko PV. Joint analysis of heterogeneous single-cell RNA-seq dataset collections. *Nat Methods*. 2019 Aug;16(8):695-698. doi: 10.1038/s41592-019-0466-z. PMID: 31308548; PMCID: PMC6684315.

Barrow AD, Edeling MA, Trifonov V, Luo J, Goyal P, Bohl B, Bando JK, Kim AH, Walker J, Andahazy M, Bugatti M, Melocchi L, Vermi W, Fremont DH, Cox S, Cella M, Schmedt C, Colonna M. Natural Killer Cells Control Tumor Growth by Sensing a Growth Factor. *Cell*. 2018 Jan 25;172(3):534-548.e19. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.037. PMID: 29275861; PMCID: PMC6684025.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007 May 18;129(4):823-37. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.009. PMID: 17512414.

Bauer J, Bastian BC. Distinguishing melanocytic nevi from melanoma by DNA copy number changes: comparative genomic hybridization as a research and diagnostic tool. *Dermatol Ther*. 2006 Jan-Feb;19(1):40-9. doi: 10.1111/j.1529-8019.2005.00055.x. PMID: 16405569.

Baxter E, Windloch K, Gannon F, Lee JS. Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell Biosci*. 2014 Aug 19;4:45. doi: 10.1186/2045-3701-4-45. PMID: 25949794; PMCID: PMC4422217.

Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011 Sep 23;11(10):726-34. doi: 10.1038/nrc3130. PMID: 21941284; PMCID: PMC3307543.

Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Sep 1;8(9):a019505. doi: 10.1101/cshperspect.a019505. PMID: 27194046; PMCID: PMC5008069.

Beneyto-Calabuig S, Merbach AK, Kniffka JA, Antes M, Szu-Tu C, Rohde C, Waclawiczek A, Stelmach P, Gräßle S, Pervan P, Janssen M, Landry JJM, Benes V, Jauch A, Brough M, Bauer M, Besenbeck B, Felden J, Bäumer S, Hundemer M, Sauer T, Pabst C, Wickenhauser C, Angenendt L, Schliemann C, Trumpp A, Haas S, Scherer M, Raffel S, Müller-Tidow C, Velten L. Clonally resolved single-cell multi-

omics identifies routes of cellular differentiation in acute myeloid leukemia. *Cell Stem Cell*. 2023 May 4;30(5):706-721.e8. doi: 10.1016/j.stem.2023.04.001. PMID: 37098346.

Bennett DC. Genetics of melanoma progression: the rise and fall of cell senescence. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016 Mar;29(2):122-40. doi: 10.1111/pcmr.12422. PMID: 26386262.

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009 Apr 1;23(7):781-3. doi: 10.1101/gad.1787609. PMID: 19339683; PMCID: PMC3959995.

Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol*. 2003 Dec;139(12):1620-4; discussion 1624. doi: 10.1001/archderm.139.12.1620. PMID: 14676081.

Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell*. 2012 Nov 30;48(4):491-507. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.006. PMID: 23200123; PMCID: PMC3861058.

Bockhorn M, Jain RK, Munn LL. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol*. 2007 May;8(5):444-8. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70140-7. PMID: 17466902; PMCID: PMC2712886.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730-7. doi: 10.1038/nm0797-730. PMID: 9212098.

Borgen E, Rypdal MC, Sosa MS, Renolen A, Schlichting E, Lønning PE, Synnøstvedt M, Aguirre-Ghiso JA, Naume B. NR2F1 stratifies dormant disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2018 Oct 16;20(1):120. doi: 10.1186/s13058-018-1049-0. PMID: 30322396; PMCID: PMC6190561.

Boscolo Bielo L, Trapani D, Repetto M, Crimini E, Valenza C, Belli C, Criscitiello C, Marra A, Subbiah V, Curigliano G. Variant allele frequency: a decision-making tool in precision oncology? *Trends Cancer*. 2023 Dec;9(12):1058-1068. doi: 10.1016/j.trecan.2023.08.011. PMID: 37704501.

Bottomly D, Long N, Schultz AR, Kurtz SE, Tognon CE, Johnson K, Abel M, Agarwal A, Avaylon S, Benton E, Blucher A, Borate U, Braun TP, Brown J, Bryant J, Burke R, Carlos A, Chang BH, Cho HJ, Christy S, Coblentz C, Cohen AM, d'Almeida A, Cook R, Danilov A, Dao KT, Degnin M, Dibb J, Eide CA, English I, Hagler S, Harrelson H, Henson R, Ho H, Joshi SK, Junio B, Kaempf A, Kosaka Y, Laderas T, Lawhead M, Lee H, Leonard JT, Lin C, Lind EF, Liu SQ, Lo P, Loriaux MM, Luty S, Maxson JE, Macey T, Martinez J, Minnier J, Montebianco A, Mori M, Morrow Q, Nelson D, Ramsdill J, Rofelty A, Rogers A, Romine KA, Ryabinin P, Saultz JN, Sampson DA, Savage SL, Schuff R, Searles R, Smith RL, Spurgeon SE, Sweeney T, Swords RT, Thapa A, Thiel-Klare K, Traer E, Wagner J, Wilmot B, Wolf J, Wu G, Yates A, Zhang H, Cogle CR, Collins RH, Deininger MW, Hourigan CS, Jordan CT, Lin TL, Martinez ME, Pallapati RR, Pollyea DA, Pomicter AD, Watts JM, Weir SJ, Druker BJ, McWeeney SK, Tyner JW. Integrative analysis of drug response and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2022 Aug 8;40(8):850-864.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2022.07.002. PMID: 35868306; PMCID: PMC9378589.

Boyd AS, Rodrigues NP. Stem Cells Cycle toward Immune Surveillance. *Immunity*. 2018 Feb 20;48(2):187-190. doi: 10.1016/j.immuni.2018.02.006. PMID: 29466747.

Boyle EA, Li YI, Pritchard JK. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. *Cell*. 2017 Jun 15;169(7):1177-1186. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.038. PMID: 28622505; PMCID: PMC5536862.

Bozsányi S, Varga NN, Farkas K, Bánvölgyi A, Lőrincz K, Lihacova I, Lihachev A, Plorina EV, Bartha Á, Jobbágy A, Kuroli E, Paragh G, Holló P, Medvecz M, Kiss N, Wikonkál NM. Multispectral Imaging Algorithm Predicts Breslow Thickness of Melanoma. *J Clin Med*. 2021 Dec 30;11(1):189. doi: 10.3390/jcm11010189. PMID: 35011930; PMCID: PMC8745435.

Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018 Feb;18(2):128-134. doi: 10.1038/nrc.2017.118. PMID: 29326430.

Bradbury C, Houlton AE, Akiki S, Gregg R, Rindl M, Khan J, Ward J, Khan N, Griffiths M, Nagra S, Hills R, Burnett A, Russell N, Vyas P, Grimwade D, Craddock C, Freeman SD. Prognostic value of monitoring a candidate immunophenotypic leukaemic stem/progenitor cell population in patients allografted for acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2015 Apr;29(4):988-91. doi: 10.1038/leu.2014.327. PMID: 25425198; PMCID: PMC4391965.

Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S, Capobianco C, Farina HG, Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α / β signalling. *Nat Cell Biol*. 2013 Nov;15(11):1351-61. doi: 10.1038/ncb2861. PMID: 24161934; PMCID: PMC4006312.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 1970 Nov;172(5):902-8. doi: 10.1097/00000658-197011000-00017. PMID: 5477666; PMCID: PMC1397358.

Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):98-106. doi: 10.1097/COC.000000000000239. PMID: 26558876; PMCID: PMC4892769.

Buenrostro JD, Wu B, Chang HY, Greenleaf WJ. ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Curr Protoc Mol Biol*. 2015 Jan 5;109:21.29.1-21.29.9. doi: 10.1002/0471142727.mb2129s109. PMID: 25559105; PMCID: PMC4374986.

Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Hunter AE, Kjeldsen L, Yin J, Gibson BE, Wheatley K, Milligan D. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 20;31(27):3360-8. doi: 10.1200/JCO.2012.47.4874. PMID: 23940227.

Cabezas-Wallscheid N, Buettner F, Sommerkamp P, Klimmeck D, Ladel L, Thalheimer FB, Pastor-Flores D, Roma LP, Renders S, Zeisberger P, Przybylla A, Schönberger K, Scognamiglio R, Altamura S, Florian CM, Fawaz M, Vonficht D, Tesio M, Collier P, Pavlinic D, Geiger H, Schroeder T, Benes V, Dick TP, Rieger MA, Stegle O, Trumpp A. Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell*. 2017 May 18;169(5):807-823.e19. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.018. PMID: 28479188.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9. doi: 10.1073/pnas.242606799. PMID: 12434020; PMCID: PMC137750.

Campbell NR, Rao A, Hunter MV, Sznurkowska MK, Briker L, Zhang M, Baron M, Heilmann S, Deforet M, Kenny C, Ferretti LP, Huang TH, Perlee S, Garg M, Nsengimana J, Saini M, Montal E, Tagore M, Newton-Bishop J, Middleton MR, Corrie P, Adams DJ, Rabbie R, Aceto N, Levesque MP, Cornell RA, Yanai I, Xavier JB, White RM. Cooperation between melanoma cell states promotes metastasis through heterotypic cluster formation. *Dev Cell*. 2021 Oct 25;56(20):2808-2825.e10. doi: 10.1016/j.devcel.2021.08.018. PMID: 34529939; PMCID: PMC8551056.

Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015 Jun 18;161(7):1681-96. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.044. PMID: 26091043; PMCID: PMC4580370.

Cancer Genome Atlas Research Network; Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L,

Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F, Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 May 30;368(22):2059-74. doi: 10.1056/NEJMoa1301689. Erratum in: *N Engl J Med*. 2013 Jul 4;369(1):98. PMID: 23634996; PMCID: PMC3767041.

Cao K, Shilatifard A. Enhancers in Cancer: Genetic and Epigenetic Deregulation. *Ref Module Biomed Sci, Encyclopedia Cancer*. 559-568 (2019) DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.65063-8

Cao M, Li T, Chen Y, Zhai X. Nucleoside and Non-Nucleoside DOT1L Inhibitors: Dawn of MLLrearranged Leukemia. *Mini Rev Med Chem*. 2021;21(11):1337-1350. doi: 10.2174/1389557521666210111144357. PMID: 33430727.

Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*. 2002 Nov 1;298(5595):1039-43. doi: 10.1126/science.1076997. PMID: 12351676.

Caplan M, Wittorf KJ, Weber KK, Swenson SA, Gilbreath TJ, Willow Hynes-Smith R, Amador C, Hyde RK, Buckley SM. Multi-omics reveals mitochondrial metabolism proteins susceptible for drug discovery in AML. *Leukemia*. 2022 May;36(5):1296-1305. doi: 10.1038/s41375-022-01518-z. PMID: 35177813; PMCID: PMC9061297.

Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, von Bonin M, Bejestani EP, Ehninger G, Bachmann MP. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood Cancer J*. 2016 Aug 12;6(8):e458. doi: 10.1038/bcj.2016.61. PMID: 27518241; PMCID: PMC5022178.

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*. 2012 May;2(5):401-4. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095. Erratum in: *Cancer Discov*. 2012 Oct;2(10):960. PMID: 22588877; PMCID: PMC3956037.

Chakraborty S, Sharma G, Karmakar S, Banerjee S. Multi-OMICS approaches in cancer biology: New era in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2024 Jun;1870(5):167120. doi: 10.1016/j.bbadis.2024.167120. PMID: 38484941.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2507-16. doi: 10.1056/NEJMoa1103782. PMID: 21639808; PMCID: PMC3549296.

Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 2004 Jul 15;173(2):945-54. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.945. PMID: 15240681.

Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell*. 2020 Jan;11(1):34-44. doi: 10.1007/s13238-019-0633-0. PMID: 31201709; PMCID: PMC6949320.

Chéry L, Lam HM, Coleman I, Lakely B, Coleman R, Larson S, Aguirre-Ghiso JA, Xia J, Gulati R, Nelson PS, Montgomery B, Lange P, Snyder LA, Vessella RL, Morrissey C. Characterization of single disseminated prostate cancer cells reveals tumor cell heterogeneity and identifies dormancy associated pathways. *Oncotarget*. 2014 Oct 30;5(20):9939-51. doi: 10.18632/oncotarget.2480. PMID: 25301725; PMCID: PMC4259449.

Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jul;10(7):457-69. doi: 10.1038/nrc2876. PMID: 20574448; PMCID: PMC3262678.

Choi J, Lee SY. Clinical Characteristics and Treatment of Immune-Related Adverse Events of Immune Checkpoint Inhibitors. *Immune Netw*. 2020 Feb 17;20(1):e9. doi: 10.4110/in.2020.20.e9. PMID: 32158597; PMCID: PMC7049586.

Christensen BC, Marsit CJ, Houseman EA, Godleski JJ, Longacker JL, Zheng S, Yeh RF, Wrensch MR, Wiemels JL, Karagas MR, Bueno R, Sugarbaker DJ, Nelson HH, Wiencke JK, Kelsey KT. Differentiation of lung adenocarcinoma, pleural mesothelioma, and nonmalignant pulmonary tissues using DNA methylation profiles. *Cancer Res*. 2009 Aug 1;69(15):6315-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1073. PMID: 19638575; PMCID: PMC2755616.

Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene*. 2002 Aug 12;21(35):5380-7. doi: 10.1038/sj.onc.1205598. PMID: 12154400.

Clement E, Lazar I, Attané C, Carrié L, Dauvillier S, Ducoux-Petit M, Esteve D, Menneteau T, Moutahir M, Le Gonidec S, Dalle S, Valet P, Burlet-Schiltz O, Muller C, Nieto L. Adipocyte extracellular vesicles carry enzymes and fatty acids that stimulate mitochondrial metabolism and remodeling in tumor cells. *EMBO J*. 2020 Feb 3;39(3):e102525. doi: 10.15252/embj.2019102525. PMID: 31919869; PMCID: PMC6996584.

Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016 Jan 7;127(1):62-70. doi: 10.1182/blood-2015-07-604546. PMID: 26660427.

Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*. 2007 Mar 9;128(5):853-64. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.045. PMID: 17350573.

Cummins KD, Gill S. Will CAR T cell therapy have a role in AML? Promises and pitfalls. *Semin Hematol*. 2019 Apr;56(2):155-163. doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.008. PMID: 30926092.

Dagar G, Gupta A, Shankar A, Chauhan R, Macha MA, Bhat AA, Das D, Goyal R, Bhorival S, Pandita RK, Prasad CP, Sarkar PS, Pandita TK, Singh M. The future of cancer treatment: combining radiotherapy with immunotherapy. *Front Mol Biosci*. 2024 Jul 9;11:1409300. doi: 10.3389/fmolb.2024.1409300. PMID: 39044839; PMCID: PMC11263218.

Danos FX, Papo M, Micol JB. L'hématopoïèse clonale : un concept émergent à la croisée des spécialités [Clonal haematopoiesis: A concise review]. *Rev Med Interne*. 2019 Oct;40(10):684-692. French. doi: 10.1016/j.revmed.2019.05.005. PMID: 31126662.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54. doi: 10.1038/nature00766. PMID: 12068308.

Davies KD, Lomboy A, Lawrence CA, Yourshaw M, Bocsi GT, Camidge DR, Aisner DL. DNA-Based versus RNA-Based Detection of MET Exon 14 Skipping Events in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2019 Apr;14(4):737-741. doi: 10.1016/j.jtho.2018.12.020. PMID: 30639620.

de Bruijn I, Kundra R, Mastrogiacomo B, Tran TN, Sikina L, Mazor T, Li X, Ochoa A, Zhao G, Lai B, Abeshouse A, Baiceanu D, Ciftci E, Dogrusoz U, Duffilie A, Erkoc Z, Garcia Lara E, Fu Z, Gross B, Haynes C, Heath A, Higgins D, Jagannathan P, Kalletla K, Kumari P, Lindsay J, Lisman A, Leenknecht B, Lukasse P, Madela D, Madupuri R, van Nierop P, Plantalech O, Quach J, Resnick AC, Rodenburg

SYA, Satravada BA, Schaeffer F, Sheridan R, Singh J, Sirohi R, Sumer SO, van Hagen S, Wang A, Wilson M, Zhang H, Zhu K, Rusk N, Brown S, Lavery JA, Panageas KS, Rudolph JE, LeNoue-Newton ML, Warner JL, Guo X, Hunter-Zinck H, Yu TV, Pilai S, Nichols C, Gardos SM, Philip J; AACR Project GENIE BPC Core Team, AACR Project GENIE Consortium; Kehl KL, Riely GJ, Schrag D, Lee J, Fiandalo MV, Sweeney SM, Pugh TJ, Sander C, Cerami E, Gao J, Schultz N. Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. *Cancer Res.* 2023 Dec 1;83(23):3861-3867. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-23-0816. PMID: 37668528; PMCID: PMC10690089.

de Rooij JD, Hollink IH, Arentsen-Peters ST, van Galen JF, Berna Beverloo H, Baruchel A, Trka J, Reinhardt D, Sonneveld E, Zimmermann M, Alonzo TA, Pieters R, Meshinchi S, van den Heuvel-Eibrink MM, Zwaan CM. NUP98/JARID1A is a novel recurrent abnormality in pediatric acute megakaryoblastic leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Leukemia.* 2013 Dec;27(12):2280-8. doi: 10.1038/leu.2013.87. PMID: 23531517.

Debruyne DN, Dries R, Sengupta S, Seruggia D, Gao Y, Sharma B, Huang H, Moreau L, McLane M, Day DS, Marco E, Chen T, Gray NS, Wong KK, Orkin SH, Yuan GC, Young RA, George RE. BORIS promotes chromatin regulatory interactions in treatment-resistant cancer cells. *Nature.* 2019 Aug;572(7771):676-680. doi: 10.1038/s41586-019-1472-0. PMID: 31391581; PMCID: PMC7010522.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Vigué F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 2009 May 28;360(22):2289-301. doi: 10.1056/NEJMoa0810069. PMID: 19474426.

Denk D, Greten FR. Inflammation: the incubator of the tumor microenvironment. *Trends Cancer.* 2022 Nov;8(11):901-914. doi: 10.1016/j.trecan.2022.07.002. PMID: 35907753.

Dennis LK, Vanbeek MJ, Beane Freeman LE, Smith BJ, Dawson DV, Coughlin JA. Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis. *Ann Epidemiol.* 2008 Aug;18(8):614-27. doi: 10.1016/j.annepidem.2008.04.006. PMID: 18652979; PMCID: PMC2873840.

Desandes E, Lacour B, Belot A, Molinie F, Delafosse P, Tretarre B, Velten M, Sauleau EA, Woronoff AS, Guizard AV, Ganry O, Bara S, Grosclaude P, Troussard X, Bouvier V, Brugieres L, Clavel J. Cancer incidence and survival in adolescents and young adults in France, 2000-2008. *Pediatr Hematol Oncol.* 2013 May;30(4):291-306. doi: 10.3109/08880018.2012.762569. PMID: 23363314.
Dick JE. Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1044:1-5. doi: 10.1196/annals.1349.001. PMID: 15958691.

Di Martino JS, Nobre AR, Mondal C, Taha I, Farias EF, Fertig EJ, Naba A, Aguirre-Ghiso JA, Bravo-Cordero JJ. A tumor-derived type III collagen-rich ECM niche regulates tumor cell dormancy. *Nat Cancer.* 2022 Jan;3(1):90-107. doi: 10.1038/s43018-021-00291-9. PMID: 35121989; PMCID: PMC8818089.

Dillon LW, Higgins J, Nasif H, Othus M, Beppu L, Smith TH, Schmidt E, Valentine lii CC, Salk JJ, Wood BL, Erba HP, Radich JP, Hourigan CS. Quantification of measurable residual disease using duplex sequencing in adults with acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2024 Feb 1;109(2):401-410. doi: 10.3324/haematol.2023.283520. PMID: 37534515; PMCID: PMC10828764.

DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, Swords R, Collins RH, Mannis GN, Pollyea DA, Donnellan W, Fathi AT, Pigneux A, Erba HP, Prince GT, Stein AS, Uy GL, Foran JM, Traer E, Stuart RK, Arellano ML, Slack JL, Sekeres MA, Willekens C, Choe S, Wang H, Zhang V, Yen KE, Kapsalis SM, Yang H, Dai D, Fan B, Goldwasser M, Liu H, Agresta S, Wu B, Attar EC, Tallman MS, Stone RM, Kantarjian HM. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med.* 2018 Jun 21;378(25):2386-2398. doi: 10.1056/NEJMoa1716984. PMID: 29860938.

Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, McMichael JF, Wallis JW, Lu C, Shen D, Harris CC, Dooling DJ, Fulton RS, Fulton LL, Chen K, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Wendl MC, Heath

S, Watson MA, Link DC, Tomasson MH, Shannon WD, Payton JE, Kulkarni S, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, Mardis ER, Wilson RK, DiPersio JF. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):506-10. doi: 10.1038/nature10738. PMID: 22237025; PMCID: PMC3267864.

Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017 Jan 26;129(4):424-447. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196. PMID: 27895058; PMCID: PMC5291965.

Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Godley LA, Hasserjian RP, Larson RA, Levine RL, Miyazaki Y, Niederwieser D, Ossenkoppele G, Röllig C, Sierra J, Stein EM, Tallman MS, Tien HF, Wang J, Wierzbowska A, Löwenberg B. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022 Sep 22;140(12):1345-1377. doi: 10.1182/blood.2022016867. PMID: 35797463.

Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012 Feb 3;10(2):120-36. doi: 10.1016/j.stem.2012.01.006. PMID: 22305562.

Dudgeon C, Harris CR, Chen Y, Ghaddar B, Sharma A, Shah MM, et al. A Novel Model of Pancreatic Cancer Dormancy Reveals Mechanistic Insights and a Dormancy Gene Signature with Human Relevance. *bioRxiv* 2020:2020.04.13.037374 doi 10.1101/2020.04.13.037374.

Duhamel M, Drelich L, Wisztorski M, Aboulouard S, Gimeno JP, Ogrinc N, Devos P, Cardon T, Weller M, Escande F, Zairi F, Maurice CA, Le Rhun É, Fournier I, Salzet M. Spatial analysis of the glioblastoma proteome reveals specific molecular signatures and markers of survival. *Nat Commun*. 2022 Nov 4;13(1):6665. doi: 10.1038/s41467-022-34208-6. PMID: 36333286; PMCID: PMC9636229.

Ehninger A, Kramer M, Röllig C, Thiede C, Bornhauser M, von Bonin M, et al. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4:e218.

Ehninger A, Kramer M, Röllig C, Thiede C, Bornhäuser M, von Bonin M, Wermke M, Feldmann A, Bachmann M, Ehninger G, Oelschlägel U. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2014 Jun 13;4(6):e218. doi: 10.1038/bcj.2014.39. PMID: 24927407; PMCID: PMC4080210.

Elder DE. Skin cancer. Melanoma and other specific nonmelanoma skin cancers. *Cancer*. 1995 Jan 1;75(1 Suppl):245-56. doi: 10.1002/1097-0142(19950101)75:1+<245::aid-cnrcr2820751310>3.0.co;2-7. PMID: 8000999.

Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. *Arch Pathol Lab Med*. 2020 Apr;144(4):500-522. doi: 10.5858/arpa.2019-0561-RA. PMID: 32057276.

Essers, Marieke A. G., Sandra Offner, William E. Blanco-Bose, Zoe Waibler, Ulrich Kalinke, Michel A. Duchosal, et Andreas Trumpp. 2009. «IFN α Activates Dormant Haematopoietic Stem Cells in Vivo». *Nature* 458 (7240): 904-8. <https://doi.org/10.1038/nature07815>.

Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, Bosc C, Sugita M, Stuani L, Fraise M, Scotland S, Larrue C, Boutzen H, Féliu V, Nicolau-Travers ML, Cassant-Sourdy S, Broin N, David M, Serhan N, Sarry A, Tavitian S, Kaoma T, Vallar L, Iacovoni J, Linares LK, Montersino C, Castellano R, Griessinger E, Collette Y, Duchamp O, Barreira Y, Hirsch P, Palama T, Gales L, Delhommeau F, Garmy-Susini BH, Portais JC, Vergez F, Selak M, Danet-Desnoyers G, Carroll M, Récher C, Sarry JE. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem

Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* 2017 Jul;7(7):716-735. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0441. PMID: 28416471; PMCID: PMC5501738.

Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, Jahkola T, Bowles TL, Testori A, Beitsch PD, Hoekstra HJ, Moncrieff M, Ingvar C, Wouters MWJM, Sabel MS, Levine EA, Agnese D, Henderson M, Dummer R, Rossi CR, Neves RI, Trocha SD, Wright F, Byrd DR, Matter M, Hsueh E, MacKenzie-Ross A, Johnson DB, Terheyden P, Berger AC, Huston TL, Wayne JD, Smithers BM, Neuman HB, Schneebaum S, Gershenwald JE, Ariyan CE, Desai DC, Jacobs L, McMasters KM, Gesierich A, Hersey P, Bines SD, Kane JM, Barth RJ, McKinnon G, Farma JM, Schultz E, Vidal-Sicart S, Hoefler RA, Lewis JM, Scheri R, Kelley MC, Nieweg OE, Noyes RD, Hoon DSB, Wang HJ, Elashoff DA, Elashoff RM. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med.* 2017 Jun 8;376(23):2211-2222. doi: 10.1056/NEJMoa1613210. PMID: 28591523; PMCID: PMC5548388.

Farrar JD, Katz KH, Windsor J, Thrush G, Scheuermann RH, Uhr JW, Street NE. Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state. *J Immunol.* 1999 Mar 1;162(5):2842-9. PMID: 10072532.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. PMID: 25220842.

Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, Racevskis J, Dewald GW, Ketterling RP, Bennett JM, Rowe JM, Lazarus HM, Tallman MS. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2009 Sep 24;361(13):1249-59. doi: 10.1056/NEJMoa0904544. PMID: 19776406; PMCID: PMC4480917.

Fernández-Cortés M, Delgado-Bellido D, Oliver FJ. Vasculogenic Mimicry: Become an Endothelial Cell "But Not So Much". *Front Oncol.* 2019 Aug 22;9:803. doi: 10.3389/fonc.2019.00803. PMID: 31508365; PMCID: PMC6714586.

Ferrara G, Argenziano G. The WHO 2018 Classification of Cutaneous Melanocytic Neoplasms: Suggestions From Routine Practice. *Front Oncol.* 2021 Jul 2;11:675296. doi: 10.3389/fonc.2021.675296. PMID: 34277420; PMCID: PMC8283700.

Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, Azuma M, Krummel MF, Bluestone JA. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol.* 2009 Nov;10(11):1185-92. doi: 10.1038/ni.1790. PMID: 19783989; PMCID: PMC2778301.

Fiorenza S, Turtle CJ. CAR-T Cell Therapy for Acute Myeloid Leukemia: Preclinical Rationale, Current Clinical Progress, and Barriers to Success. *BioDrugs.* 2021 May;35(3):281-302. doi: 10.1007/s40259-021-00477-8. PMID: 33826079.

Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 2010 Jan 28;463(7280):485-92. doi: 10.1038/nature08908. PMID: 20110992; PMCID: PMC2851742.

Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol.* 1988 Jun;124(6):869-71. doi: 10.1001/archderm.124.6.869. PMID: 3377516.

Flores-Guzmán F, Utikal J, Umansky V. Dormant tumor cells interact with memory CD8⁺ T cells in RET transgenic mouse melanoma model. *Cancer Lett.* 2020 Apr 1;474:74-81. doi: 10.1016/j.canlet.2020.01.016. PMID: 31962142.

Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin.* 1985 May-Jun;35(3):130-51. doi: 10.3322/canjclin.35.3.130. PMID: 3921200.

Füllgrabe J, Hajji N, Joseph B. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. *Cell Death Differ.* 2010 Aug;17(8):1238-43. doi: 10.1038/cdd.2010.58. PMID: 20467440.

Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B. Histone onco-modifications. *Oncogene*. 2011 Aug 4;30(31):3391-403. doi: 10.1038/onc.2011.121. PMID: 21516126.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005 Jan;41(1):28-44. doi: 10.1016/j.ejca.2004.10.015. PMID: 15617989.

Gao H, Chakraborty G, Lee-Lim AP, Mo Q, Decker M, Vonica A, Shen R, Brogi E, Brivanlou AH, Giancotti FG. The BMP inhibitor Coco reactivates breast cancer cells at lung metastatic sites. *Cell*. 2012 Aug 17;150(4):764-79. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.035. Erratum in: *Cell*. 2012 Dec 7;151(6):1386-8. PMID: 22901808; PMCID: PMC3711709.

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013 Apr 2;6(269):pl1. doi: 10.1126/scisignal.2004088. PMID: 23550210; PMCID: PMC4160307.

Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell*. 2013 Mar 28;153(1):17-37. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.002. PMID: 23540688.

Gawad S, Schild L, Renaud PH. Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab Chip*. 2001 Sep;1(1):76-82. doi: 10.1039/b103933b. PMID: 15100895.

Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H, Almeida D, Koller A, Hajjar KA, Stainier DY, Chen EI, Lyden D, Bissell MJ. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nat Cell Biol*. 2013 Jul;15(7):807-17. doi: 10.1038/ncb2767. PMID: 23728425; PMCID: PMC3826912.

Gharooni M, Alikhani A, Moghtaderi H, Abiri H, Mashaghi A, Abbasvandi F, Khayamian MA, Miripour ZS, Zandi A, Abdolhad M. Bioelectronics of The Cellular Cytoskeleton: Monitoring Cytoskeletal Conductance Variation for Sensing Drug Resistance. *ACS Sens*. 2019 Feb 22;4(2):353-362. doi: 10.1021/acssensors.8b01142. PMID: 30572702.

Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell*. 2013 Nov 7;155(4):750-64. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.029. PMID: 24209616; PMCID: PMC4354734.

Greger V, Debus N, Lohmann D, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet*. 1994 Nov;94(5):491-6. doi: 10.1007/BF00211013. PMID: 7959682.

Guo M, Peng Y, Gao A, Du C, Herman JG. Epigenetic heterogeneity in cancer. *Biomark Res*. 2019 Oct 31;7:23. doi: 10.1186/s40364-019-0174-y. PMID: 31695915; PMCID: PMC6824025.

Gurska L, Gritsman K. Unveiling T cell evasion mechanisms to immune checkpoint inhibitors in acute myeloid leukemia. *Cancer Drug Resist*. 2023 Sep 26;6(3):674-687. doi: 10.20517/cdr.2023.39. PMID: 37842238; PMCID: PMC10571054.

Hall BJ, LeBoit PE. Suprabasal spread of melanocytes in dysplastic nevi and melanoma in situ: Ki-67-labeling rate of junctional melanocytes and suprabasal cells may be a helpful clue to the diagnosis. *Am J Surg Pathol*. 2014 Aug;38(8):1111-7. doi: 10.1097/PAS.0000000000000224. PMID: 24805862.

Hasin Y, Seldin M, Lusk A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*. 2017 May 5;18(1):83. doi: 10.1186/s13059-017-1215-1. PMID: 28476144; PMCID: PMC5418815.

Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH Jr, Kaempgen E, Martín-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martin AM, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012 Jul 28;380(9839):358-65. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60868-X. PMID: 22735384.

Hawryluk EB, Tsao H. Melanoma: clinical features and genomic insights. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Sep 2;4(9):a015388. doi: 10.1101/cshperspect.a015388. PMID: 25183853; PMCID: PMC4143108.

Heo YJ, Hwa C, Lee GH, Park JM, An JY. Integrative Multi-Omics Approaches in Cancer Research: From Biological Networks to Clinical Subtypes. *Mol Cells.* 2021 Jul 31;44(7):433-443. doi: 10.14348/molcells.2021.0042. PMID: 34238766; PMCID: PMC8334347.

Heuser M, Heida B, Büttner K, Wienecke CP, Teich K, Funke C, Brandes M, Klement P, Liebich A, Wichmann M, Neziri B, Chaturvedi A, Kloos A, Mintzas K, Gaidzik VI, Paschka P, Bullinger L, Fiedler W, Heim A, Puppe W, Krauter J, Döhner K, Döhner H, Ganser A, Stadler M, Hambach L, Gabdoulline R, Thol F. Posttransplantation MRD monitoring in patients with AML by next-generation sequencing using DTA and non-DTA mutations. *Blood Adv.* 2021 May 11;5(9):2294-2304. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004367. PMID: 33929500; PMCID: PMC8114555.

Hodis E, Torlai Triglia E, Kwon JYH, Biancalani T, Zakka LR, Parkar S, Hütter JC, Buffoni L, Delorey TM, Phillips D, Dionne D, Nguyen LT, Schapiro D, Maliga Z, Jacobson CA, Hendel A, Rozenblatt-Rosen O, Mihm MC Jr, Garraway LA, Regev A. Stepwise-edited, human melanoma models reveal mutations' effect on tumor and microenvironment. *Science.* 2022 Apr 29;376(6592):eabi8175. doi: 10.1126/science.abi8175. PMID: 35482859; PMCID: PMC9427199.

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995 Feb;1(2):149-53. doi: 10.1038/nm0295-149. PMID: 7585012.

Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2013 Oct;13(10):714-26. doi: 10.1038/nrc3599. PMID: 24060863.

Hong M, Tao S, Zhang L, Diao LT, Huang X, Huang S, Xie SJ, Xiao ZD, Zhang H. RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research. *J Hematol Oncol.* 2020 Dec 4;13(1):166. doi: 10.1186/s13045-020-01005-x. PMID: 33276803; PMCID: PMC7716291.

Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol.* 2004 Jul;5(7):738-43. doi: 10.1038/ni1080. PMID: 15170211.

Hoshi R, Gorospe KA, Labouta HI, Azad T, Lee WL, Thu KL. Alternative Strategies for Delivering Immunotherapeutics Targeting the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint in Cancer. *Pharmaceutics.* 2024 Sep 7;16(9):1181. doi: 10.3390/pharmaceutics16091181. PMID: 39339217; PMCID: PMC11434872.

Hou HA, Tien HF. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies. *J Biomed Sci.* 2020 Jul 21;27(1):81. doi: 10.1186/s12929-020-00674-7. PMID: 32690020; PMCID: PMC7372828.

Huang F, Santinon F, Flores González RE, Del Rincón SV. Melanoma Plasticity: Promoter of Metastasis and Resistance to Therapy. *Front Oncol.* 2021 Sep 16;11:756001. doi: 10.3389/fonc.2021.756001. PMID: 34604096; PMCID: PMC8481945.

Hwang SM. Classification of acute myeloid leukemia. *Blood Res.* 2020 Jul 31;55(S1):S1-S4. doi: 10.5045/br.2020.S001. PMID: 32719169; PMCID: PMC7386892.

Indraccolo S, Minuzzo S, Masiero M, Pusceddu I, Persano L, Moserle L, Reboldi A, Favaro E, Mecarozzi M, Di Mario G, Screpanti I, Ponzoni M, Doglioni C, Amadori A. Cross-talk between tumor and endothelial cells involving the Notch3-Dll4 interaction marks escape from tumor dormancy. *Cancer Res.* 2009 Feb 15;69(4):1314-23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2791. PMID: 19208840.

Islam F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Exp Cell Res*. 2015 Jul 1;335(1):135-47. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.04.018. PMID: 25967525.

Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science*. 2019 Nov 1;366(6465):eaan4673. doi: 10.1126/science.aan4673. PMID: 31672865; PMCID: PMC8050831.

Jason Yeh, Rima M. Saliba, Christopher Wang, Zhou Fang, Bradley Figgins, Sairah Ahmed, Musa Yilmaz, Naval Daver, Rohtesh S. Mehta, Gheath Alatrash, David Marin, Uday R Popat, Richard E Champlin, Elizabeth J Shpall, Betul Oran; Efficacy and Safety of Gilteritinib Vs. Sorafenib As Post-Transplant Maintenance in Patients with FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 2022; 140 (Supplement 1): 7686–7688.

Jentzsch M, Bill M, Nicolet D, Leiblein S, Schubert K, Pless M, Bergmann U, Wildenberger K, Schuhmann L, Cross M, Pönisch W, Franke GN, Vucinic V, Lange T, Behre G, Mrózek K, Bloomfield CD, Niederwieser D, Schwind S. Prognostic impact of the CD34+/CD38- cell burden in patients with acute myeloid leukemia receiving allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol*. 2017 Apr;92(4):388-396. doi: 10.1002/ajh.24663. PMID: 28133783.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1074-80. doi: 10.1126/science.1063127. PMID: 11498575.

Joseph J, Shiozawa Y, Jung Y, Kim JK, Pedersen E, Mishra A, Zalucha JL, Wang J, Keller ET, Pienta KJ, Taichman RS. Disseminated prostate cancer cells can instruct hematopoietic stem and progenitor cells to regulate bone phenotype. *Mol Cancer Res*. 2012 Mar;10(3):282-92. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0404. PMID: 22241219; PMCID: PMC3307952.

Karras P, Bordeu I, Pozniak J, Nowosad A, Pazzi C, Van Raemdonck N, Landeloos E, Van Herck Y, Pedri D, Bervoets G, Makhzami S, Khoo JH, Pavie B, Lamote J, Marin-Bejar O, Dewaele M, Liang H, Zhang X, Hua Y, Wouters J, Browaeys R, Bergers G, Saeys Y, Bosisio F, van den Oord J, Lambrechts D, Rustgi AK, Bechter O, Blanpain C, Simons BD, Rambow F, Marine JC. A cellular hierarchy in melanoma uncouples growth and metastasis. *Nature*. 2022 Oct;610(7930):190-198. doi: 10.1038/s41586-022-05242-7. Erratum in: *Nature*. 2022 Nov;611(7934):E4. doi: 10.1038/s41586-022-05415-4. PMID: 36131018; PMCID: PMC10439739.

Kauffman HM, McBride MA, Delmonico FL. First report of the United Network for Organ Sharing Transplant Tumor Registry: donors with a history of cancer. *Transplantation*. 2000 Dec 27;70(12):1747-51. doi: 10.1097/00007890-200012270-00014. PMID: 11152107.

Kaufmann SH. Imatinib spells BAD news for Bcr/abl-positive leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 3;103(40):14651-2. doi: 10.1073/pnas.0607135103. PMID: 17003111; PMCID: PMC1595406.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331. PMID: 18173375; PMCID: PMC10637733.

Keller L, Pantel K. Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2019 Oct;19(10):553-567. doi: 10.1038/s41568-019-0180-2. PMID: 31455893.

Kelly TK, Liu Y, Lay FD, Liang G, Berman BP, Jones PA. Genome-wide mapping of nucleosome positioning and DNA methylation within individual DNA molecules. *Genome Res*. 2012 Dec;22(12):2497-506. doi: 10.1101/gr.143008.112. PMID: 22960375; PMCID: PMC3514679.

Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018 Aug;18(8):775-784. doi: 10.1080/14737140.2018.1489246. PMID: 29923435; PMCID: PMC7652033.

Khalil BD, Sanchez R, Rahman T, Rodriguez-Tirado C, Moritsch S, Martinez AR, Miles B, Farias E, Mezei M, Nobre AR, Singh D, Kale N, Sproll KC, Sosa MS, Aguirre-Ghiso JA. An NR2F1-specific agonist suppresses metastasis by inducing cancer cell dormancy. *J Exp Med*. 2022 Jan 3;219(1):e20210836. doi: 10.1084/jem.20210836. PMID: 34812843; PMCID: PMC8614154.

Kim J, Mooren OL, Onken MD, Cooper JA. Septin and actin contributions to endothelial cell-cell junctions and monolayer integrity. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2023 Jul-Aug;80(7-8):228-241. doi: 10.1002/cm.21732. PMID: 36205643; PMCID: PMC10079785.

Kim Y, Jeung HK, Cheong JW, Song J, Bae SH, Lee JI, Min YH. All-Trans Retinoic Acid Synergizes with Enasidenib to Induce Differentiation of IDH2-Mutant Acute Myeloid Leukemia Cells. *Yonsei Med J*. 2020 Sep;61(9):762-773. doi: 10.3349/yjm.2020.61.9.762. PMID: 32882760; PMCID: PMC7471081.

Kloosterman WP, Koster J, Molenaar JJ. Prevalence and clinical implications of chromothripsis in cancer genomes. *Curr Opin Oncol*. 2014 Jan;26(1):64-72. doi: 10.1097/CCO.000000000000038. PMID: 24305569.

Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jan;15(1):25-41. doi: 10.1038/nrc3817. PMID: 25533674.

Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 1999 Aug 6;98(3):285-94. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81958-3. PMID: 10458604.

Kramer JM. Regulation of cell differentiation and function by the euchromatin histone methyltransferases G9a and GLP. *Biochem Cell Biol*. 2016 Feb;94(1):26-32. doi: 10.1139/bcb-2015-0017. PMID: 26198080.

Krause DS, Van Etten RA. Right on target: eradicating leukemic stem cells. *Trends Mol Med*. 2007 Nov;13(11):470-81. doi: 10.1016/j.molmed.2007.09.003. PMID: 17981087; PMCID: PMC4344828.

Kurppa KJ, Liu Y, To C, Zhang T, Fan M, Vajdi A, Knelson EH, Xie Y, Lim K, Cejas P, Portell A, Lizotte PH, Ficarro SB, Li S, Chen T, Haikala HM, Wang H, Bahcall M, Gao Y, Shalhout S, Boettcher S, Shin BH, Thai T, Wilkens MK, Tillgren ML, Mushajiang M, Xu M, Choi J, Bertram AA, Ebert BL, Beroukhi R, Bandopadhyay P, Awad MM, Gokhale PC, Kirschmeier PT, Marto JA, Camargo FD, Haq R, Paweletz CP, Wong KK, Barbie DA, Long HW, Gray NS, Jänne PA. Treatment-Induced Tumor Dormancy through YAP-Mediated Transcriptional Reprogramming of the Apoptotic Pathway. *Cancer Cell*. 2020 Jan 13;37(1):104-122.e12. doi: 10.1016/j.ccell.2019.12.006. PMID: 31935369; PMCID: PMC7146079.

Lai Z, Tsugawa H, Wohlgemuth G, Mehta S, Mueller M, Zheng Y, Ogiwara A, Meissen J, Showalter M, Takeuchi K, Kind T, Beal P, Arita M, Fiehn O. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat Methods*. 2018 Jan;15(1):53-56. doi: 10.1038/nmeth.4512. PMID: 29176591; PMCID: PMC6358022.

Lambert J, Lambert J, Nibourel O, Pautas C, Hayette S, Cayuela JM, Terré C, Rousselot P, Dombret H, Chevret S, Preudhomme C, Castaigne S, Renneville A. MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin. *Oncotarget*. 2014 Aug 15;5(15):6280-8. doi: 10.18632/oncotarget.2196. PMID: 25026287; PMCID: PMC4171629.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645-8. doi: 10.1038/367645a0. PMID: 7509044.

Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, Mandalà M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Sovak MA, Chang I, Choong N, Hack SP, McArthur GA, Ribas A. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2014 Nov 13;371(20):1867-76. doi: 10.1056/NEJMoa1408868. PMID: 25265494.

Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsigiros A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei CL. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* 2010 Mar;20(3):320-31. doi: 10.1101/gr.101907.109. PMID: 20133333; PMCID: PMC2840979.

Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature.* 2018 Jan 24;553(7689):418-426. doi: 10.1038/nature25022. PMID: 29364285; PMCID: PMC6555401.

Lawson DA, Bhakta NR, Kessenbrock K, Prummel KD, Yu Y, Takai K, Zhou A, Eyob H, Balakrishnan S, Wang CY, Yaswen P, Goga A, Werb Z. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature.* 2015 Oct 1;526(7571):131-5. doi: 10.1038/nature15260. PMID: 26416748; PMCID: PMC4648562.

Lee JH, Long GV, Boyd S, Lo S, Menzies AM, Tembe V, Guminski A, Jakrot V, Scolyer RA, Mann GJ, Kefford RF, Carlino MS, Rizos H. Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann Oncol.* 2017 May 1;28(5):1130-1136. doi: 10.1093/annonc/mdx026. PMID: 28327969.

Lee S, Kim J, Park JE. Single-Cell Toolkits Opening a New Era for Cell Engineering. *Mol Cells.* 2021 Mar 31;44(3):127-135. doi: 10.14348/molcells.2021.0002. PMID: 33795531; PMCID: PMC8019599.

Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandath C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010 Dec 16;363(25):2424-33. doi: 10.1056/NEJMoa1005143. PMID: 21067377; PMCID: PMC3201818.

Li X, Karras P, Torres R, Rambow F, van den Oord J, Marine JC, Kos L. Disseminated Melanoma Cells Transdifferentiate into Endothelial Cells in Intravascular Niches at Metastatic Sites. *Cell Rep.* 2020 Jun 16;31(11):107765. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107765. PMID: 32553158.

Lichtman MA. A historical perspective on the development of the cytarabine (7days) and daunorubicin (3days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia: 2013 the 40th anniversary of 7+3. *Blood Cells Mol Dis.* 2013 Feb;50(2):119-30. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.10.005. PMID: 23154039.

Lim ZF, Ma PC. Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy. *J Hematol Oncol.* 2019 Dec 9;12(1):134. doi: 10.1186/s13045-019-0818-2. PMID: 31815659; PMCID: PMC6902404.

Lin SY, Orozco JIJ, Hoon DSB. Detection of Minimal Residual Disease and Its Clinical Applications in Melanoma and Breast Cancer Patients. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1100:83-95. doi: 10.1007/978-3-319-97746-1_5. PMID: 30411261.

Liu, Fang, Yuanzhen Cao, Kevin Pinz, Yu Ma, Masayuki Wada, Kevin Chen, Gina Ma, et al. 2018. "First-in-Human CLL1-CD33 Compound CAR T Cell Therapy Induces Complete Remission in Patients with Refractory Acute Myeloid Leukemia: Update on Phase 1 Clinical Trial." *Blood* 132 (Supplement 1): 901–901. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110579>.

Liu J, Jiang P, Lu Z, Yu Z, Qian P. Decoding leukemia at the single-cell level: clonal architecture, classification, microenvironment, and drug resistance. *Exp Hematol Oncol.* 2024 Jan 30;13(1):12. doi: 10.1186/s40164-024-00479-6. PMID: 38291542; PMCID: PMC10826069.

Liu W, Yin H, Xie Z, Fang F, Chu J, Yang L, Huang L, Tu S, Cai H, Wu Z, Wei A, Liu C, Hong Y, Tian X, Cheng Y, Pan J, Wang N, Zhang K. FYB1-targeted modulation of CAPG promotes AML progression. *Mol Cell Biochem.* 2024 May 3. doi: 10.1007/s11010-024-04992-4. PMID: 38700746.

- Liu Y, Cheng Z, Pang Y, Cui L, Qian T, Quan L, Zhao H, Shi J, Ke X, Fu L. Role of microRNAs, circRNAs and long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2019 May 24;12(1):51. doi: 10.1186/s13045-019-0734-5. PMID: 31126316; PMCID: PMC6534901.
- Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development*. 2008 Feb;135(3):579-88. doi: 10.1242/dev.007047. PMID: 18192284; PMCID: PMC2507753.
- Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*. 2008 Aug 15;7(16):2591-600. doi: 10.4161/cc.7.16.6533. PMID: 18719384.
- Lu X, Mu E, Wei Y, Riethdorf S, Yang Q, Yuan M, Yan J, Hua Y, Tiede BJ, Lu X, Haffty BG, Pantel K, Massagué J, Kang Y. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging $\alpha\beta 1$ -positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell*. 2011 Dec 13;20(6):701-14. doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.002. PMID: 22137794; PMCID: PMC3241854.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997 Sep 18;389(6648):251-60. doi: 10.1038/38444. PMID: 9305837.
- Ma H, Padmanabhan IS, Parmar S, Gong Y. Targeting CLL-1 for acute myeloid leukemia therapy. *J Hematol Oncol*. 2019 Apr 24;12(1):41. doi: 10.1186/s13045-019-0726-5. PMID: 31014360; PMCID: PMC6480870.
- Ma Q, Zhao M, Long B, Li H. Super-enhancer-associated gene CAPG promotes AML progression. *Commun Biol*. 2023 Jun 9;6(1):622. doi: 10.1038/s42003-023-04973-1. PMID: 37296281; PMCID: PMC10256737.
- Maleki Behzad M, Abbasi M, Oliaei I, Ghorbani Gholiabad S, Rafieemehr H. Effects of Lifestyle and Environmental Factors on the Risk of Acute Myeloid Leukemia: Result of a Hospital-based Case-Control Study. *J Res Health Sci*. 2021 Aug 12;21(3):e00525. doi: 10.34172/jrhs.2021.58. PMID: 34698659; PMCID: PMC8957684.
- Marin-Bejar O, Rogiers A, Dewaele M, Femel J, Karras P, Pozniak J, Bervoets G, Van Raemdonck N, Pedri D, Swings T, Demeulemeester J, Borght SV, Lehnert S, Bosisio F, van den Oord JJ, Bempt IV, Lambrechts D, Voet T, Bechter O, Rizos H, Levesque MP, Leucci E, Lund AW, Rambow F, Marine JC. Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell*. 2021 Aug 9;39(8):1135-1149.e8. doi: 10.1016/j.ccell.2021.05.015. PMID: 34143978.
- Marsh Durban V, Deuker MM, Bosenberg MW, Phillips W, McMahon M. Differential AKT dependency displayed by mouse models of BRAFV600E-initiated melanoma. *J Clin Invest*. 2013 Dec;123(12):5104-18. doi: 10.1172/JCI69619. PMID: 24200692; PMCID: PMC3859393.
- Marsolier J, Prompsy P, Durand A, Lyne AM, Landragin C, Trouchet A, Bento ST, Eisele A, Foulon S, Baudre L, Grosselin K, Bohec M, Baulande S, Dahmani A, Sourd L, Letouzé E, Salomon AV, Marangoni E, Perié L, Vallot C. H3K27me3 conditions chemotolerance in triple-negative breast cancer. *Nat Genet*. 2022 Apr;54(4):459-468. doi: 10.1038/s41588-022-01047-6. PMID: 35410383; PMCID: PMC7612638.
- Messner S, Hottiger MO. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends Cell Biol*. 2011 Sep;21(9):534-42. doi: 10.1016/j.tcb.2011.06.001. PMID: 21741840.
- Michielin O, van Akkooi ACJ, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019 Dec 1;30(12):1884-1901. doi: 10.1093/annonc/mdz411. PMID: 31566661.

Min HY, Lee HY. Cellular Dormancy in Cancer: Mechanisms and Potential Targeting Strategies. *Cancer Res Treat.* 2023 Jul;55(3):720-736. doi: 10.4143/crt.2023.468. PMID: 36960624; PMCID: PMC10372609.

Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, Hoang MP, Lo J, Guerrero CR, Lennerz JK, Mihm MC, Wargo JA, Robinson KC, Devi SP, Vanover JC, D'Orazio JA, McMahon M, Bosenberg MW, Haigis KM, Haber DA, Wang Y, Fisher DE. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature.* 2012 Nov 15;491(7424):449-53. doi: 10.1038/nature11624. PMID: 23123854; PMCID: PMC3521494.

Monaghan L, Massett ME, Bunschoten RP, Hoose A, Pirvan PA, Liskamp RMJ, Jørgensen HG, Huang X. The Emerging Role of H3K9me3 as a Potential Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol.* 2019 Aug 2;9:705. doi: 10.3389/fonc.2019.00705. PMID: 31428579; PMCID: PMC6687838.

Montagnani V, Benelli M, Apollo A, Pescucci C, Licastro D, Urso C, Gerlini G, Borgognoni L, Luzzatto L, Stecca B. Thin and thick primary cutaneous melanomas reveal distinct patterns of somatic copy number alterations. *Oncotarget.* 2016 May 24;7(21):30365-78. doi: 10.18632/oncotarget.8758. PMID: 27095580; PMCID: PMC5058686.

Mopin A, Leprêtre F, Sebda S, Villenet C, Ben Khoud M, Figeac M, Quesnel B, Brinster C. Detection of residual and chemoresistant leukemic cells in an immune-competent mouse model of acute myeloid leukemia: Potential for unravelling their interactions with immunity. *PLoS One.* 2022 Apr 29;17(4):e0267508. doi: 10.1371/journal.pone.0267508. PMID: 35486629; PMCID: PMC9053800.

Mori T, O'Day SJ, Umetani N, Martinez SR, Kitago M, Koyanagi K, Kuo C, Takeshima TL, Milford R, Wang HJ, Vu VD, Nguyen SL, Hoon DS. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 20;23(36):9351-8. doi: 10.1200/JCO.2005.02.9876. PMID: 16361635; PMCID: PMC2856438.

Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Puleo CA, Coventry BJ, Kashani-Sabet M, Smithers BM, Paul E, Kraybill WG, McKinnon JG, Wang HJ, Elashoff R, Faries MB; MSLT Group. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N Engl J Med.* 2014 Feb 13;370(7):599-609. doi: 10.1056/NEJMoa1310460. PMID: 24521106; PMCID: PMC4058881.

Mostowy S, Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Feb 8;13(3):183-94. doi: 10.1038/nrm3284. PMID: 22314400.

Murrell DH, Foster PJ, Chambers AF. Brain metastases from breast cancer: lessons from experimental magnetic resonance imaging studies and clinical implications. *J Mol Med (Berl).* 2014 Jan;92(1):5-12. doi: 10.1007/s00109-013-1108-z. PMID: 24306136.

Mwirigi, Anne, Richard Dillon, et Kavita Raj. 2017. «Acute Leukaemia». *Medicine* 45 (5): 280-86. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.02.010>.

Myron Kauffman H, McBride MA, Cherikh WS, Spain PC, Marks WH, Roza AM. Transplant tumor registry: donor related malignancies. *Transplantation.* 2002 Aug 15;74(3):358-62. doi: 10.1097/00007890-200208150-00011. PMID: 12177614.

Nazaryan-Petersen L, Bjerregaard VA, Nielsen FC, Tommerup N, Tümer Z. Chromothripsis and DNA Repair Disorders. *J Clin Med.* 2020 Feb 25;9(3):613. doi: 10.3390/jcm9030613. PMID: 32106411; PMCID: PMC7141117.

Nelson AA, Tsao H. Melanoma and genetics. *Clin Dermatol.* 2009 Jan-Feb;27(1):46-52. doi: 10.1016/j.clindermatol.2008.09.005. PMID: 19095153.

Niederhuber, John E.; Armitage, James O.; Doroshow, James H.; Kastan, Michael B.; and Tepper, Joel E., "Abeloff's Clinical Oncology (5th ed.)" (2014). *Faculty Bookshelf.* 35. <https://hsrc.himmelfarb.gwu.edu/books/35>

Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, Tiwari S, Kong L, Hanrahan AJ, Yao Z, Merghoub T, Ribas A, Chapman PB, Yaeger R, Taylor BS, Schultz N, Berger MF, Rosen N, Solit DB. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res.* 2014 Apr 15;74(8):2340-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2625. PMID: 24576830; PMCID: PMC4005042.

Nobre AR, Risson E, Singh DK, Di Martino JS, Cheung JF, Wang J, et al. Bone marrow NG2+ Nestin+ mesenchymal stem cells drive DTC dormancy via TGF- β 2. *Nature Cancer* 2021;2(3):327–39 doi 10.1038/s43018-021-00179-8.

Oestreich KJ, Yoon H, Ahmed R, Boss JM. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J Immunol.* 2008 Oct 1;181(7):4832-9. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4832. PMID: 18802087; PMCID: PMC2645436.

Onecha E, Rapado I, Luz Morales M, Carreño-Tarragona G, Martínez-Sánchez P, Gutierrez X, Sánchez Pina JM, Linares M, Gallardo M, Martínez-López J, Ayala R. Monitoring of clonal evolution of acute myeloid leukemia identifies the leukemia subtype, clinical outcome and potential new drug targets for post-remission strategies or relapse. *Haematologica.* 2021 Sep 1;106(9):2325-2333. doi: 10.3324/haematol.2020.254623. PMID: 32732356; PMCID: PMC8409047.

O'Reilly E, Zeinabad HA, Szegezdi E. Hematopoietic versus leukemic stem cell quiescence: Challenges and therapeutic opportunities. *Blood Rev.* 2021 Nov;50:100850. doi: 10.1016/j.blre.2021.100850. PMID: 34049731.

Orzan OA, Şandru A, Jecan CR. Controversies in the diagnosis and treatment of early cutaneous melanoma. *J Med Life.* 2015 Apr-Jun;8(2):132-41. PMID: 25866567; PMCID: PMC4392104.

Paluncic J, Kovacevic Z, Jansson PJ, Kalinowski D, Merlot AM, Huang ML, Lok HC, Sahni S, Lane DJ, Richardson DR. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1863(4):770-84. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.025. PMID: 26844774.

Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, Levine RL. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2012 Mar 22;366(12):1079-89. doi: 10.1056/NEJMoa1112304. PMID: 22417203; PMCID: PMC3545649.

Patel RP, Somasundram PM, Smith LK, Sheppard KE, McArthur GA. The therapeutic potential of targeting minimal residual disease in melanoma. *Clin Transl Med.* 2023 Mar;13(3):e1197. doi: 10.1002/ctm2.1197. PMID: 36967556; PMCID: PMC10040726.

Patton EE, Mueller KL, Adams DJ, Anandasabapathy N, Aplin AE, Bertolotto C, Bosenberg M, Ceol CJ, Burd CE, Chi P, Herlyn M, Holmen SL, Karreth FA, Kaufman CK, Khan S, Kobold S, Leucci E, Levy C, Lombard DB, Lund AW, Marie KL, Marine JC, Marais R, McMahon M, Robles-Espinoza CD, Ronai ZA, Samuels Y, Soengas MS, Villanueva J, Weeraratna AT, White RM, Yeh I, Zhu J, Zon LI, Hurlbert MS, Merlino G. Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer Cell.* 2021 May 10;39(5):610-631. doi: 10.1016/j.ccell.2021.01.011. PMID: 33545064; PMCID: PMC8378471.

Pavey SJ, Cummings MC, Whiteman DC, Castellano M, Walsh MD, Gabrielli BG, Green A, Hayward NK. Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion. *Melanoma Res.* 2002 Dec;12(6):539-47. doi: 10.1097/00008390-200212000-00003. PMID: 12459643.

Pedri D, Karras P, Landeloos E, Marine JC, Rambow F. Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *FEBS J.* 2022 Mar;289(5):1352-1368. doi: 10.1111/febs.16021. PMID: 33999497.

Perna F, Berman SH, Soni RK, Mansilla-Soto J, Eyquem J, Hamieh M, Hendrickson RC, Brennan CW, Sadelain M. Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen

Receptor Therapy of AML. *Cancer Cell*. 2017 Oct 9;32(4):506-519.e5. doi: 10.1016/j.ccell.2017.09.004. PMID: 29017060; PMCID: PMC7025434.

Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol*. 2004 Jul 27;14(14):R546-51. doi: 10.1016/j.cub.2004.07.007. PMID: 15268870.

Pollard JA, Alonzo TA, Gerbing RB, Woods WG, Lange BJ, Sweetser DA, Radich JP, Bernstein ID, Meshinchi S. FLT3 internal tandem duplication in CD34+/CD33- precursors predicts poor outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2764-9. doi: 10.1182/blood-2006-04-012260. PMID: 16809615; PMCID: PMC1895585.

Pollyea DA, DiNardo CD, Arellano ML, Pigneux A, Fiedler W, Konopleva M, Rizzieri DA, Smith BD, Shinagawa A, Lemoli RM, Dail M, Duan Y, Chyla B, Potluri J, Miller CL, Kantarjian HM. Impact of Venetoclax and Azacitidine in Treatment-Naïve Patients with Acute Myeloid Leukemia and IDH1/2 Mutations. *Clin Cancer Res*. 2022 Jul 1;28(13):2753-2761. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-3467. PMID: 35046058; PMCID: PMC9365354.

Preudhomme C, Plesa A, Roumier C. Maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes : aspects biologiques. *Hématologie* 2020 ; 26(supplément 1) : 5-18. doi : 10.1684/ hma.2020.1521

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol Rev*. 2018 Apr 1;98(2):559-621. doi: 10.1152/physrev.00044.2016. PMID: 29412049.

Profir, M.; Rosu, O.A.; Gaspar, B.S.; Cretoiu, S.M. Gut Microbiome and the Role of Its Metabolites as Promoters or Inhibitors in Gastrointestinal Cancers. In *Interdisciplinary Cancer Research*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2024; pp. 1–27.

Qiu J, Cheng Z, Jiang Z, Gan L, Zhang Z, Xie Z. Immunomodulatory Precision: A Narrative Review Exploring the Critical Role of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. 2024 May 17;25(10):5490. doi: 10.3390/ijms25105490. PMID: 38791528; PMCID: PMC11122264.

Quesnel B. Tumor dormancy and immunoescape. *APMIS*. 2008 Jul-Aug;116(7-8):685-94. doi: 10.1111/j.1600-0463.2008.01163.x. PMID: 18834412.

Quesnel B. Tumor dormancy: long-term survival in a hostile environment. *Adv Exp Med Biol*. 2013;734:181-200. doi: 10.1007/978-1-4614-1445-2_9. PMID: 23143980.

Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, Karras P, Brown D, Chang YH, Debiec-Rychter M *et al*: Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 2018, 174(4):843-855.e819.

Rambow F, Rogiers A, Marin-Bejar O, Aibar S, Femel J, Dewaele M, Karras P, Brown D, Chang YH, Debiec-Rychter M, Adriaens C, Radaelli E, Wolter P, Bechter O, Dummer R, Levesque M, Piris A, Frederick DT, Boland G, Flaherty KT, van den Oord J, Voet T, Aerts S, Lund AW, Marine JC. Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell*. 2018 Aug 9;174(4):843-855.e19. doi: 10.1016/j.cell.2018.06.025. PMID: 30017245.

Ravindran Menon D, Das S, Krepler C, Vultur A, Rinner B, Schauer S, Kashofer K, Wagner K, Zhang G, Bonyadi Rad E, Haass NK, Soyer HP, Gabrielli B, Somasundaram R, Hoefler G, Herlyn M, Schaidt H. A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene*. 2015 Aug 20;34(34):4448-59. doi: 10.1038/onc.2014.372. Erratum in: *Oncogene*. 2015 Aug 20;34(34):4545. doi: 10.1038/onc.2014.432. PMID: 25417704; PMCID: PMC4442085.

Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science*. 1980 Nov 7;210(4470):604-10. doi: 10.1126/science.6254144. PMID: 6254144.

Ren C, Morohashi K, Plotnikov AN, Jakoncic J, Smith SG, Li J, Zeng L, Rodriguez Y, Stojanoff V, Walsh M, Zhou MM. Small-molecule modulators of methyl-lysine binding for the CBX7 chromodomain. *Chem*

Biol. 2015 Feb 19;22(2):161-8. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.11.021. PMID: 25660273; PMCID: PMC4336573.

Ren X, Zhong G, Zhang Q, Zhang L, Sun Y, Zhang Z. Reconstruction of cell spatial organization from single-cell RNA sequencing data based on ligand-receptor mediated self-assembly. *Cell Res.* 2020 Sep;30(9):763-778. doi: 10.1038/s41422-020-0353-2. Erratum in: *Cell Res.* 2021 Dec;31(12):1319-1320. doi: 10.1038/s41422-021-00550-5. PMID: 32541867; PMCID: PMC7608415.

Rezard Q, Gerbedoen JC, Pekin D, Cleri F, Lagadec C and Tarhan MC: Developing A MemS Device for High-Throughput Multi-Parameter Single Cell Biophysical Analysis. . In: *IEEE 34th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS).* 2021: 494-497.

Risson E, Nobre AR, Maguer-Satta V, Aguirre-Ghiso JA. The current paradigm and challenges ahead for the dormancy of disseminated tumor cells. *Nat Cancer.* 2020 Jul;1(7):672-680. doi: 10.1038/s43018-020-0088-5. PMID: 33681821; PMCID: PMC7929485.

Robinson TM, Bowman RL, Persaud S, Liu Y, Neigenfind R, Gao Q, Zhang J, Sun X, Miles LA, Cai SF, Sciambi A, Llanso A, Famulare C, Goldberg A, Dogan A, Roshal M, Levine RL, Xiao W. Single-cell genotypic and phenotypic analysis of measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Sci Adv.* 2023 Sep 22;9(38):eadg0488. doi: 10.1126/sciadv.adg0488. PMID: 37729414; PMCID: PMC10881057.

Rodig N, Ryan T, Allen JA, Pang H, Grabie N, Chernova T, Greenfield EA, Liang SC, Sharpe AH, Lichtman AH, Freeman GJ. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. *Eur J Immunol.* 2003 Nov;33(11):3117-26. doi: 10.1002/eji.200324270. PMID: 14579280.

Rodríguez-Arbolí E, Othus M, Freeman SD, Buccisano F, Ngai LL, Thomas I, Palmieri R, Cloos J, Johnson S, Meddi E, Russell NH, Venditti A, Gradowska P, Ossenkoppelle GJ, Löwenberg B, Walter RB. Optimal prognostic threshold for measurable residual disease positivity by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia.* 2024 Oct;38(10):2266-2269. doi: 10.1038/s41375-024-02378-5. PMID: 39169114; PMCID: PMC11438566.

Ross MI, Gershenwald JE. Evidence-based treatment of early-stage melanoma. *J Surg Oncol.* 2011 Sep;104(4):341-53. doi: 10.1002/jso.21962. PMID: 21858828.

Rowling EJ, Miskolczi Z, Nagaraju R, Wilcock DJ, Wang P, Telfer B, Li Y, Lasheras-Otero I, Redondo-Muñoz M, Sharrocks AD, Arozarena I, Wellbrock C. Cooperative behaviour and phenotype plasticity evolve during melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020 Sep;33(5):695-708. doi: 10.1111/pcmr.12873. PMID: 32145051; PMCID: PMC7496243.

Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, Leon A, Pullambhatla M, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV, Wang C, Carter AB. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2018 Jan;20(1):4-27. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.11.003. PMID: 29154853.

Russo M, Chen M, Mariella E, Peng H, Rehman SK, Sancho E, Sogari A, Toh TS, Balaban NQ, Batlle E, Bernards R, Garnett MJ, Hangauer M, Leucci E, Marine JC, O'Brien CA, Oren Y, Patton EE, Robert C, Rosenberg SM, Shen S, Bardelli A. Cancer drug-tolerant persister cells: from biological questions to clinical opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2024 Oct;24(10):694-717. doi: 10.1038/s41568-024-00737-z. PMID: 39223250.

Salmanzadeh A, Sano MB, Gallo-Villanueva RC, Roberts PC, Schmelz EM, Davalos RV. Investigating dielectric properties of different stages of syngeneic murine ovarian cancer cells. *Biomechanics.* 2013 Jan 23;7(1):11809. doi: 10.1063/1.4788921. PMID: 24403991; PMCID: PMC3568086.

Sarhadi VK, Armengol G. Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules.* 2022 Jul 23;12(8):1021. doi: 10.3390/biom12081021. PMID: 35892331; PMCID: PMC9331210.

Sasidharan Nair V, El Salhat H, Taha RZ, John A, Ali BR, Elkord E. DNA methylation and repressive H3K9 and H3K27 trimethylation in the promoter regions of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, and PD-L1 genes in human primary breast cancer. *Clin Epigenetics*. 2018 Jun 15;10:78. doi: 10.1186/s13148-018-0512-1. PMID: 29983831; PMCID: PMC6003083.

Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J*. 2011 May;278(10):1598-609. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08089.x. PMID: 21395977.

Saudemont A, Quesnel B. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood*. 2004 Oct 1;104(7):2124-33. doi: 10.1182/blood-2004-01-0064. PMID: 15191948.

Scatena C, Murtas D, Tomei S. Cutaneous Melanoma Classification: The Importance of High-Throughput Genomic Technologies. *Front Oncol*. 2021 May 28;11:635488. doi: 10.3389/fonc.2021.635488. PMID: 34123788; PMCID: PMC8193952.

Selewa A, Dohn R, Eckart H, Lozano S, Xie B, Gauchat E, Elorbany R, Rhodes K, Burnett J, Gilad Y, Pott S, Basu A. Systematic Comparison of High-throughput Single-Cell and Single-Nucleus Transcriptomes during Cardiomyocyte Differentiation. *Sci Rep*. 2020 Jan 30;10(1):1535. doi: 10.1038/s41598-020-58327-6. PMID: 32001747; PMCID: PMC6992778.

Senft D, Ronai ZA. Immunogenic, cellular, and angiogenic drivers of tumor dormancy--a melanoma view. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016 Jan;29(1):27-42. doi: 10.1111/pcmr.12432. PMID: 26514653.

Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016 Jun;16(6):345-58. doi: 10.1038/nrc.2016.37. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2020 Jun;20(6):355. doi: 10.1038/s41568-020-0269-7. PMID: 27125352.

Shain AH, Joseph NM, Yu R, Benhamida J, Liu S, Prow T, Ruben B, North J, Pincus L, Yeh I, Judson R, Bastian BC. Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Incremental Disruption of Key Signaling Pathways during Melanoma Evolution. *Cancer Cell*. 2018 Jul 9;34(1):45-55.e4. doi: 10.1016/j.ccell.2018.06.005. PMID: 29990500; PMCID: PMC6319271.

Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, Dummer R, North J, Pincus L, Ruben B, Rickaby W, D'Arrigo C, Robson A, Bastian BC. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1926-36. doi: 10.1056/NEJMoa1502583. PMID: 26559571.

Sharma A, Cao EY, Kumar V, Zhang X, Leong HS, Wong AML, Ramakrishnan N, Hakimullah M, Teo HMV, Chong FT, Chia S, Thangavelu MT, Kwang XL, Gupta R, Clark JR, Periyasamy G, Iyer NG, DasGupta R. Longitudinal single-cell RNA sequencing of patient-derived primary cells reveals drug-induced infidelity in stem cell hierarchy. *Nat Commun*. 2018 Nov 22;9(1):4931. doi: 10.1038/s41467-018-07261-3. PMID: 30467425; PMCID: PMC6250721.

Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2010 Apr 2;141(1):69-80. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.027. PMID: 20371346; PMCID: PMC2851638.

Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13225-30. doi: 10.1073/pnas.1735528100. PMID: 14578449; PMCID: PMC263760.

Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:243-69. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142422. PMID: 16756492.

- Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2023 Mar;98(3):502-526. doi: 10.1002/ajh.26822. PMID: 36594187.
- Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, Taichman RS. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia*. 2008 May;22(5):941-50. doi: 10.1038/leu.2008.48. PMID: 18305549; PMCID: PMC5944299.
- Short NJ, Dillon R. Measurable residual disease monitoring in AML: Prospects for therapeutic decision-making and new drug development. *Am J Hematol*. 2024 Sep 25. doi: 10.1002/ajh.27482. PMID: 39319951.
- Shuikan A, Alharbi SA, Alkhalifah DHM, Hozzein WN. High-throughput sequencing and metagenomic data analysis. *Meta-genomics-Basics, Methods and Applications*. London, England: IntechOpen; 2019.
- Silva, M.; Martins, D.; Mendes, F. The Role of Immune Checkpoint Blockade in Acute Myeloid Leukemia. *Onco* 2022, 2, 164-180. <https://doi.org/10.3390/onco2030011>
- Sinha, A. & Mann, M. A beginner's guide to mass spectrometry-based proteomics. *The Biochemist* 42, 64–69 (2020).
- Sistigu A, Musella M, Galassi C, Vitale I, De Maria R. Tuning Cancer Fate: Tumor Microenvironment's Role in Cancer Stem Cell Quiescence and Reawakening. *Front Immunol*. 2020 Oct 21;11:2166. doi: 10.3389/fimmu.2020.02166. PMID: 33193295; PMCID: PMC7609361.
- Song Y, Li J, Zhu Y, Dai Y, Zeng T, Liu L, Li J, Wang H, Qin Y, Zeng M, Guan XY, Li Y. MicroRNA-9 promotes tumor metastasis via repressing E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014 Nov 30;5(22):11669-80. doi: 10.18632/oncotarget.2581. PMID: 25375090; PMCID: PMC4294333.
- Song Y, Wu F, Wu J. Targeting histone methylation for cancer therapy: enzymes, inhibitors, biological activity and perspectives. *J Hematol Oncol*. 2016 Jun 17;9(1):49. doi: 10.1186/s13045-016-0279-9. PMID: 27316347; PMCID: PMC4912745.
- Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*. 2014 Sep;14(9):611-22. doi: 10.1038/nrc3793. PMID: 25118602; PMCID: PMC4230700.
- Sosa MS, Parikh F, Maia AG, Estrada Y, Bosch A, Bragado P, Ekpin E, George A, Zheng Y, Lam HM, Morrissey C, Chung CY, Farias EF, Bernstein E, Aguirre-Ghiso JA. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes. *Nat Commun*. 2015 Jan 30;6:6170. doi: 10.1038/ncomms7170. PMID: 25636082; PMCID: PMC4313575.
- Spiers L, Coupe N, Payne M. Toxicities associated with checkpoint inhibitors-an overview. *Rheumatology (Oxford)*. 2019 Dec 1;58(Suppl 7):vii7-vii16. doi: 10.1093/rheumatology/kez418. PMID: 31816085; PMCID: PMC6900917.
- Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, Lundmark A, Navarro JF, Magnusson J, Giacomello S, Asp M, Westholm JO, Huss M, Mollbrink A, Linnarsson S, Codeluppi S, Borg Å, Pontén F, Costea PI, Sahlén P, Mulder J, Bergmann O, Lundeberg J, Frisén J. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*. 2016 Jul 1;353(6294):78-82. doi: 10.1126/science.aaf2403. PMID: 27365449.
- Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, Mims AS, Pratz KW, Savona MR, Stein AS, Stone RM, Winer ES, Seet CS, Döhner H, Pollyea DA, McCloskey JK, Odenike O, Löwenberg B, Ossenkoppele GJ, Patel PA, Roshal M, Frattini MG, Lersch F, Franovic A, Nabhan S, Fan B, Choe S, Wang H, Wu B, Hua L, Almon C, Cooper M, Kantarjian HM, Tallman MS. Ivosidenib or enasidenib combined with intensive chemotherapy in patients with newly diagnosed AML: a phase 1 study. *Blood*. 2021 Apr 1;137(13):1792-1803. doi: 10.1182/blood.2020007233. PMID: 33024987; PMCID: PMC8020270.

- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5. doi: 10.1038/47412. PMID: 10638745.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):719-24. doi: 10.1038/nature07943. PMID: 19360079; PMCID: PMC2821689.
- Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 May;16(5):564-71. doi: 10.1038/nsmb.1594. PMID: 19377480.
- Su Y, Wei W, Robert L, Xue M, Tsoi J, Garcia-Diaz A, Homet Moreno B, Kim J, Ng RH, Lee JW, Koya RC, Comin-Anduix B, Graeber TG, Ribas A, Heath JR. Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Dec 26;114(52):13679-13684. doi: 10.1073/pnas.1712064115. PMID: 29229836; PMCID: PMC5748184.
- Suvà ML, Tirosh I. Single-Cell RNA Sequencing in Cancer: Lessons Learned and Emerging Challenges. *Mol Cell*. 2019 Jul 11;75(1):7-12. doi: 10.1016/j.molcel.2019.05.003. PMID: 31299208.
- Takayama Y, Perret G, Kumemura M, Ataka M, Meignan S, Karsten SL, Fujita H, Collard D, Lagadec C, Tarhan MC. Developing a MEMS Device with Built-in Microfluidics for Biophysical Single Cell Characterization. *Micromachines (Basel)*. 2018 Jun 1;9(6):275. doi: 10.3390/mi9060275. PMID: 30424208; PMCID: PMC6187549.
- Tallón de Lara P, Castañón H, Vermeer M, Núñez N, Silina K, Sobottka B, Urdinez J, Cecconi V, Yagita H, Movahedian Attar F, Hiltbrunner S, Glarner I, Moch H, Tugues S, Becher B, van den Broek M. CD39⁺PD-1⁺CD8⁺ T cells mediate metastatic dormancy in breast cancer. *Nat Commun*. 2021 Feb 3;12(1):769. doi: 10.1038/s41467-021-21045-2. PMID: 33536445; PMCID: PMC7859213.
- Tazi Y, Arango-Ossa JE, Zhou Y, Bernard E, Thomas I, Gilkes A, Freeman S, Pradat Y, Johnson SJ, Hills R, Dillon R, Levine MF, Leongamornlert D, Butler A, Ganser A, Bullinger L, Döhner K, Ottmann O, Adams R, Döhner H, Campbell PJ, Burnett AK, Dennis M, Russell NH, Devlin SM, Huntly BJP, Papaemmanuil E. Unified classification and risk-stratification in Acute Myeloid Leukemia. *Nat Commun*. 2022 Aug 8;13(1):4622. doi: 10.1038/s41467-022-32103-8. PMID: 35941135; PMCID: PMC9360033.
- Teixidó C, González-Cao M, Karachaliou N, Rosell R. Predictive factors for immunotherapy in melanoma. *Ann Transl Med*. 2015 Sep;3(15):208. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.07. PMID: 26488004; PMCID: PMC4583591.
- Tenney K, Shilatifard A. A COMPASS in the voyage of defining the role of trithorax/MLL-containing complexes: linking leukemogenesis to covalent modifications of chromatin. *J Cell Biochem*. 2005 Jun 1;95(3):429-36. doi: 10.1002/jcb.20421. PMID: 15786493.
- Thompson, J.F., Mozzillo, N. and Ross, M.I. (2020) 'Local Melanoma Recurrence, Satellitosis, and In-transit Metastasis: Incidence, Outcomes, and Selection of Treatment Options', in C.M. Balch et al. (eds) *Cutaneous Melanoma*. Cham: Springer International Publishing, pp. 867–894.
- Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet*. 2009 Aug 1;374(9687):362-5. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61397-0. PMID: 19647595.
- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961 Feb;14:213-22. PMID: 13776896.
- Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, Laino L, De Francesco F, Papaccio G. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013 Jan;27(1):13-24. doi: 10.1096/fj.12-218222. PMID: 23024375.
- Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH 2nd, Treacy D, Trombetta JJ, Rotem A, Rodman C, Lian C, Murphy G, Fallahi-Sichani M, Dutton-Regester K, Lin JR, Cohen O, Shah P, Lu D, Genshaft AS,

Hughes TK, Ziegler CG, Kazer SW, Gaillard A, Kolb KE, Villani AC, Johannessen CM, Andreev AY, Van Allen EM, Bertagnoli M, Sorger PK, Sullivan RJ, Flaherty KT, Frederick DT, Jané-Valbuena J, Yoon CH, Rozenblatt-Rosen O, Shalek AK, Regev A, Garraway LA. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016 Apr 8;352(6282):189-96. doi: 10.1126/science.aad0501. PMID: 27124452; PMCID: PMC4944528.

Toledo-Guzmán ME, Bigoni-Ordóñez GD, Ibáñez Hernández M, Ortiz-Sánchez E. Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World J Stem Cells*. 2018 Dec 26;10(12):183-195. doi: 10.4252/wjsc.v10.i12.183. PMID: 30613312; PMCID: PMC6306557.

Touil Y, Latreche-Carton C, Bouazzati HE, Nugues AL, Jouy N, Thuru X, Laine W, Lepretre F, Figeac M, Tardivel M, Kluza J, Idziorek T, Quesnel B. p65/RelA NF- κ B fragments generated by RIPK3 activity regulate tumorigenicity, cell metabolism, and stemness characteristics. *J Cell Biochem*. 2022 Mar;123(3):543-556. doi: 10.1002/jcb.30198. PMID: 34927768; PMCID: PMC9299825.

Touil Y, Segard P, Ostyn P, Begard S, Asporc C, El Machhour R, Masselot B, Vandomme J, Flamenco P, Idziorek T, Figeac M, Formstecher P, Quesnel B, Polakowska R. Melanoma dormancy in a mouse model is linked to GILZ/FOXO3A-dependent quiescence of disseminated stem-like cells. *Sci Rep*. 2016 Jul 28;6:30405. doi: 10.1038/srep30405. PMID: 27465291; PMCID: PMC4964333.

Touil Y, Zuliani T, Wolowczuk I, Kuranda K, Prochazkova J, Andrieux J, Le Roy H, Mortier L, Vandomme J, Jouy N, Masselot B, Ségard P, Quesnel B, Formstecher P, Polakowska R. The PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low-Rhodamine123-retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity. *Stem Cells*. 2013 Apr;31(4):641-51. doi: 10.1002/stem.1333. PMID: 23355370.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8681-6. doi: 10.1073/pnas.96.15.8681. PMID: 10411935; PMCID: PMC17576.

Triana-Martínez F, Loza MI, Domínguez E. Beyond Tumor Suppression: Senescence in Cancer Stemness and Tumor Dormancy. *Cells*. 2020 Feb 3;9(2):346. doi: 10.3390/cells9020346. PMID: 32028565; PMCID: PMC7072600.

Trumpp A, Wiestler OD. Mechanisms of Disease: cancer stem cells--targeting the evil twin. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008 Jun;5(6):337-47. doi: 10.1038/ncponc1110. PMID: 18431377.

Tsuji T, Ibaragi S, Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res*. 2009 Sep 15;69(18):7135-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1618. PMID: 19738043; PMCID: PMC2760965.

Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, Wilmot B, Kurtz SE, Savage SL, Long N, Schultz AR, Traer E, Abel M, Agarwal A, Blucher A, Borate U, Bryant J, Burke R, Carlos A, Carpenter R, Carroll J, Chang BH, Coblenz C, d'Almeida A, Cook R, Danilov A, Dao KT, Degnin M, Devine D, Dibb J, Edwards DK 5th, Eide CA, English I, Glover J, Henson R, Ho H, Jemal A, Johnson K, Johnson R, Junio B, Kaempf A, Leonard J, Lin C, Liu SQ, Lo P, Loriaux MM, Luty S, Macey T, MacManiman J, Martinez J, Mori M, Nelson D, Nichols C, Peters J, Ramsdill J, Rofelty A, Schuff R, Searles R, Segerdell E, Smith RL, Spurgeon SE, Sweeney T, Thapa A, Visser C, Wagner J, Watanabe-Smith K, Werth K, Wolf J, White L, Yates A, Zhang H, Cogle CR, Collins RH, Connolly DC, Deininger MW, Drusbosky L, Hourigan CS, Jordan CT, Kropf P, Lin TL, Martinez ME, Medeiros BC, Pallapati RR, Pollyea DA, Swords RT, Watts JM, Weir SJ, Wiest DL, Winters RM, McWeeney SK, Druker BJ. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. *Nature*. 2018 Oct;562(7728):526-531. doi: 10.1038/s41586-018-0623-z. PMID: 30333627; PMCID: PMC6280667.

Urbán N, Cheung TH. Stem cell quiescence: the challenging path to activation. *Development*. 2021 Feb 8;148(3):dev165084. doi: 10.1242/dev.165084. PMID: 33558315; PMCID: PMC7888710.

van der Lee DI, Reijmers RM, Honders MW, Hagedoorn RS, de Jong RC, Kester MG, van der Steen DM, de Ru AH, Kweekel C, Bijen HM, Jedema I, Veelken H, van Veelen PA, Heemskerk MH, Falkenburg

- JHF, Griffioen M. Mutated nucleophosmin 1 as immunotherapy target in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2019 Feb 1;129(2):774-785. doi: 10.1172/JCI97482. PMID: 30640174; PMCID: PMC6355238.
- Vandyck HH, Hillen LM, Bosisio FM, van den Oord J, Zur Hausen A, Winnepeninckx V. Rethinking the biology of metastatic melanoma: a holistic approach. *Cancer Metastasis Rev*. 2021 Jun;40(2):603-624. doi: 10.1007/s10555-021-09960-8. PMID: 33870460; PMCID: PMC8213587.
- van Galen P, Hovestadt V, Wadsworth li MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S, Verga JA, Stephansky J, Pastika TJ, Lombardi Story J, Pinkus GS, Pozdnyakova O, Galinsky I, Stone RM, Graubert TA, Shalek AK, Aster JC, Lane AA, Bernstein BE. Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. *Cell*. 2019 Mar 7;176(6):1265-1281.e24. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.031. PMID: 30827681; PMCID: PMC6515904.
- van Velthoven CTJ, Rando TA. Stem Cell Quiescence: Dynamism, Restraint, and Cellular Idling. *Cell Stem Cell*. 2019 Feb 7;24(2):213-225. doi: 10.1016/j.stem.2019.01.001. PMID: 30735649; PMCID: PMC6413865.
- Velten L, Haas SF, Raffel S, Blaszkiewicz S, Islam S, Hennig BP, Hirche C, Lutz C, Buss EC, Nowak D, Boch T, Hofmann WK, Ho AD, Huber W, Trumpp A, Essers MA, Steinmetz LM. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol*. 2017 Apr;19(4):271-281. doi: 10.1038/ncb3493. PMID: 28319093; PMCID: PMC5496982.
- Vergara IA, Mintoff CP, Sandhu S, McIntosh L, Young RJ, Wong SQ, Colebatch A, Cameron DL, Kwon JL, Wolfe R, Peng A, Ellul J, Dou X, Fedele C, Boyle S, Arnau GM, Raleigh J, Hatzimihalis A, Szeto P, Mooi J, Widmer DS, Cheng PF, Amann V, Dummer R, Hayward N, Wilmott J, Scolyer RA, Cho RJ, Bowtell D, Thorne H, Alsop K, Cordner S, Woodford N, Leditschke J, O'Brien P, Dawson SJ, McArthur GA, Mann GJ, Levesque MP, Papenfuss AT, Shackleton M. Evolution of late-stage metastatic melanoma is dominated by aneuploidy and whole genome doubling. *Nat Commun*. 2021 Mar 4;12(1):1434. doi: 10.1038/s41467-021-21576-8. PMID: 33664264; PMCID: PMC7933255.
- Vidal A, Redmer T. Tracking of Melanoma Cell Plasticity by Transcriptional Reporters. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 21;23(3):1199. doi: 10.3390/ijms23031199. PMID: 35163127; PMCID: PMC8835814.
- Vishnoi M, Peddibhotla S, Yin W, T Scamardo A, George GC, Hong DS, Marchetti D. The isolation and characterization of CTC subsets related to breast cancer dormancy. *Sci Rep*. 2015 Dec 3;5:17533. doi: 10.1038/srep17533. PMID: 26631983; PMCID: PMC4668355.
- Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):314-22. doi: 10.1038/nature09781. PMID: 21248838.
- Voeltzel T, Fossard G, Degaud M, Geistlich K, Gadot N, Jeanpierre S, Mikaelian I, Brevet M, Anginot A, Le Bousse-Kerdilès MC, Trichet V, Lefort S, Maguer-Satta V. A minimal standardized human bone marrow microphysiological system to assess resident cell behavior during normal and pathological processes. *Biomater Sci*. 2022 Jan 18;10(2):485-498. doi: 10.1039/d1bm01098k. PMID: 34904143.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988 Sep 1;319(9):525-32. doi: 10.1056/NEJM198809013190901. PMID: 2841597.
- Wade PA, Pruss D, Wolffe AP. Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci*. 1997 Apr;22(4):128-32. doi: 10.1016/s0968-0004(97)01016-5. PMID: 9149532.
- Wang EJ, Chen IH, Kuo BY, Yu CC, Lai MT, Lin JT, Lin LY, Chen CM, Hwang T, Sheu JJ. Alterations of Cytoskeleton Networks in Cell Fate Determination and Cancer Development. *Biomolecules*. 2022 Dec 13;12(12):1862. doi: 10.3390/biom12121862. PMID: 36551290; PMCID: PMC9775460.
- Wang H, Yu C, Gao X, Welte T, Muscarella AM, Tian L, Zhao H, Zhao Z, Du S, Tao J, Lee B, Westbrook TF, Wong ST, Jin X, Rosen JM, Osborne CK, Zhang XH. The osteogenic niche promotes early-stage

bone colonization of disseminated breast cancer cells. *Cancer Cell*. 2015 Feb 9;27(2):193-210. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.017. PMID: 25600338; PMCID: PMC4326554.

Wang J, Perry CJ, Meeth K, Thakral D, Damsky W, Micevic G, Kaech S, Blenman K, Bosenberg M. UV-induced somatic mutations elicit a functional T cell response in the YUMMER1.7 mouse melanoma model. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2017 Jul;30(4):428-435. doi: 10.1111/pcmr.12591. PMID: 28379630; PMCID: PMC5820096.

Wang J, Chen S, Xiao W, Li W, Wang L, Yang S, Wang W, Xu L, Liao S, Liu W, Wang Y, Liu N, Zhang J, Xia X, Kang T, Chen G, Cai X, Yang H, Zhang X, Lu Y, Zhou P. CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2018 Jan 10;11(1):7. doi: 10.1186/s13045-017-0553-5. PMID: 29316944; PMCID: PMC5761206.

Wang X, Haswell JR, Roberts CW. Molecular pathways: SWI/SNF (BAF) complexes are frequently mutated in cancer--mechanisms and potential therapeutic insights. *Clin Cancer Res*. 2014 Jan 1;20(1):21-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0280. PMID: 24122795; PMCID: PMC3947303.

Wang Y, Wang L, Wei Y, Wei C, Yang H, Chen Q, Zhang R, Shen H. Advances in the molecular regulation mechanism of tumor dormancy and its therapeutic strategy. *Discov Oncol*. 2024 May 25;15(1):184. doi: 10.1007/s12672-024-01049-2. PMID: 38795254; PMCID: PMC11127899.

Warszynska,M.; Repetowski,P.; Da browski, J.M. Photodynamic therapy combined with immunotherapy: Recent advances and future research directions. *Coord. Chem. Rev*. 2023, 495, 215350.

Watson M, Geller AC, Tucker MA, Guy GP Jr, Weinstock MA. Melanoma burden and recent trends among non-Hispanic whites aged 15-49years, United States. *Prev Med*. 2016 Oct;91:294-298. doi: 10.1016/j.ypmed.2016.08.032. PMID: 27565055; PMCID: PMC5146952.

Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, Frazier WA, Roberts DD, Steeg PS. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res*. 1994 Dec 15;54(24):6504-11. PMID: 7527299.

Werner-Klein M, Scheitler S, Hoffmann M, Hodak I, Dietz K, Lehnert P, Naimer V, Polzer B, Treitschke S, Werno C, Markiewicz A, Weidele K, Czyz Z, Hohenleutner U, Hafner C, Haferkamp S, Berneburg M, Rümmele P, Ulmer A, Klein CA. Genetic alterations driving metastatic colony formation are acquired outside of the primary tumour in melanoma. *Nat Commun*. 2018 Feb 9;9(1):595. doi: 10.1038/s41467-017-02674-y. PMID: 29426936; PMCID: PMC5807512.

Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. 2015 Aug;15(8):486-99. doi: 10.1038/nri3862. PMID: 26205583; PMCID: PMC4889009.

Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006 Feb;6(2):93-106. doi: 10.1038/nri1779. PMID: 16491134.

Wilson BG, Wang X, Shen X, McKenna ES, Lemieux ME, Cho YJ, Koellhoffer EC, Pomeroy SL, Orkin SH, Roberts CW. Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010 Oct 19;18(4):316-28. doi: 10.1016/j.ccr.2010.09.006. Erratum in: *Cancer Cell*. 2011 Jan 18;19(1):153. PMID: 20951942; PMCID: PMC2957473.

Wozniak RJ, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene*. 2007 Jan 4;26(1):77-90. doi: 10.1038/sj.onc.1209763. PMID: 16799634.

Wu Y, Chen M, Wu P, Chen C, Xu ZP, Gu W. Increased PD-L1 expression in breast and colon cancer stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017 May;44(5):602-604. doi: 10.1111/1440-1681.12732. PMID: 28107571.

Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Dipersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014 Dec;20(12):1472-8. doi: 10.1038/nm.3733. PMID: 25326804; PMCID: PMC4313872.

Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, Fang J, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, Taylor-Papadimitriou J, Tempst P, Zhang Y. PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol Cell*. 2007 Mar 23;25(6):801-12. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.001. PMID: 17363312.

Yang X, Noshmehr H, Han H, Andreu-Vieyra C, Liang G, Jones PA. Gene reactivation by 5-aza-2'-deoxycytidine-induced demethylation requires SRCAP-mediated H2A.Z insertion to establish nucleosome depleted regions. *PLoS Genet*. 2012;8(3):e1002604. doi: 10.1371/journal.pgen.1002604. PMID: 22479200; PMCID: PMC3315468.

Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res*. 2011 Dec;9(12):1608-20. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0568. PMID: 21840933.

Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, Moradian A, Morin RD, Mungall AJ, Meissner B, Boyle M, Marquez VE, Marra MA, Gascoyne RD, Humphries RK, Arrowsmith CH, Morin GB, Aparicio SA. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2451-9. doi: 10.1182/blood-2010-11-321208. PMID: 21190999; PMCID: PMC3062411.

Yeh YT, Hur SS, Chang J, Wang KC, Chiu JJ, Li YS, Chien S. Matrix stiffness regulates endothelial cell proliferation through septin 9. *PLoS One*. 2012;7(10):e46889. doi: 10.1371/journal.pone.0046889. PMID: 23118862; PMCID: PMC3485289.

Yeh I, Bastian BC. Melanoma pathology: new approaches and classification. *Br J Dermatol*. 2021 Aug;185(2):282-293. doi: 10.1111/bjd.20427. PMID: 34060071; PMCID: PMC9292921.

Young AL, Challen GA, Birman BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun*. 2016 Aug 22;7:12484. doi: 10.1038/ncomms12484. PMID: 27546487; PMCID: PMC4996934.

Younis,A.; Gribben,J. Immune Checkpoint Inhibitors: Fundamental Mechanisms, Current Status and Future Directions. *Immuno* 2024, 4, 186–210

Zaib S, Rana N, Khan I. Histone Modifications and their Role in Epigenetics of Cancer. *Curr Med Chem*. 2022;29(14):2399-2411. doi: 10.2174/0929867328666211108105214. PMID: 34749606.

Zeichner SB, Arellano ML. Secondary Adult Acute Myeloid Leukemia: a Review of Our Evolving Understanding of a Complex Disease Process. *Curr Treat Options Oncol*. 2015 Aug;16(8):37. doi: 10.1007/s11864-015-0355-3. PMID: 26143266.

Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, Hanekamp D, Kelder A, Carbaat-Ham JC, Oussoren-Brockhoff YJM, Snel AN, Veldhuizen D, Scholten WJ, Maertens J, Breems DA, Pabst T, Manz MG, van der Velden VHJ, Slomp J, Preijers F, Cloos J, van de Loosdrecht AA, Löwenberg B, Valk PJM, Jongen-Lavrencic M, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. CD34⁺CD38⁻ leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019 May;33(5):1102-1112. doi: 10.1038/s41375-018-0326-3. PMID: 30542144.

Zelenay S, van der Veen AG, Böttcher JP, Snelgrove KJ, Rogers N, Acton SE, Chakravarty P, Girotti MR, Marais R, Quezada SA, Sahai E, Reis e Sousa C. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*. 2015 Sep 10;162(6):1257-70. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.015. PMID: 26343581; PMCID: PMC4597191.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007 Feb 1;302(1):1-12. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.08.028. PMID: 16989803.

Zhang Y, Vorobiev SM, Gibson BG, Hao B, Sidhu GS, Mishra VS, Yarmola EG, Bubb MR, Almo SC, Southwick FS. A CapG gain-of-function mutant reveals critical structural and functional determinants for actin filament severing. *EMBO J.* 2006 Oct 4;25(19):4458-67. doi: 10.1038/sj.emboj.7601323. PMID: 16977317; PMCID: PMC1589989.

Zhao EY, Jones M, Jones SJM. Whole-Genome Sequencing in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019 Mar 1;9(3):a034579. doi: 10.1101/cshperspect.a034579. PMID: 29844223; PMCID: PMC6396343.

Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet.* 1996 Jan;12(1):97-9. doi: 10.1038/ng0196-97. PMID: 8528263.

GUIDE DE BONNES PRATIQUES DES PONCTIONS MEDULLAIRES

Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (CFHC)

CPTAC, N. CPTAC | office of cancer clinical proteomics research.

Société Française d'Hématologie (SFH)