

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations	xv
Remerciements.....	xxi
Chapitre I – Introduction.....	1
1. L'hématopoïèse	1
1.1 Les sites de l'hématopoïèse chez l'humain.....	2
1.2 Les cellules souches hématopoïétiques.....	3
1.2.1 Autorenouvellement.....	5
1.2.2 Différenciation cellulaire.....	6
1.3 Régulation.....	9
2. Les leucémies.....	11
2.1 Définition et classification des leucémies	12
2.2 Les leucémies aiguës.....	15
2.2.1 Leucémies lymphoïdes aiguës.....	15
2.2.1.1 Les leucémies lymphoïdes aiguës de type B.....	15
2.2.1.2 Les leucémies lymphoïdes aiguës de type T.....	16
2.2.2 Leucémies myéloïdes aiguës.....	17
2.2.3 Leucémies aiguës de phénotype mixte.....	19
3. Le gène <i>MLL</i>	19
3.1 Caractérisation du gène et de la protéine <i>MLL</i>	20
3.2 Rôle de la protéine <i>MLL</i> dans la régulation de la transcription.....	23
3.3 Translocations chromosomiques de <i>MLL</i> dans les leucémies	24
3.3.1 Partenaires de fusion communs de <i>MLL</i>	25
3.4 La fusion <i>MLL-ENL</i>	27
3.5 Modélisation <i>in vivo</i> de leucémies aiguës humaines <i>MLL</i>	30
4. Hypothèses et objectifs	31
4.1 Problématique	31

4.2 Hypothèse et objectifs	31
Chapitre II – Matériel et méthodes	33
1. Purification de cellules souches/progénitrices hématopoïétiques de sang de cordon ombilical humain par sélection négative	33
2. Technique de clonage	34
2.1 Les plasmides	34
2.2 Production d'ADN	35
3. Production de virus par transfection au phosphate de calcium	36
3.1 Titration de virus	37
4. Infection de cellules souches/progénitrices hématopoïétiques par les rétrovirus	38
5. Xénogreffe des cellules infectées dans un modèle <i>in vivo</i>	39
5.1 Souris NSG	39
5.2 Irradiation des souris	40
5.3 Injection intra-fémorale	40
5.4 Euthanasie et prélèvement des cellules pour analyse	41
6. La cytométrie en flux	42
6.1 Analyse des leucémies primaires	42
6.2 Analyse des leucémies secondaires	43
7. Infection des cellules leucémiques primaires par les lentivirus	43
8. Triage des cellules marquées en eGFP/BFP et injection des souris secondaires	44
Chapitre III – Résultats	45
1. Leucémies primaires MLL-ENL LoxP eGFP	45
1.1 Expression du marqueur eGFP dans les cellules transduites par les rétrovirus	45
1.2 Analyse et caractérisation des xénogreffes dans les souris primaires	45
1.2.1 Analyse de cellules de la moelle osseuse par cytométrie en flux	47
1.2.2 Analyse de cellules de la rate par cytométrie en flux	50
2. Leucémies secondaires MLL-ENL LoxP eGFP avec cre recombinaise	52
2.1 Expression du marqueur BFP dans les cellules transduites par les lentivirus et tri cellulaire	53
2.1.1 Survie et prolifération <i>in vitro</i> suivant le tri cellulaire	54
2.2 Analyse et caractérisation des xénogreffes dans les souris secondaires	55
Chapitre IV – Discussion et Conclusion	61
1. Discussion	61
1.1 Les leucémies primaires MLL-ENL-LoxP eGFP	61

1.2 Les leucémies secondaires MLL-ENL LoxP avec cre recombinaison.....	63
2. Perspectives et conclusion	65
Bibliographie	67

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des résultats pour les souris primaires	46
Tableau 2 : Résumé des résultats pour les souris secondaires	57

Liste des figures

Figure 1 : Principaux sites de hématopoïèse chez l'homme en période pré et post-natale.....	3
Figure 2 : Capacité d'autorenouvellement des différentes cellules souches et progénitrices.....	6
Figure 3 : Types de division cellulaire des cellules souches hématopoïétiques.....	6
Figure 4 : Différents stades de maturation des lymphocytes B et leurs principaux marqueurs.....	8
Figure 5 : Schématisation simplifiée du système hématopoïétique.....	9
Figure 6 : Principales cytokines régulatrices de l'hématopoïèse.....	10
Figure 7 : Schématisation du processus leucémogénique derrière les leucémies aigües.....	13
Figure 8 : Nouveaux cas de leucémies diagnostiqués en 2012 au Canada et au Québec par sous-type.....	14
Figure 9 : Localisation chromosomique et principales composantes du gène MLL.....	23
Figure 10 : Translocation chromosomique menant à une fusion MLL.....	25
Figure 11 : Cohorte de leucémies issues des principaux réarrangements MLL.....	27
Figure 12 : Structure et interactions avec le super complexe d'élongation de MLL et de la protéine chimérique MLL-ENL.....	29
Figure 13 : Moyenne du poids des rates de souris non-leucémiques et leucémiques.....	47
Figure 14 : Analyse au FACS avec CD45 et eGFP des cellules de 3 moelles osseuses représentatives des types de résultats obtenus.....	48
Figure 15 : Analyse au FACS avec CD33 et CD19 des cellules de 3 moelles osseuses représentatives des types de résultats obtenus.....	49
Figure 16 : Caractérisation au FACS du stade de différenciation des cellules de 3 moelles osseuses représentatives des types de résultats obtenus.....	50
Figure 17 : Analyse au FACS avec CD45 et eGFP des cellules issues de la moelle osseuse d'une souris primaire leucémique avec celles issues de sa rate.....	51
Figure 18 : Caractérisation au FACS du phénotype leucémique des cellules de la rate d'une souris primaire en le comparant avec le phénotype de celles retrouvées dans sa moelle osseuse.....	52
Figure 19 : Prolifération cellulaire cumulative in vitro des fractions cellulaires triées.....	55
Figure 20 : Analyse au FACS avec CD45 et eGFP des leucémies secondaires engendrées par les 3 premiers types de contrôles positifs.....	56
Figure 21 : Analyse au FACS de cellules de moelle osseuse de deux souris représentatives de leur groupe respectif issues de la transfection avec l'un ou l'autre des lentivirus.....	58

Liste des abréviations

AF : ALL1-fused (**AF9** : ALL1-fused gene from chromosome 9 ...)
ALL1 : Acute lymphoblastic leukemia-1 (autre nom pour le gène MLL)
APC : Allophycocyanine
ARNPII : ARN polymerase II
BCR : Breakpoint cluster region
BFP : Blue fluorescent protein
BSA : Albumine de sérum bovin
CaCl₂ : Chlorure de calcium
CBP : CREB-binding protein
CCS : Cosmic calf serum
CPL : Cellule progénitrice lymphoïde
CPM : Cellule progénitrice myéloïde
CREB : Cyclic AMP response element-binding protein
CSH : Cellule souche hématopoïétique
CSH-CT : Cellule souche hématopoïétique à court-terme
CSH-LT : Cellule souche hématopoïétique à long-terme
CSL : Cellule souche leucémique
Cyp33 : Cyclophiline 33
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DOT1L : Disruptor of telomeric silencing 1 like
EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique
eGFP : Enhanced green fluorescent protein
ENL : Eleven-Nineteen-Leukemia (gène ou protéine)
Epo : Erythropoïétine
FAB : Classification des leucémies franco-américano-britannique
FACS : Fluorescence-activated cell sorting (cytométrie de flux)
FCS : Foetal calf serum
FLT-3 ligand : ligand FMS-like tyrosine kinase 3
FYRC : Domaine FY-rich C-terminal
FYRN : Domaine FY-rich N-terminal
G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF : Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GT : Gene transfer (milieu de culture cellulaire)
H3K4 : Lysine 4 de l'histone 3
H3K4me3 : Lysine 4 de l'histone 3 triméthylée
H3K79 : Lysine 79 de l'histone 3

HBS : HEPES buffered saline
HOX : Nom dérivé de « homeotic-complex » référant aux gènes de plusieurs complexes homéotiques
HOXA : Groupe A des gènes HOX
HRX : Human trithorax (autre nom pour le gène MLL)
IL : Interleukine (**IL-1** : Interleukine 1, **IL-2** : Interleukine 2 ...)
IL-2R γ : Chaîne gamma du récepteur de l'interleukine 2
IMDM : Iscove's modified Dulbecco's medium
KMT2A : Histone-Lysine N-méthyltransferase-2A (autre nom pour le gène MLL)
LAPM : Leucémie aiguë de phénotype mixte
LB : Milieu Luria Broth
LIF : Leukemia inhibiting factor
Lin- : Sans marqueur de lignée spécifique
LLA : Leucémie lymphoïde aiguë
LLA-B : Leucémie lymphoïde aiguë de type B
LLA-T : Leucémie lymphoïde aiguë de type T
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LMA : Leucémie myéloïde aiguë
LMC : Leucémie myéloïde chronique
LoxP : Locus of X(cross)-over in P1
LTR : Long terminal repeat
MCS : Site de clonage multiple
M-CSF : Macrophage-colony stimulating factor
MEM- α : Minimum essential medium alpha
MLL : Mixed lineage leukemia (gène ou protéine)
MLL-C : Unité C-terminal de MLL (protéine) ou partie C-terminal de MLL (gène)
MLL-N : Unité N-terminal de MLL (protéine) ou partie N-terminal de MLL (gène)
MSCV : Murine stem cell virus (vecteur)
NHEJ : Jonction d'extrémités non-homologues
NK : Natural Killer (cellule)
NOD : Non-obese diabetic (souche murine)
NSG : NOD.Cg-Pkdc^{Scid}Il2rg^{Tm1Wjl}/SzJ (souche murine)
OMS : Organisation mondiale de la santé
PBS : Phosphate-buffered saline
PC5 : PhycoérythrineCyanine 5.1
PcG : Groupe de protéine Polycomb
PE : Phycoérythrine
PGK : Phosphoglycerate kinase
PHD : Plant homeodomain (**PHD1** : Plant homeodomain-1, **PHD2** : Plant homeodomain-2 ...)

PP2A : Protéine phosphatase 2A
PPM : Progéniteur primitif multipotent
P-TEFb : Positive transcription elongation factor b
RD1 : Domaine de répression 1
RD2 : Domaine de répression 2
SCE : Super complexe d'élongation
SCF : Stem cell factor
SCID : Severe combined immunodeficiency (souche murine)
SDF-1 : Stromal cell-derived factor-1
SET : Domaine Su(var)3-9 Enhancer-of-zeste and Trithorax
Shh : Sonic hedgehog (voie signalétique)
SNL : Spleckled nuclear localisation site
TAD : Transcriptional activation domain
TCR : Récepteur des cellules T
TGFβ : Transforming growth factor beta
TNF-α : Tumour necrosis factor-alpha
Tp : Temperature pièce
Tpo : Thrombopoïétine
trxG : Groupe de protéines trithorax
VSV-G : glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse

On a deux vies, et la deuxième commence quand on se rend compte qu'on en a qu'une.

-Confucius

Remerciements

La publication de ce mémoire est pour moi la conclusion de mes dernières années de travail au sein du laboratoire du Dr. Frédéric Barabé et potentiellement aussi la fin de ma vie universitaire. Cependant je n'aurais rien pu accomplir durant ces dernières années sans l'aide de plusieurs personnes qui m'ont apporté tant un soutien technique que moral et que je me dois de remercier sincèrement.

Premièrement, je souhaite remercier mon directeur de recherche, le Dr. Frédéric Barabé, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler dans son laboratoire et sans qui rien n'aurait été possible. Je le remercie d'autant plus pour ses nombreux encouragements, sa grande patience et sa dévotion à la science et à l'enseignement de celle-ci à ses étudiants. Un grand merci pour toute l'aide qu'il m'a apportée dans mes projets et sa grande disponibilité pour répondre à mes nombreuses questions.

Un immense merci à tous les différents membres de l'équipe pour leur aide dans toutes les étapes des projets, particulièrement notre assistante de recherche, Anne Bergeron, pour sa patience infaillible, sa grande gentillesse et à qui je dois la majeure partie de ma formation scientifique dans ce laboratoire. Merci pour ta sérénité et tes précieux conseils. Jessica Simard, un gros merci pour l'aide que tu m'as apportée pour le sang de cordon. Laurine Gil et Malika Laouedj, merci d'avoir rendu cette expérience de travail aussi passionnante de par votre camaraderie.

Un merci tout spécial à Gina Racine qui m'a offert son temps bénévolement pour m'aider dans mes triages cellulaires.

Un grand merci aussi à tous les membres des autres équipes de recherche du CRI avec qui j'ai pu partager mes pauses-café au cours des dernières années et qui m'ont soutenu à un moment ou un autre.

Finalement, à mon père, ma mère, mon frère et ma grand-mère à qui je dédie ce mémoire, merci pour tous vos encouragements d'outremer ! Je n'y serais jamais arrivé sans vous.

Chapitre I – Introduction

1. L'hématopoïèse

Le sang occupe une fonction primordiale dans le corps de tous les vertébrés. Il sert notamment au transport de l'oxygène et du gaz carbonique, des substances nutritives (acides aminés, sucres et minéraux..) et endocrines (hormones, enzymes, vitamines...) vers les tissus cellulaires, tout en transportant les déchets excrétés vers leur élimination par le filtrage rénal. Le sang a aussi une fonction d'homéostasie et de défense de l'organisme via le système immunitaire sans lequel nous ne pouvons survivre très longtemps. Pour parvenir à accomplir ses fonctions, le sang humain est composé à 45% de son volume par des cellules sanguines, appelées éléments figurés, flottant dans du plasma [1]. Les éléments figurés du sang comportent une hiérarchie complexe de cellules différentes ayant toutes un rôle propre à jouer dans notre organisme. Parmi celles-ci, nous y retrouvons les érythrocytes (communément appelé « globules rouges »), les plaquettes et les leucocytes (regroupant toutes les cellules sanguines de notre système immunitaire). Ces cellules, quelles qu'elles soient, ne sont toutefois pas immortelles et même si un humain adulte en santé possède en moyenne 25 trillions d'érythrocytes matures, chaque seconde 5 millions de ces érythrocytes sont éliminés naturellement par érythrophagocytose [2]. Un mécanisme doit donc exister pour remplacer les cellules sanguines mortes. Ainsi, l'hématopoïèse est le processus physiologique par lequel sont produites de manière continue et régulée les cellules du sang, et ce, tout au long de notre vie. L'hématopoïèse subit néanmoins plusieurs variations quant à la prolifération et la maturation cellulaire ainsi que le site dans lequel elle se déroule selon l'âge d'un individu. Plusieurs organes prennent systématiquement la relève, mais maintiennent tout de même une hiérarchie cellulaire caractéristique débutant avec les cellules souches hématopoïétiques (CSH) capables de s'autorenouveler et de se différencier en progéniteurs de lignées cellulaires de plus en plus spécialisées, pour aboutir à des cellules matures du sang périphérique, tout ça de manière contrôlée et observable par différents marqueurs cellulaires [3, 4].

1.1 Les sites de l'hématopoïèse chez l'humain

Les sites de l'hématopoïèse ainsi que les niveaux de cellules produites changent plusieurs fois suivant la croissance d'un individu et les besoins liés au stade de croissance. Chez l'humain, l'hématopoïèse pré-natale commence tout d'abord au niveau de la vésicule ombilicale, environ 3 semaines après l'implantation de l'embryon, dans les îlots de Wolff et de Pander [5, 6]. Ces « îlots » sont en fait des amas de cellules mésenchymateuses composés plus spécifiquement de cellules endothéliales en périphérie et d'un lumen, dans lequel flottent dans du plasma, des cellules souches hématopoïétiques. L'hématopoïèse à ce stade est primitive et extra-embryonnaire, donnant pratiquement exclusivement des érythrocytes primitifs (érythropoïèse) qui ont toujours leur noyau cellulaire et sont plus grands que les érythrocytes définitifs, mais comportent tout de même de l'hémoglobine et part le fait même, sont capable de transporter l'oxygène vers les tissus de l'embryon, contribuant ainsi à son développement normal. Ces érythrocytes primitifs peuvent se diviser à nouveau et complètent leur maturation et leur énucléation une fois dans le système circulatoire nouvellement formé de l'embryon. Les précurseurs des autres lignées cellulaires du sang apparaissent aussi durant ce stade, mais n'amènent pas d'autres types de cellules différenciées pour le moment. Il faut attendre à partir du 2^e mois avec l'organogénèse et la formation du foie pour que les CSH et les cellules progénitrices de lignées hématopoïétiques y migrent et que commence ainsi dans le foie une hématopoïèse plus diversifiée, qui est maintenue jusqu'au 8^e mois du fœtus. L'érythropoïèse est maintenue en priorité, mais vers la fin du 2^e mois apparaissent les premiers leucocytes, surtout des granulocytes. Au 3^e mois de la grossesse, des cellules souches s'installent aussi dans la rate qui sert, pendant la phase *in-utero* et parallèlement au foie, de site d'hématopoïèse. Finalement au 4^e mois, la moelle osseuse commence aussi à produire les éléments figurés du sang de manière exponentielle avec la croissance du fœtus, de façon à ce qu'après la naissance, la moelle osseuse soit le principal site de l'hématopoïèse. Néanmoins, alors qu'au début le foie, la rate et la moelle osseuse produisent plusieurs lignées concomitantes, une spécialisation quant au type de lignée produite dans chaque organe se met peu à peu en place avec par exemple la moelle osseuse générant surtout des érythrocytes, des granulocytes et des mégacaryocytes alors que la rate et les ganglions produisent surtout des lymphocytes [7, 8]. Après la naissance, la rate, le foie et le thymus perdent leur fonction hématopoïétique sauf pour des cas pathologiques par exemple pour une myélofibrose primitive avec métaplasie myéloïde, caractérisée par un envahissement de la moelle osseuse par un tissu fibreux de collagène, qui ramène alors leur fonction hématopoïétique à

la rate et au foie pour pallier à l'anémie causée par la perte de moelle osseuse saine. On parle alors d'hématopoïèse extra-médullaire [9]. Enfin, d'autres changements quant aux sites principaux de l'hématopoïèse apparaissent dans la moelle osseuse de certains os selon l'âge d'un individu. Jusqu'à environ 4 ans l'hématopoïèse est active dans tous les os, puis les os longs tels que le fémur et le tibia perdent peu à peu cette fonction qui se retrouve finalement, à l'âge adulte, exclusivement réservée aux os plats et courts tels que les vertèbres, le bassin, le sternum et les côtes [10].

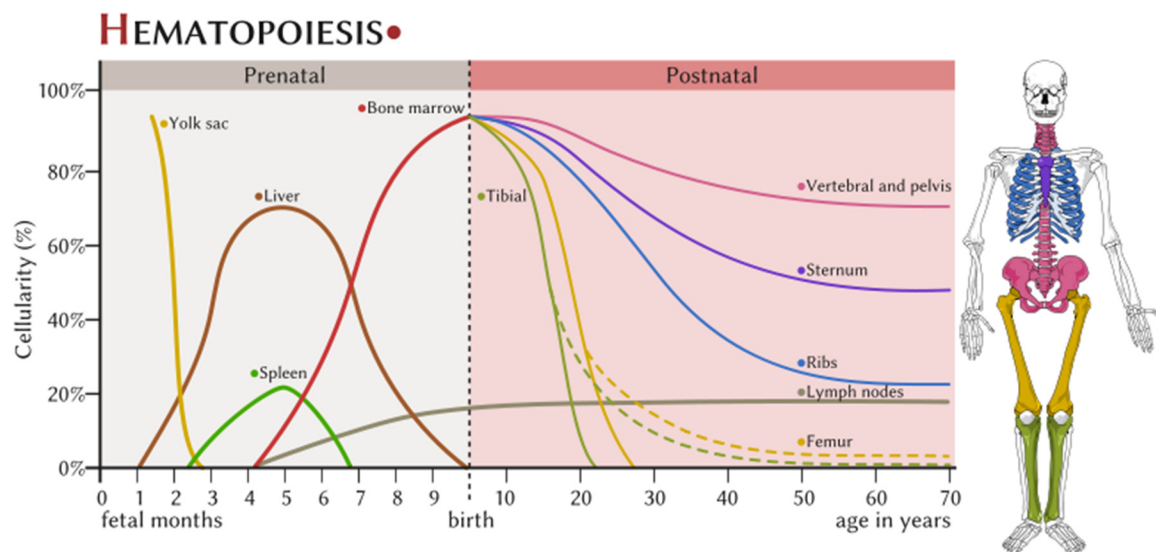


Figure 1 : Principaux sites de hématopoïèse chez l'homme en période pré et post-natale

Différentes courbes illustrant la prise en charge de l'hématopoïèse par différents organes durant la croissance pré-natale et post-natale.

Illustration de Michał Komorniczak ©

1.2 Les cellules souches hématopoïétiques

En biologie, on parle de cellules souches en faisant référence à un type de cellule indifférenciée, soit embryonnaire ou adulte, possédant surtout deux caractéristiques majeures :

- Un potentiel de différenciation, c'est-à-dire la capacité de se spécialiser en un ou plusieurs autres types de cellules différenciées et fonctionnelles, permettant ainsi la création, le maintien de l'intégrité ou la régénération d'un ou plusieurs tissus dans un organisme. Les différents types de cellules souches peuvent être distingués plus spécifiquement par leur capacité de différenciation. On dit de celles capables de générer un organisme entier, et donc tout type de cellules le constituant, qu'elles sont totipotentes. Celles capables de se

différencier en plusieurs lignées cellulaires différentes sont appelées pluripotentes. Pour une seule lignée cellulaire, mais tout de même plusieurs cellules différentes, on parle alors de cellules souches multipotentes et finalement pour des cellules non-différenciées capables de produire un seul type de cellules différenciées, on les appelle des cellules souches unipotentes [11]. Pour ce qui est des cellules souches hématopoïétiques, elles se classent dans la catégorie des cellules souches pluripotentes.

- La capacité « d'autorenouvellement », c'est-à-dire qu'en plus de fournir des cellules différenciées à l'organisme, la population de cellules souches doit être capable de générer d'autres cellules souches filles identiques non-différenciées, gardant leur même potentiel de différenciation et d'autorenouvellement, assurant ainsi la pérennité de la population de cellules souches dans l'organisme [11, 12].

Suivant la découverte des cellules souches au stade embryonnaire, on commence déjà à suspecter dans les années 50 que des cellules souches sont encore présentes dans des organismes adultes et sont notamment impliquées dans la production des cellules sanguines lorsqu'une étude montre qu'une transplantation de moelle osseuse pouvait sauver la vie de souris irradiées devenues anémiques [13-15]. C'est en 1963 avec les expériences de James Till et Ernest McCulloch que l'on commence véritablement à identifier un type cellule capable de s'autorenouveler et pluripotent (pouvant recréer toutes les cellules du sang) qui est alors appelé cellule souche hématopoïétique (CSH) [16-18]. En effet, que l'on parle des érythrocytes, des leucocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles, macrophages, monocytes et lymphocytes) ou des plaquettes, toutes les cellules différenciées du sang proviennent d'une CSH. Voyant le potentiel thérapeutique de ces cellules et des transplantations de moelle osseuse dans le traitement de pathologies telles que certains cancers du sang (leucémies et lymphomes) et d'autres désordres sanguins (anémie aplasique, thalassémie-beta...) les recherches ont depuis permis de mieux les caractériser en les isolant chez l'homme et la souris et de mieux comprendre la régulation derrière leurs mécanismes d'autorenouvellement et de différenciation, mais leur rareté a longtemps été un obstacle à leur isolation. Dans la moelle osseuse, seulement une cellule sur 100 000 est une CSH [19]. Néanmoins, la découverte de leur présence dans le sang de cordon ombilical et le placenta a permis d'offrir une meilleure alternative dans la collecte de CSH pour la thérapie et la recherche puisque ces tissus sont souvent jetés suivant l'accouchement [20].

1.2.1 Autorenouvellement

La recherche sur les CSH a mis en évidence que celles-ci possèdent une capacité d'autorenouvellement, mais les mécanismes régulateurs derrière cette fonction cruciale posent encore un défi majeur à leur compréhension. En effet, le potentiel de différenciation des cellules souches est la caractéristique souvent la plus symbolique et la mieux comprise. Cependant, comprendre les mécanismes de leur autorenouvellement est non seulement essentiel pour être en mesure de les préserver en culture, mais permettrait aussi potentiellement de mieux comprendre les cancers, dont la prolifération dérégulée des cellules est l'une des principales caractéristiques [21]. Dans un premier temps, au niveau du système hématopoïétique, il faut savoir que nous retrouvons 2 types de CSH ayant une capacité d'autorenouvellement différente. Au sommet de la hiérarchie de l'hématopoïèse, la première population est constituée des cellules souches hématopoïétiques à long terme (CSH-LT), qui doivent leur nom au fait qu'elles sont capable d'assurer leur autorenouvellement (et donc l'hématopoïèse) tout au long de la vie d'un individu [22]. Les CSH-LT seront pour la plupart en quiescence (G0), c'est-à-dire dans une phase de repos où elles ne se divisent pas ou ne se préparent pas à la division cellulaire. Elles peuvent tout de même à tout moment sortir de leur quiescence et se préparer à entrer dans le cycle cellulaire en vue de se multiplier (G1) et retourner par la suite en quiescence indéfiniment [23]. Lorsqu'elles se différencient, les CSH-LT deviennent des cellules souches hématopoïétiques à court-terme (CSH-CT) qui ont encore leur capacité d'autorenouvellement, mais seulement à court terme avant de ne plus pouvoir s'autorenouveler et se différencier à nouveau, cette fois en progéniteurs primitifs multipotents (PPM). Cependant, pendant la période où les CSH-CT sont toujours capables de s'autorenouveler, elles entrent dans une phase de prolifération rapide et augmentent fortement en nombre avant de poursuivre l'hématopoïèse [23]. Il est possible de distinguer physiologiquement et d'isoler ces CSH par cytométrie de flux à l'aide de marqueurs de surface qu'elles possèdent tels que THy1 (CD90) et la glycoprotéine CD34, mais, comme ces marqueurs ne se retrouvent pas seulement à la surface des cellules souches hématopoïétiques, il faut aussi retirer les cellules qui expriment d'autres marqueurs de surface propres à des cellules de lignées différenciées à l'aide d'un cocktail d'anticorps pour ceux-ci (CD33, CD19, CD3...). On les appelle aussi les cellules obtenues « Lin- » pour illustrer le fait qu'elles n'ont pas de marqueur de lignée sanguine spécifique. Les CSH sont ainsi caractérisées par le phénotype de marquage CD34+ CD90+ CD38- Lin- [11, 24, 25].

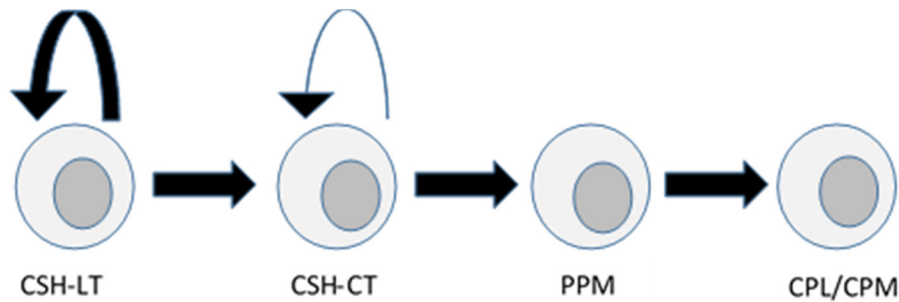


Figure 2 : Capacité d'autorenouvellement des différentes cellules souches et progénitrices

Les cellules souches hématopoïétiques à long terme (CSH-LT) possèdent une capacité d'autorenouvellement qui dure tout au long de la vie d'un individu. Ces cellules sortent de leur quiescence et se différencient en cellules souches hématopoïétiques à court terme (CSH-CT) ayant toujours une capacité d'autorenouvellement qu'elles utilisent fortement, mais seulement pour une courte période, après quoi elles sont forcées de se différencier en progéniteurs primitifs multipotents (PPM). Ceux-ci n'ont plus la capacité d'autorenouvellement, mais gardent tout de même la capacité de se différencier en n'importe quelles cellules sanguines, via la différenciation en une cellule progénitrice lymphoïde (CPL) ou une cellule progénitrice myéloïde (CPM).

Lorsque les CSH entrent en division, trois scénarios peuvent se produire de par leur capacité d'autorenouvellement. Le premier est la division symétrique d'expansion, où une CSH mère produit deux CSH filles identiques gardant leur plein potentiel de différenciation et d'autorenouvellement. Dans un deuxième cas, les CSH mères peuvent opter pour une division asymétrique, aussi appelée « division de maintenance », qui produit une CSH identique à la cellule mère et une cellule différenciée qui perd sa fonction d'autorenouvellement, mais peut continuer à se différencier. Finalement, une division symétrique de différenciation donne plutôt deux cellules filles différenciées à partir d'une CSH mère [26, 27] (Figure 3).

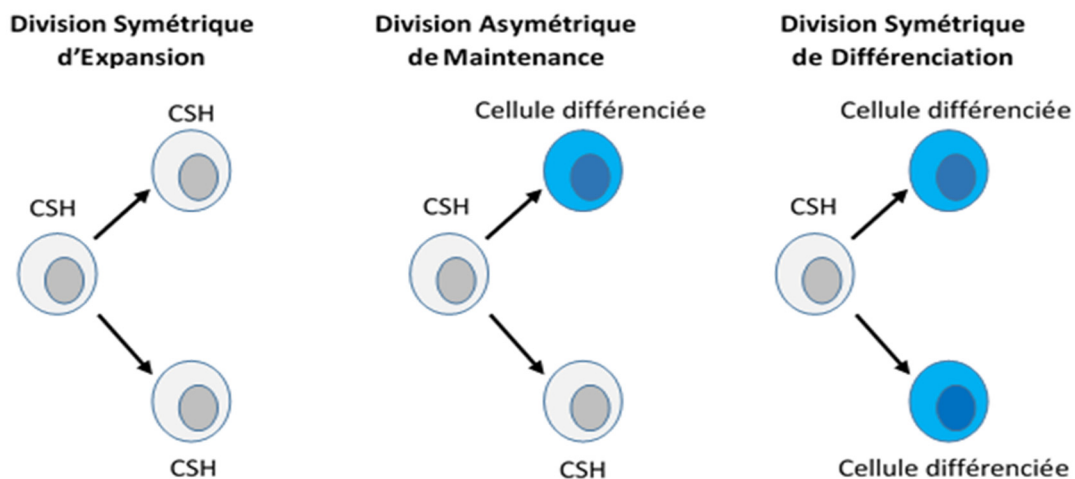


Figure 3 : Types de division cellulaire des cellules souches hématopoïétiques

Adapté de Pina et al, *Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators* (2007)

1.2.2 Différenciation cellulaire

La pluripotence des CSH a pu être observée à plusieurs reprises sur des expériences à long terme impliquant la transplantation de celles-ci dans des souris irradiées et cliniquement chez l'homme dans le traitement de plusieurs pathologies [20, 28, 29]. Il faut cependant savoir que la différenciation d'une CSH en cellule différenciée de notre circulation sanguine, par exemple un macrophage, n'est pas un processus spontané ni même direct. L'hématopoïèse s'illustre par une véritable pyramide de cellules différentes où les CSH indifférenciées forment la pointe et s'en suit une cascade de cellules progénitrices de plus en plus différenciées avant d'atteindre la base comprenant toutes les cellules matures de notre système sanguin. Une fois les CSH devenues des progéniteurs primitifs multipotents (PPM), les cellules toujours multipotentes à ce stade, comme leur nom l'indique, arrivent au premier embranchement, les progéniteurs de lignée cellulaire, qui définissent la lignée cellulaire principale à laquelle appartiendra la cellule mature, soit la lignée myéloïde ou la lignée lymphoïde [11, 30, 31].

La lignée myéloïde, débutant par les cellules progénitrices myéloïdes (CPM), est la lignée qui aboutit notamment aux érythrocytes, aux plaquettes, aux granulocytes, aux monocytes ainsi qu'aux cellules dendritiques myéloïdes. La différenciation des cellules vers la voie myéloïde apporte l'acquisition de marqueurs immunologiques dont CD33 et HLA-DR en plus de CD34 qui était déjà exprimé par les PPM. La lignée lymphoïde commençant par les cellules progénitrices lymphoïdes (CPL) donne naissance principalement aux lymphocytes B et T ainsi qu'aux cellules NK (natural killers). Celles-ci expriment alors le marqueur CD10 et éventuellement CD19 [32, 33].

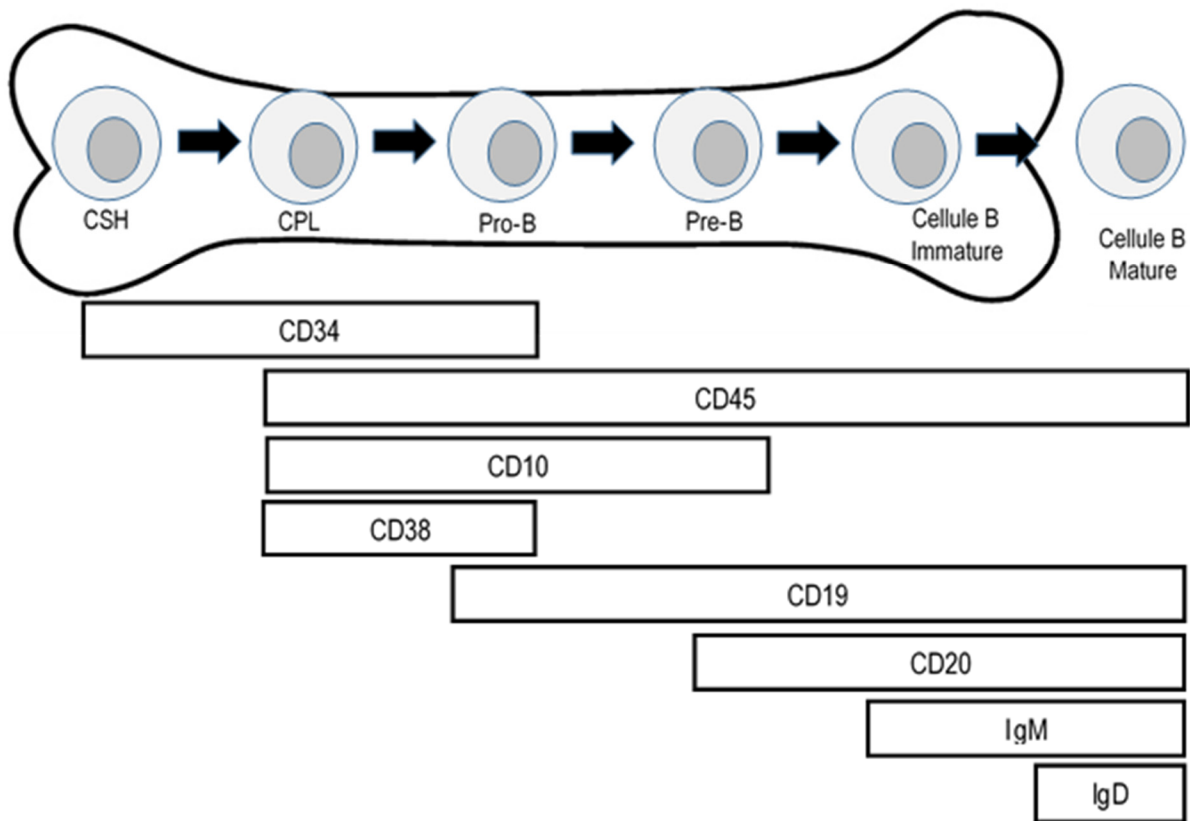


Figure 4 : Différents stades de maturation des lymphocytes B et leurs principaux marqueurs

Exemple de la différenciation cellulaire dans la voie des lymphocytes B avec les différents stades de maturation dans la moelle osseuse jusqu'à la libération des lymphocytes B matures dans la circulation sanguine ainsi que l'alternance des principaux marqueurs de surfaces exprimés aux différents stades.

Les cellules progénitrices de lignée se différencient par la suite en précurseurs hématologiques qui sont alors les premières cellules identifiables morphologiquement selon leur lignée, rajoutant tout de même plusieurs nouveaux marqueurs de surface pouvant servir à leur identification. Cette dernière grande étape avant l'aboutissement final de l'hématopoïèse en une cellule mature a pour caractéristique, non seulement la maturation des cellules, mais aussi la multiplication. L'hématopoïèse ne serait effectivement pas rentable si chaque précurseur ne forme en fin de compte qu'une seule cellule sanguine mature. Ainsi, selon le précurseur, il peut se produire entre 3 et 5 divisions mitotiques avant de produire des cellules matures et donc, un premier précurseur peut fournir jusqu'à 32 cellules « filles » [34, 35]. Chez l'adulte, l'hématopoïèse se déroule pratiquement entièrement dans la moelle osseuse avant de finalement libérer les cellules sanguines nouvellement formées dans la circulation périphérique, à l'exception des lymphocytes T qui finissent leur maturation dans le thymus avant de rejoindre la circulation.

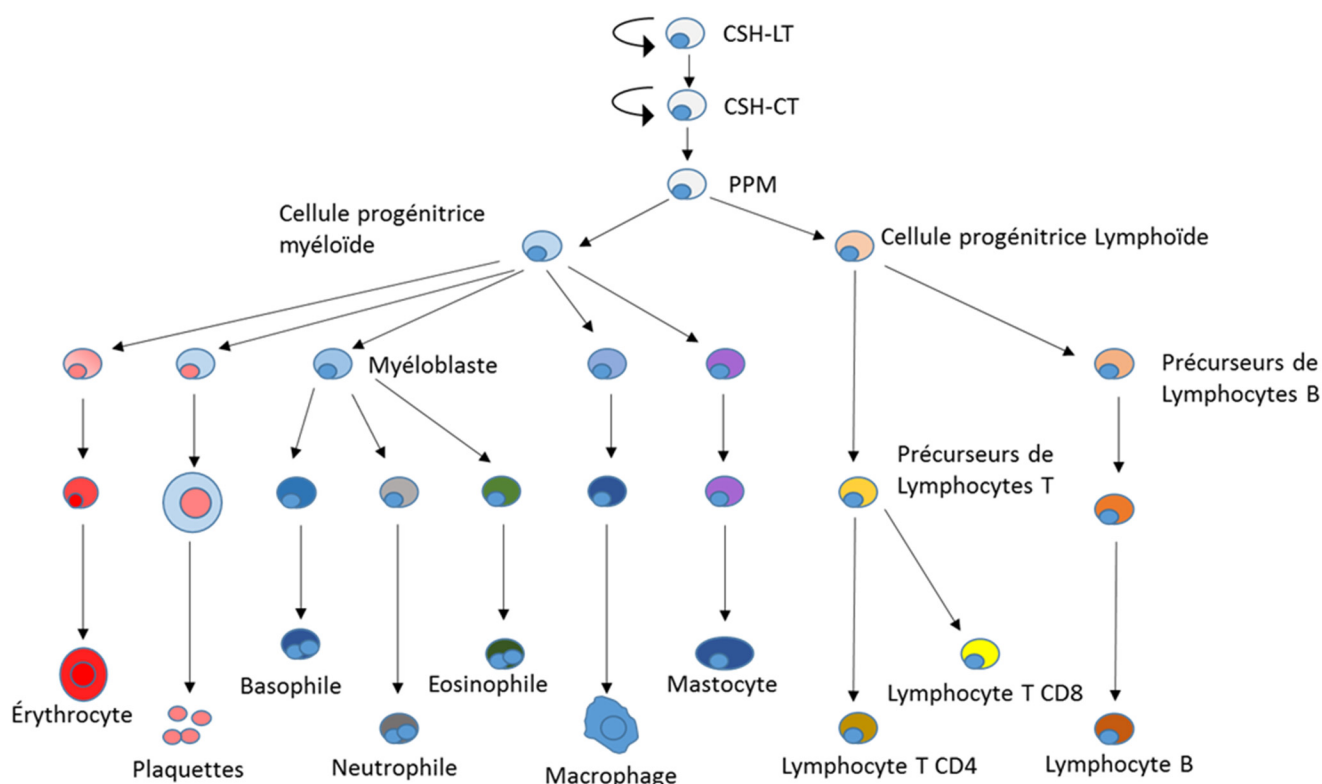


Figure 5 : Schématisation simplifiée du système hématopoïétique

1.3 Régulation

Que ce soit au niveau de la différenciation cellulaire ou de l'autorenouvellement des CSH, toutes les cellules prenant part à l'hématopoïèse subissent une régulation intrinsèque et extrinsèque pour maintenir l'homéostasie du processus.

Dans un premier temps, le microenvironnement médullaire (ou niche hématopoïétique) est constitué de cellules et de protéines matricielles qui interagissent avec les CSH et leur fournissent les molécules régulant leur quiescence, leur prolifération et leur différenciation vers des cellules sanguines spécifiques. On y retrouve donc les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales, des adipocytes ainsi que des macrophages et des lymphocytes qui se lient directement aux CSH ou produisent des cytokines ciblant certains de leurs récepteurs membranaires [36, 37]. Au niveau de la matrice extracellulaire, les cellules stromales produisent le collagène, la laminine et la fibronectine permettant le « homing » des CSH dans la moelle osseuse en synergie avec des protéines d'adhésion comme la L-sélectine, ligand de CD34 [38]. Les études *in vivo* et *in vitro* démontrent une

importance de ces cytokines et hormones se retrouvant dans la niche médullaire pour maintenir en vie et promouvoir chacune des fonctions des CSH. Elles révèlent aussi une grande complexité dans l'interaction entre ces facteurs extrinsèques et les voies signalétiques de ces cellules, rendant encore particulièrement difficile leur expansion *in vitro* [39-42]. Une même cytokine peut être produite par plusieurs cellules différentes et agir à plusieurs niveaux de l'hématopoïèse selon la fonction. Par exemple, la sortie de la quiescence et la différenciation des CSH en PPM se fait surtout via des molécules telles que l'IL6, l'IL-1 le stem cell factor (SCF), le leukemia inhibiting factor (LIF) et le

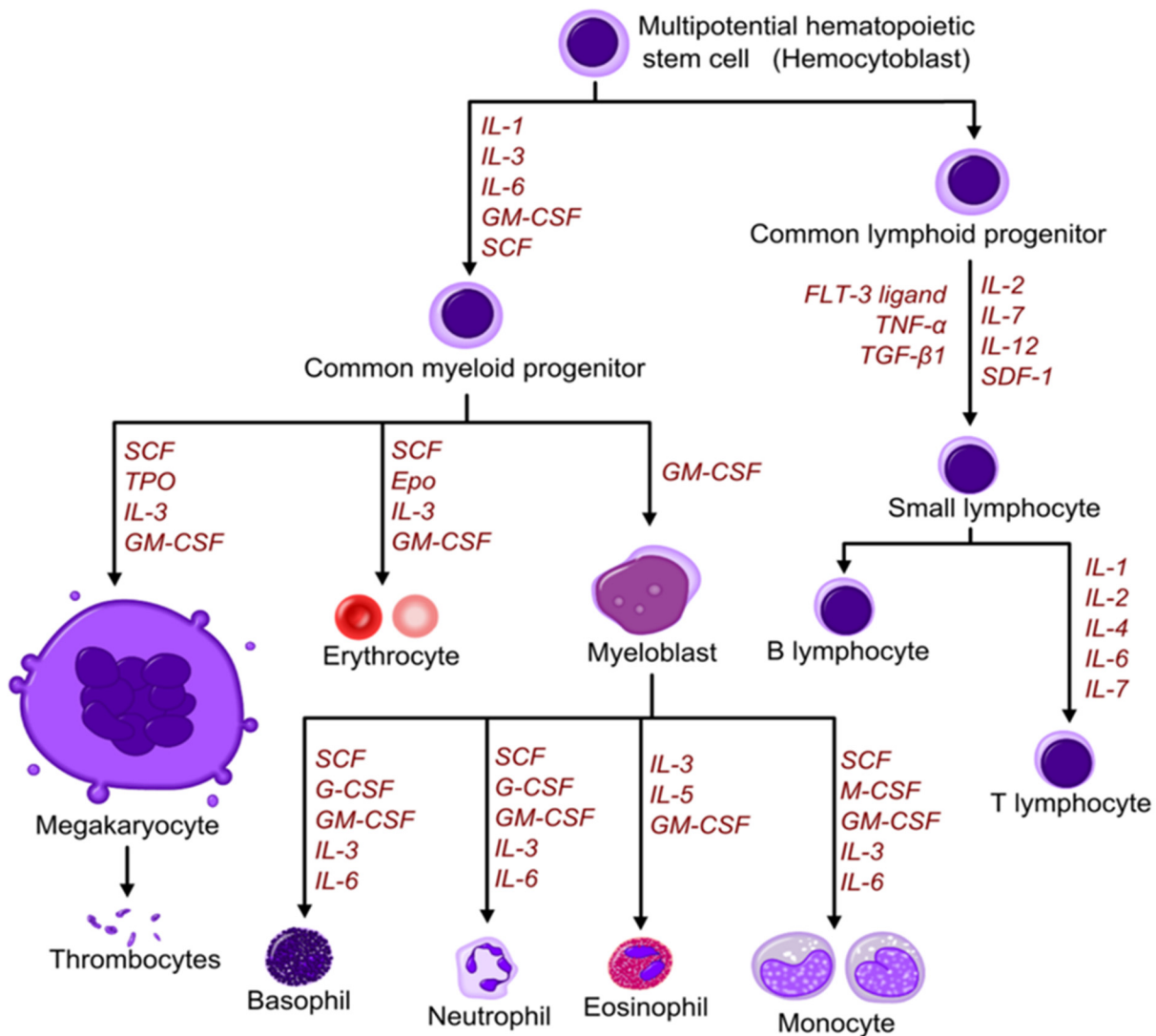


Figure 6 : Principales cytokines régulatrices de l'hématopoïèse

SCF=Stem Cell Factor **Tpo**=Thrombopoïétine **IL**=Interleukin **GM-CSF**=Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor **Epo**=Erythropoïétine **M-CSF**=Macrophage-colony stimulating factor **G-CSF**=Granulocyte-colony stimulating factor **SDF-1**=Stromal cell-derived factor-1 **FLT-3 ligand**= ligand FMS-like tyrosine kinase 3 **TNF-α**= Tumour necrosis factor-alpha **TGFβ** = Transforming growth factor beta

Figure de Mikael Häggström and A. Rad ©

ligand-FLT3 [43]. D'autres petites molécules viennent ensuite diriger les cellules vers une lignée cellulaire spécifique et promouvoir leur maturation, comme le GM-CSF qui amène la division en CPM et l'oriente vers la production de granulocytes et de monocytes, alors que IL-5 mène aux précurseurs des éosinophiles. Pour la lignée lymphoïde, on retrouve par exemple IL-7 et SCF qui favorisent l'engagement vers cette voie et la production de lymphocytes B, alors qu'IL-2 aide à la différenciation en précurseurs de lymphocytes T. D'autres comme l'EPO et la TPO amènent à la production d'érythrocytes et de thrombocytes respectivement. Par ailleurs, des cytokines peuvent inhiber certaines différenciations dans des cas par exemple d'inflammation, où les lymphocytes T sécrètent la TNF α qui inhibe l'érythropoïèse et la granulopoïèse [31, 44] (Figure 6).

Enfin des voies signalétiques impliquant plusieurs facteurs de transcription montrent un contrôle intrinsèque des cellules de l'hématopoïèse tout aussi complexe, mais moins bien compris que son contrôle extrinsèque. Par exemple la voie de Notch et ses ligands Delta et Jagged, qui a un rôle prépondérant dans la lymphopoïèse, semble aussi promouvoir l'expansion des CSH à la fois *in vivo* et *in vitro* lorsqu'elle est activée [45]. Il en va de même pour la voie de signalisation Wnt et la voie Sonic hedgehog (Shh) qui semblent toutes deux réguler l'autorenouvellement de ces cellules en combinaison avec des facteurs de croissance [46, 47]. Plusieurs autres facteurs de transcription se retrouvent aussi impliqués dans les mécanismes de survie et de prolifération cellulaire tels que GATA3, C-MYC, et ETV6 [48-50]. De manière peu surprenante, dans les cellules cancéreuses, on retrouve souvent ces mêmes voies signalétiques et facteurs de transcription dérégulés, leur conférant ainsi une prolifération désordonnée ainsi qu'une résistance à l'apoptose. Ceci supporte donc bien la théorie faisant de cellules souches mutées, l'origine de plusieurs cancers, puisque garder activée la machinerie derrière l'autorenouvellement déjà présente est probablement plus facile que de l'activer *de novo*, d'autant plus que ces cellules survivent plus longtemps à la base que d'autres cellules plus différenciées et sont ainsi plus susceptibles d'accumuler des mutations [51].

2. Les leucémies

L'histoire des leucémies commence il y a plus de 200 ans, en 1811, lorsqu'un chirurgien écossais, Peter Cullen rapporte un cas de « splenitis acutus » (splénite aiguë), dont il décrit un « sérum laiteux », qu'il attribue l'apparence à l'absorption rapide de gras par le sang [52]. Quelques années

plus tard, des médecins français, dont Alfred Velpeau (1825), rapportent eux aussi des patients avec des symptômes similaires, dont le sang laiteux qu'ils attribuent cette fois à la présence de pus dans le sang. Il faut attendre 1844 avant qu'Alfred Donné, un bactériologiste français et inventeur de la microscopie photoélectrique, examine le sang laiteux et détermine que la couleur blanchâtre n'est ni causée par du pus ou du gras, mais par la présence d'un grand nombre de « cellules blanches » similaires à celles retrouvées dans du sang sain [52]. Un peu plus tard, un autre médecin écossais, John Hughes Bennett, observe à nouveau le sang de patients atteints de plusieurs maladies différentes et décrit pour la première fois la leucémie (qu'il appellera leucocythemia) comme un désordre sanguin, en se basant sur ses observations quant à l'accumulation pathologique de leucocytes dans le sang [52]. S'en suivent finalement, la même année, les observations de Rudolf Virchow, un médecin histologiste allemand, qui décrit l'évolution de la maladie d'une patiente qui présente un œdème à la jambe, une splénomégalie, de la diarrhée et des saignements nasaux. Il remarque en analysant son sang à sa mort, 3 mois plus tard, un déclin du nombre de globules rouges de même qu'une accumulation de globules blancs. Il renomme la maladie « Leucémie » et différencie plus tard des leucémies spléniques et des leucémies lymphatiques, mettant d'avant le concept qu'il s'agit non pas d'une, mais bien de plusieurs maladies hétérogènes, caractérisées par une accumulation d'un type de cellule sanguine, au détriment des autres [53]. La caractérisation des leucémies se poursuit toujours de nos jours et même si les connaissances pronostiques et thérapeutiques ont grandement évolué en 200 ans, beaucoup reste encore à approfondir sur le sujet.

2.1 Définition et classification des leucémies

Les leucémies sont un groupe de cancers touchant les cellules du système hématopoïétique et englobant plusieurs cancers morphologiquement et génétiquement différents qui se développent et se soignent différemment selon le type de leucémie. Comme pour tous les cancers, les leucémies surviennent suite à une ou plusieurs mutations au niveau de l'ADN d'une cellule qui la rende instable. Normalement, une mutation endommageant le bon fonctionnement d'une cellule saine mène vers l'apoptose de la cellule, un suicide programmé de celle-ci empêchant l'accumulation de cellules défectueuses dans le corps, mais dans des cas plus rares, la mutation confère au contraire un avantage de survie. C'est le cas pour la cellule souche leucémique (CSL) dans laquelle la ou les mutations dérégulent plusieurs mécanismes cellulaires pour engendrer une prolifération clonale accrue et anarchique de celle-ci, un autorenouvellement illimité et, pour les leucémies aiguës, une

différenciation aberrante des cellules leucémiques [54]. Éventuellement, la CSL d'où provient la leucémie va proliférer et s'être autorenouvelée à tel point qu'un grand nombre de cellules issues de celle-ci ont tôt fait d'envahir la moelle osseuse, étouffant l'hématopoïèse normale. Si rien n'est fait pour contrer le développement de la leucémie, les cellules leucémiques peuvent se retrouver par la suite dans la circulation périphérique et envahir peu à peu d'autres organes (foie, rate, ganglions lymphatiques, testicules et cerveau). Éventuellement, une insuffisance médullaire (insuffisance dans la production de cellules sanguines saines) apparaît chez le patient sous la forme de pancytopénie : une anémie (faible taux d'érythrocytes), une leucopénie (faible taux de leucocytes, affaiblissant le système immunitaire) et une thrombopénie (faible taux de plaquettes, entraînant des saignements spontanés) causant alors la mort du patient [55].

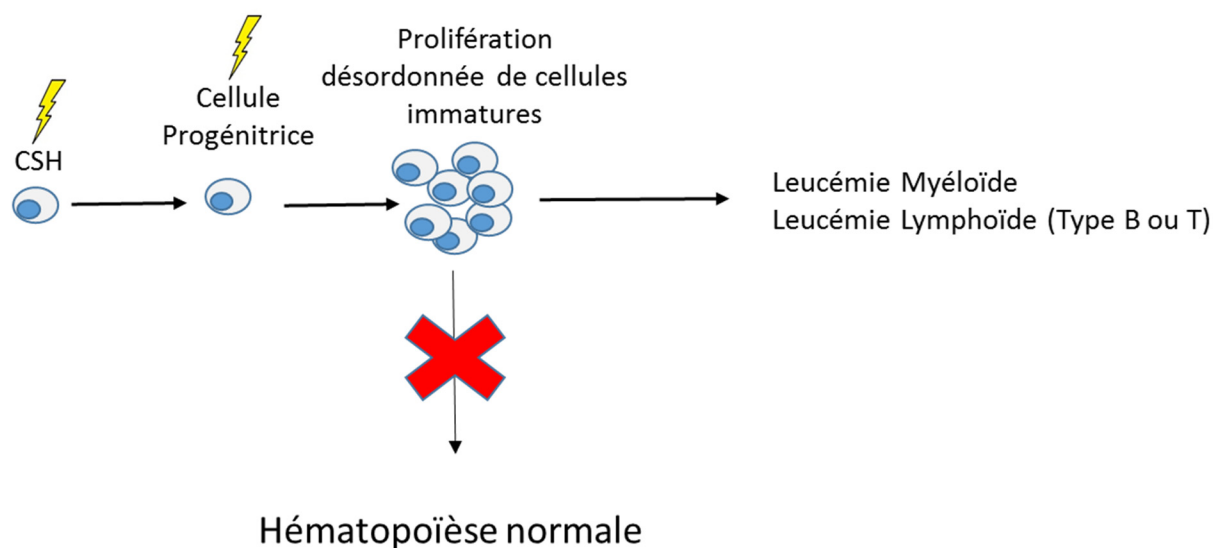


Figure 7 : Schématisation du processus leucémogénique derrière les leucémies aiguës

Les leucémies peuvent être divisées en quatre grands groupes selon deux principaux critères : la vitesse à laquelle la maladie se développe et le type de lignée cellulaire dont la leucémie est issue et exprime le phénotype [56]. Dans un premier temps, la vitesse de développement peut être décrite comme « aiguë » ou « chronique ». Les leucémies aiguës se développent cliniquement très rapidement en quelques semaines, voire quelques jours. D'un point de vue physiologique, elles vont être caractérisées par un envahissement rapide de la moelle osseuse et du sang périphérique par des cellules immatures, bloquées à un stade de différenciation précoce et ne pouvant pas accomplir leurs fonctions. Les leucémies chroniques quant à elles sont beaucoup plus lentes à se développer (plusieurs mois ou années) et constituent ainsi une urgence clinique moindre que peuvent être les

leucémies aiguës. La différence majeure avec les leucémies aiguës est le caractère plus mature des cellules leucémiques des leucémies chroniques, expliquant la progression plus lente de la maladie. Ces cellules leucémiques, moins efficaces dans leurs fonctions que les cellules saines équivalentes, vont tout de même réussir à se rapprocher de leur niveau de différenciation normal mais, vont néanmoins survivre beaucoup plus longtemps et augmenter en nombre plus rapidement jusqu'à envahir totalement la moelle osseuse et causer après un certain temps, les mêmes symptômes que les leucémies aiguës. Enfin, le phénotype cytotologique exprimé par les cellules leucémiques permet de distinguer les principales lignées cellulaires d'où provient la leucémie, soit la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde [56]. On a longtemps suspecté les cellules souches hématopoïétiques d'être à l'origine des cellules souches leucémiques de par leur mécanisme d'autorenouvellement déjà fonctionnel et que les CSL peuvent ainsi retourner plus facilement à leur avantage dans la leucémogénèse [51], mais il a depuis été démontré que les progéniteurs de lignée cellulaire peuvent eux aussi engendrer la leucémie chez la souris suivant une mutation et explique parfois la différence quant à l'évolution de la leucémie dans une lignée plutôt qu'une autre [57-59]. Cependant, pour l'instant, nous ne savons pas si c'est aussi le cas pour les leucémies humaines.

La combinaison de ces 2 facteurs permet ainsi de différencier les quatre grandes catégories de leucémies : Les leucémies myéloïdes aiguës (LMA), les leucémies myéloïdes chroniques (LMC), les leucémies lymphoïdes aiguës (LLA) et les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC).

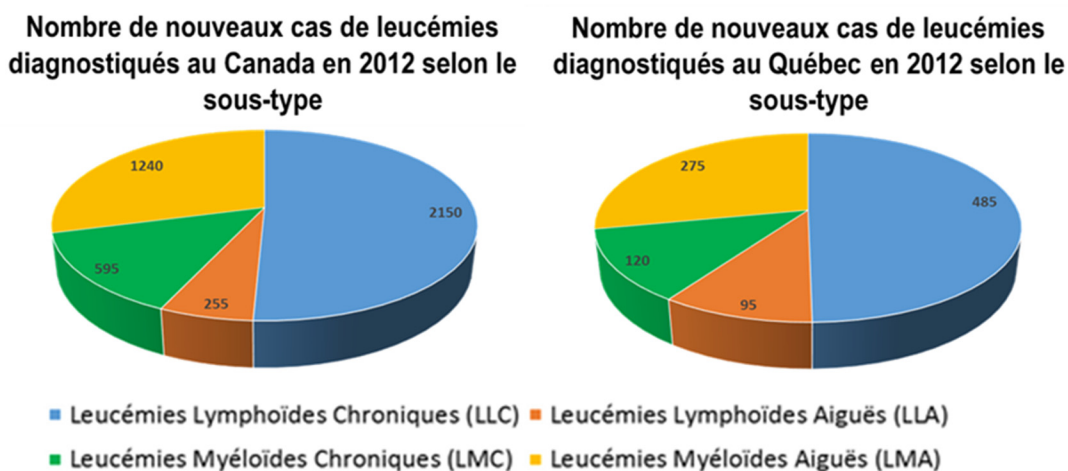


Figure 8 : Nouveaux cas de leucémies diagnostiqués en 2012 au Canada et au Québec par sous-type

Statistiques tiré de Statistics Canada: Table 103-0550, *New cases of primary cancer (based on the August 2015 CCR tabulation file), by cancer type, age group and sex, Canada, provinces and territories*

Les leucémies peuvent ensuite être à nouveau classifiées plus précisément en sous-types distincts selon leur aspect cytologique, leur caryotype et mutations génétiques, tout d'abord selon le système de classification franco-américano-britannique (FAB) mis en place dans les années 70 [60], puis plus récemment (2001) et de manière beaucoup plus précise, par le système de classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). La classification de l'OMS de 2008 [56] a été utilisée pour la rédaction de ce mémoire, mais depuis l'OMS a publié une version révisée en mai 2016 [61].

2.2 Les leucémies aiguës

Les leucémies aiguës représentent une urgence clinique qui requiert une hospitalisation et une prise en charge rapide. Selon la dernière classification de l'OMS, on en décompte plus de 40 sous-types différents, selon les anomalies chromosomiques récurrentes [56]. Cependant, avant de procéder avec les analyses génétiques, un hémogramme et un myélogramme accompagnés par l'immunophénotypage par cytométrie de flux vont permettre de diagnostiquer la leucémie aiguë et de déterminer la lignée cellulaire impliquée, soit myéloïde ou lymphoïde.

2.2.1 Leucémies lymphoïdes aiguës

Les LLA sont un groupe de leucémies débutant dans les CSH ou certaines cellules immatures de la lignée lymphoïde et touchant particulièrement les enfants entre 2 et 4 ans. Elles représentent plus de 75% des cas de leucémies infantiles diagnostiquées avec environ 3 à 4 cas par an pour 100 000 habitants dans les pays occidentaux. Le pronostic reste tout de même favorable pour les enfants avec un taux de survie après 5 ans d'environ 90% pour certains groupes génétiques favorables, alors que chez l'adulte où la LLA est moins fréquente, le taux de survie après 5 ans est d'environ 35 à 40% [62, 63]. Que ce soit chez l'enfant ou chez la personne âgée, les leucémies lymphoïdes aiguës sont causées par des mutations génétiques, et le plus souvent des translocations chromosomiques dont certaines sont néanmoins plus fréquentes chez un groupe d'âge que d'autre (par exemple la translocation t(9 ;22) est beaucoup plus fréquente chez les adultes que chez les enfants). Les LLA se divisent en 2 sous-groupes selon le type de lymphocytes impliqués (lymphocytes B ou lymphocytes T).

2.2.1.1 Les leucémies lymphoïdes aiguës de type B

Les leucémies lymphoïdes aiguës de type B (LLA-B) sont les plus fréquentes et celles généralement associées à un bon pronostic chez l'enfant. L'OMS classe les LLA-B en deux principaux groupes selon la présence d'anomalies cytogénétiques récurrentes, comprenant ainsi :

- Les LLA-B avec t(9;22)(q34;q11.2) (gène de fusion BCR-ABL1, chromosome de Philadelphie)
- Les LLA-B avec t(v;11q23) (impliquant le gène de fusion MLL et ses multiples partenaires)
- Les LLA-B avec t(12;21)(p13;q22) (gène de fusion ETV6-RUNX1)
- Les LLA-B avec hyperploïdie
- Les LLA-B avec hypoploïdie
- Les LLA-B avec t(5;14)(q31;q32) (gène de fusion IL3-IGH)
- Les LLA-B avec t(1;19)(q23;p13.3) (gène de fusion TCF3-PBX1)

Les LLA-B qui ne présentent aucune anomalie génétique récurrente sont alors sous-classées selon la maturité des cellules leucémiques en 4 catégories :

- Les LLA Pro-B
- Les LLA-B communes
- Les LLA Pre-B
- Les LLA à cellules B matures ou lymphome de Burkitt

Les marqueurs de surfaces utilisés pour la caractérisation des LLA-B comprennent entre-autres CD19, CD10, CD20, CD22, CD23, CD24, CD34, CD38 CD45 CD79b, CD103, CD200, TdT et les chaînes légères Kappa et Lambda.

2.2.1.2 Les leucémies lymphoïdes aiguës de type T

Les leucémies lymphoïdes aiguës de type T (LLA-T) sont plus rares que le sous-type B de LLA. En effet, seulement 20 à 25% des cas de LLA sont de type T dans les cohortes infantiles et adultes respectivement [63, 64]. Bien que plusieurs anomalies génétiques récurrentes ont été trouvées dans les cellules leucémiques des LLA-T, l'OMS les regroupe dans une seule grande catégorie de leucémies et les sous-divise seulement en fonction de leur degré de maturité, soit ;

- Les LLA pre-T (5-10% des LLA)
- Les LLA avec cellule T matures (15-20% des LLA)

Nous pouvons tout de même compter parmi les aberrations génétiques récurrentes ;

- Des mutations impliquant le gène du récepteur des cellules T (TCR), particulièrement les régions TCR $\alpha\delta$ (14q11) et TCR β (7q13), dérégulant de même plusieurs gènes de transcription de l'hématopoïèse.
- Des mutations impliquant des oncogènes, par exemple au niveau de Notch1 qui amène une suractivation de sa voie signalétique, une demi-vie augmentée et une altération des mécanismes de différenciations. D'autres oncogènes comme ceux du groupe HOXA (translocations MLL-ENL, CALM-AF10, SET-NUP214...), *HOX11* (t(10;14)(q24;q11)), *HOX11L2* (t(5;14)(q35;q32)), *TAL1* (t(1;14)(p32;q11)) et *LYL1* (t(7;19)(q34;p13)) se retrouvent aussi anormalement exprimés dans plusieurs LLA.
- Des mutations impliquant des tyrosine kinases et les activant de façon constitutive telles que les translocations du gène ABL1 comme le gène de fusion NUP214 - ABL1 (aussi caractéristique de la leucémogénèse de certaines LMC, LMA et de LLA-B) ou de JAK1/2 (gène de fusion *ETV6-JAK2*).

Les marqueurs de surfaces pouvant aider à la caractérisation des LLA-T comprennent entre-autres CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD34, CD45 et TdT.

2.2.2 Leucémies myéloïdes aiguës

Les leucémies myéloïdes aiguës (LMA) sont les principales leucémies touchant les adultes et représentent le deuxième type de leucémie le plus diagnostiqué. Elles ont en effet l'incidence la plus élevée pour les adultes (3.6/100 000 personnes par année), l'âge étant un facteur d'incidence important avec 69 ans comme âge médian [65, 66]. Le taux de survie est aussi inversement proportionnel à l'âge du patient, ceux de plus de 65 ans ayant un taux de survie à 5 ans de moins de 10%, alors que les patients de moins de 50 ans voient leur taux de survie à 5 ans dépasser les 50% [63, 67]. Dans sa version révisée en 2008, l'OMS classe les LMA en quatre principales catégories.

La première comprend les LMA avec anomalies cytogénétiques récurrentes dont la liste regroupe, tout comme pour les LLA-B, des translocations et mutations fréquemment retrouvées dans les cellules leucémiques et étant à l'origine de la leucémogénèse :

- Les LMA avec translocation t(8;21)(q22;q22) amenant le gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1*
- Les LMA avec translocation t(15;17)(q22;q12) amenant le gène de fusion *PML-RAR α*

- Les LMA avec translocation inversement (16)(p13.1q22) et t(16;16)(p13.1q22) impliquant le réarrangement du gène *CBFβ* et sa fusion avec *MYH11*
- Les LMA avec translocation t(9;11)(p22;q23) associées avec la fusion *MLLT3-MLL*
- Les LMA avec translocation t(6;9)(p23;q34) formant le gène de fusion *DEK-NUP214*
- Les LMA avec inversion (3)(q21q26.2) ou la translocation t(3;3)(q21;q26.2) impliquant les gènes *RPN1* et *EVI1* (*MECOM*)
- Les LMA (mégacaryoblastiques) avec translocation t(1;22)(p13;q13) formant le gène de fusion *RBM15-MKL1*
- Les LMA avec mutations à *NPM1* ou *CEBPA* (ajoutées comme entités provisoires)

Le deuxième sous-groupe de LMA compte les LMA avec anomalies associées aux myélodysplasies, c'est-à-dire celles qui font suite à un syndrome myélodysplasique (ou myéloprolifératif/dysplasique), présentant des anomalies génétiques propres à celle des myélodysplasies ou dont plus de 50% des cellules d'au moins deux lignées myéloïdes affichent une dysplasie.

Le troisième groupe compte les LMA faisant suite à un traitement de chimiothérapie ou une irradiation.

Finalement le dernier groupe principal comporte les LMA sans spécification particulière qui ne se retrouvent pas dans les sous-groupes précédents et classées selon leur degré de maturation et la lignée cellulaire atteinte. On y retrouve ;

- Les LMA avec différenciation minimale
- Les LMA sans maturation
- Les LMA avec maturation
- Les leucémies aiguës myélomonocytaires
- Les leucémies aiguës monocytaires
- Les leucémies aiguës érythroïde
- Les leucémies aiguës mégacaryoblastiques
- Les leucémies aiguës myélomonocytaires à composante basophile
- Les leucémies aiguës avec myélofibrose (panmyélose aiguë)

L'ensemble de ces facteurs servant à classer les leucémies ont surtout une importance vitale dans le pronostic de la maladie et alors que la majorité sont considérées comme défavorables au niveau pronostic, certaines anomalies génétiques sont favorables pour le patient, comme les LMA avec mutations bialléliques dans *CEBPA* [68], et aident le clinicien à poursuivre ou non les traitements. Les marqueurs de surfaces utilisés pour la caractérisation des LMA comprennent entre-autres CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD34, CD38, CD45, CD64, CD117 et CD123.

2.2.3 Leucémies aiguës de phénotype mixte

Les leucémies aiguës de phénotype mixte (LAPM), ayant aussi connu d'autres appellations telles que « leucémies aiguës de lignée mixte/ambiguë » ou « leucémies aiguës bi-linéales » sont un type de leucémies aiguës rares, comprenant entre 2 et 5% de toutes les leucémies aiguës [69], dont les cellules leucémiques expriment différents marqueurs qui ne permettent pas de déterminer de façon non-ambigüe leur appartenance à une lignée hématopoïétique précise (LLA-B, LLA-T ou LMA) et qui sont généralement porteurs d'un mauvais pronostic [70]. Ces leucémies ont toujours été difficiles à classer depuis qu'elles ont été rapportées pour la première fois dans les années 1980 et comprennent à la fois des leucémies ayant deux populations morphologiquement distinctes de blastes qui, par immunophénotypage, expriment des marqueurs de deux lignées différentes, mais aussi des leucémies dont les blastes co-expriment des marqueurs de lignée spécifiques pour deux lignées différentes [71, 72]. De meilleures définitions ont été établies depuis par plusieurs groupes via un système de pointage pour des marqueurs de lignées spécifiques différentes qui sont exprimés par les blastes d'un même patient pour distinguer les LAPM d'une leucémie aiguë classique qui exprime de manière aberrante un marqueur d'une autre lignée hématologique [73, 74]. En 2001 et 2008 l'OMS a de nouveau révisé les critères définissant les LAPM, les rendant plus simples, et différencie maintenant celles-ci selon les anomalies génétiques récurrentes pouvant être à l'origine des LAPM, notamment les translocations t(9;22) (chromosome de Philadelphie) et celles impliquant le gène *MLL* [56].

3. Le gène *MLL*

Le gène *MLL* (Mixed Lineage Leukemia), aussi connu sous les noms *KMT2A* (Histone-Lysine N-méthyltransferase-2A), *ALL-1* (Acute Lymphoblastic Leukemia-1), *HTRX-1* ou *HRX* (Human Trithorax) [75-78] est un gène codant pour une protéine du groupe de protéines trithorax (trxG), découvert initialement chez *Drosophila Melanogaster* et dont il est le gène homologue chez l'humain [79]. La protéine MLL, comme les autres protéines trxG, a un rôle primordial dans l'activation transcriptionnelle de gènes lors du développement de l'organisme ainsi que dans le processus d'hématopoïèse. Sa découverte survient lorsqu'on commence à rechercher activement des anomalies génétiques récurrentes dans différentes leucémies, suite à deux autres découvertes majeures qui démontrent pour la première fois que des translocations chromosomiques des gènes *MYC* et *ABL* qui sont respectivement à l'origine du lymphome de Burkitt et dans la formation du chromosome de Philadelphie caractéristique des LMC [80, 81]. On découvre ainsi que le gène *MLL* est associé à plusieurs translocations dans les cellules leucémiques de patients [76, 77, 82]. On lui confère donc un statut de proto-oncogène clé, responsable de la leucémogénèse de plusieurs sous types différents de leucémies et ainsi, un gène incontournable dans l'analyse des caryotypes de leucémies [83].

3.1 Caractérisation du gène et de la protéine MLL

Le gène *MLL* se situe sur la bande chromosomique 11q23 (figure 9), compte 37 exons et exprime une protéine nucléaire de 3969 acides aminés (431 kDa). *MLL* fait partie d'une famille de 6 gènes comptant aussi *MLL2*, *MLL3*, *MLL4*, *SET1A* et *SET1B*. Toutes les protéines issues de cette famille ont pour principale caractéristique leur activité histone méthyltransférase spécifique pour la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4), une modification épigénétique de la chromatine typiquement associée avec une transcription active des gènes de la chromatine [84], conférée par leur domaine catalytique SET [85]. Le domaine SET, inactif par lui-même, nécessite 3 autres protéines activatrices dans le cas de *MLL* (*WDR5*, *ASH2L* et *RbBP5*) formant ainsi un complexe multi-protéique responsable de cette activité méthyltransférase H3K4, le complexe MLL [86]. L'association de ses sous-unités régule aussi les gènes ciblés par son activité méthyltransférase, notamment les gènes *HOX* [87]. La protéine MLL est aussi la cible d'un clivage protéolytique *in vivo* par l'endopeptidase *taspase1* qui la sépare en deux sous-unités, MLL-C et MLL-N (respectivement 180 kDa et 320 kDa). Les deux sous-unités

reforment éventuellement un hétérodimère par l'interaction entre le domaine FYRC (MLL-C) et FYRN (MLL-N) pour ensuite former le complexe MLL, le stabiliser et permettent sa localisation nucléaire [88, 89]. Ces deux sous-unités de MLL lorsqu'elles sont séparées ont des fonctions antagonistes au niveau de la régulation transcriptionnelle : la partie C-terminal (MLL-C) ayant le domaine SET garde l'activité méthyltransférase activatrice de la transcription, alors que la partie N-terminal (MLL-N) contient deux domaines de répression (RD1 et RD2) qui peuvent recruter les histone désacétylases HDAC1 et HDAC2 ainsi que des corépresseurs des protéines du groupe polycomb (PcG) tel que BMI-1, CtBP et HPC2 ce qui a pour effet de réprimer la transcription de gènes cibles [90, 91]. (Figure 9)

MLL est une protéine multidomaine qui contient, en plus du domaine SET et des domaines RD, plusieurs autres domaines et motifs hautement conservés permettant d'accomplir ses fonctions. Son extrémité N-terminal comporte premièrement une région de trois motifs AT-hook, similaires à ceux des protéines nucléaires de la famille HMG-1, capable de reconnaître des structures de l'ADN riche en nucléotides A et T et de s'y lier [92]. Ces motifs permettent ainsi à MLL de localiser ses gènes cibles et pourraient aussi servir à lier des protéines comme SET, GADD34 et la protéine phosphatase 2A (PP2A) [93-95]. Toujours dans la partie N-terminal se retrouvent deux sites « Speckled Nuclear Localisation » (SNL) permettant sa localisation et distribution nucléaire de manière ponctuelle [96]. Nous y trouvons aussi un domaine de liaison à l'ADN CXXC, une région riche en cystéine située à même le premier domaine de répression (RD1) qui a pour fonction l'interaction avec l'ADN des CpG non-méthylés et aiderait dans l'interaction avec les protéines PcG (BMI-1 et CtBP) ainsi que HDAC1 [91]. Il est aussi démontré que la conservation de ce domaine lors des fusions MLL est essentielle à la leucémogénèse, alors que dans le cas où il est perdu ou muté, il y a perte du potentiel d'immortalisation et il est alors impossible d'induire la leucémie chez la souris [97]. La partie N-terminal comporte aussi quatre domaines en doigt de zinc « Plant Homeodomain » (PHD), dont la séquence coordonne aussi deux ions de zinc, et un Bromodomaine entre le domaine PHD3 et PHD4 qui sont responsables de la liaison à d'autres protéines [98, 99]. Les fonctions exactes des deux premiers domaines PHD et PHD4 ne sont pas encore parfaitement comprises, mais nous savons qu'ils coopèrent dans les interactions entre les fragments MLL-C et MLL-N [100], son homodimérisation, ainsi que dans les mécanismes de dégradation protéique par la cellule [101, 102]. PHD3, conjointement avec le bromodomaine, est le mieux caractérisé et est connu pour son

rôle à la fois dans la répression, mais aussi dans la transcription des gènes cibles de MLL. En effet, son interaction avec la cyclophiline nucléaire Cyp33, un corépresseur, régule la répression des gènes cibles *in vivo* par la désacétylation des histones, mais PHD3 interagit aussi avec la lysine 4 de l'histone 3 triméthylée (H3K4me3) qui est le produit de l'action catalytique du domaine SET et est donc caractéristique de la transcription active des gènes cibles de MLL [102-104]. Ce double rôle pour PHD3-bromodomaine lui vaut ainsi une importance centrale dans les fonctions de MLL et, la liaison entre Cyp33 et H3K4me étant inhibitrice l'une envers l'autre, il est vu comme le principal interrupteur entre la répression et la trans-activation des gènes régulés par MLL [105]. Il est d'autant plus intéressant de noter que l'inclusion des domaines PHD (hormis PHD1 seul) dans les fusions MLL-AF9, autrement oncogénique, inhibe la leucémogénèse chez la souris [106]. Aussi, une autre étude a montré que l'incorporation de PHD3 dans les fusions MLL-ENL empêche l'immortalisation des cellules souches progénitrices hématopoïétiques des souris et ainsi, son absence est primordiale pour la leucémogénèse liée aux translocations MLL-ENL [107]. En plus du domaine SET, MLL-C possède aussi un domaine appelé « Transcriptional Activation Domain » (TAD) capable de recruter la protéine coactivatrice « CREB-Binding Protein » (CBP), qui comme son nom l'indique, peut recruter la protéine « Cyclic AMP Response Element-Binding protein » (CREB) activant tout comme son voisin le domaine catalytique SET, la transcription de gènes (Figure 9) [108].

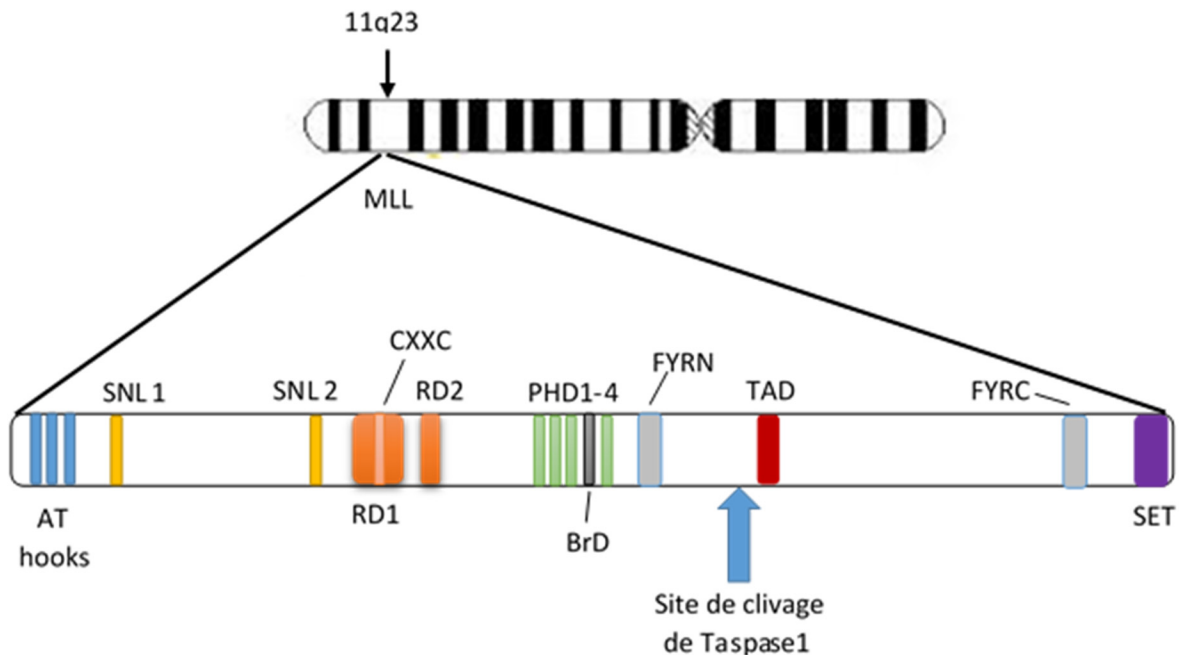


Figure 9 : Localisation chromosomique et principales composantes du gène MLL

Situé sur le bras long du chromosome 11, plus précisément au niveau de la bande chromosomique 11q23, le gène *MLL* contient plusieurs sites et domaines qui vont aider dans les rôles d'activateur et d'inhibiteur de la transcription ainsi que dans la structure et la localisation nucléaire de la protéine MLL. Parmi ses principaux sites nous retrouvons les régions AT Hooks, les signaux de localisation nucléaire 1 et 2 (SNL), les domaines de répression (RD1 et RD2), le domaine CXXC, 4 plant homology domain (PHD), un bromodomaine (BrD), les motifs d'interaction des sous-unités N et T (respectivement FYRN et FYRC), le domaine d'activation transcriptionnelle (TAD) et le domaine à activité méthyltransférase H3K4 (SET). On retrouve aussi le site de clivage de l'enzyme Taspase1 qui sépare la protéine MLL en ses deux sous-unités : MLL-N et MLL-C.

3.2 Rôle de la protéine MLL dans la régulation de la transcription

Les domaines aux fonctions parfois inverses de la protéine MLL amènent nécessairement plusieurs rôles pour celle-ci, dont certains restent encore méconnus. Les principales fonctions de MLL semblent néanmoins être liées au développement embryogénique ainsi qu'au bon fonctionnement de l'hématopoïèse via la régulation des gènes *HOX* [109]. La régulation des gènes cibles de MLL n'est toutefois pas soumise à l'action de MLL seul, mais plutôt au complexe protéique que forme MLL avec différentes protéines nucléaires qui contrôlent au final son activité méthyltransférase [110-112].

Les gènes *HOX* sont un groupe de gènes hautement préservés dans l'évolution codant pour des facteurs de transcription régulant d'autres gènes notamment durant le développement axial de l'embryon et doivent eux-mêmes être rigoureusement régulé pour mener à bien leurs fonctions [113].

De par son homologie avec les gènes du groupe trithorax chez la drosophile, il est raisonnable de croire que les fonctions de MLL sont aussi semblables à ceux-ci chez les mammifères et font de MLL, le principal activateur des gènes *HOX* [114]. Des souris knock-out pour le gène MLL (*MLL* $-/-$) ont ainsi été générées et ont effectivement montré dans plusieurs expériences qu'elles ne peuvent pas survivre sans MLL. La mortalité embryonnaire survenant après 10 jours est causée par des malformations squelettiques [115]. La mortalité embryonnaire n'est cependant pas due à une mauvaise initiation de la transcription des gènes *HOX*, mais bien au maintien de leur expression qui nécessite alors l'action de MLL [116]. Des souris hétérozygotes (*MLL* $+/-$) sont quant à elles viables, mais montrent un retard de croissance et des anomalies dans le développement hématopoïétique, laissant voir un rôle clé de MLL dans la croissance des précurseurs de lignées cellulaires [117]. Des expériences voulant tester l'importance de MLL dans l'hématopoïèse post-natale avec un modèle murin où *MLL* peut être excisé (knock-out MLL inducible) ont mis en évidence l'importance de MLL pour la capacité d'autorenouvellement des CSH de la moelle osseuse et du foie au stade fœtal [118, 119]. MLL est aussi retrouvé interagissant avec plusieurs complexes protéiques distincts et régulant l'expression d'un grand nombre de gènes hormis les gènes *HOX* dont il reste tout de même reconnu comme le principal régulateur [120, 121].

3.3 Translocations chromosomiques de *MLL* dans les leucémies

Avec les techniques d'analyse génétique modernes, plusieurs mutations récurrentes ont pu être identifiées chez les patients leucémiques et semblent être derrière le processus leucémogénique. Bon nombre de celles-ci impliquent des réarrangements chromosomiques et touchent régulièrement les mêmes gènes [122-124]. Les translocations chromosomiques sont des événements génétiques qui surviennent lorsque deux chromosomes s'échangent des fragments chromosomiques. L'échange peut être déséquilibré s'il y a perte de matériel génétique ou équilibré si celui-ci est préservé à travers l'échange. Les translocations à l'origine de plusieurs leucémies, notamment celles impliquant le gène *MLL*, font partie de cette deuxième catégorie et sont vraisemblablement causées par une erreur lors de la réparation de brisures double-brins de l'ADN par la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) [125]. *MLL* contient une région BCR (Breakpoint Cluster Region) de 8.3 Kb située sur la partie N-terminal, entre les domaines CXXC et PHD de la protéine résultante. Cette région comporte des sites de clivage de la topoisomérase II, influençant probablement l'apparition de brisures double-brins dans cette région [126-128]. Il suffit ensuite qu'une deuxième brisure double-

brins survienne dans un autre chromosome, ce qui peut se produire de façon endogène comme lors de la recombinaison V(D)J propre au développement lymphoïde [129] ou exogène comme par des inhibiteurs de la topoisomérase II (chimiothérapie) [130, 131], pour augmenter significativement le risque de réparation aberrante et de translocation chromosomique [132]. Bien que les mécanismes derrière la leucémogénèse suivant un réarrangement de *MLL* ne soient pas encore parfaitement compris, toutes translocations impliquant *MLL* dans une CSH n'aboutissent pas nécessairement à une leucémie. Il faut que la partie N-terminal de *MLL* garde son cadre de lecture et fusionne avec certains autres gènes remplaçant sa partie C-terminal, appelés partenaires de fusion, pour produire une protéine chimérique lui conférant des propriétés oncogéniques, soit l'arrêt du développement cellulaire et une croissance dérégulée [133-136]. Il est connu que les gènes cibles normaux de *MLL* sont souvent régulés aussi par la protéine chimérique, mais que ses fonctions sont altérées, dérégulant ainsi l'expression de plusieurs gènes *HOX* et accumulant des modifications épigénétiques aberrantes de la chromatine [137-139]. La fusion de la partie N-terminal de *MLL*, tel que mentionné précédemment, ne doit pas inclure les domaines PHD, d'ordinaire exclus lors d'une fusion au niveau de la région BCR, sans quoi il semble y avoir perte des propriétés oncogéniques. Il a aussi été plusieurs fois démontré qu'une seule de ces mutations générant une fusion *MLL* avec l'un de ses nombreux partenaires est suffisante pour produire des cellules souches leucémiques [140] et depuis, plusieurs expériences ont pu reproduire dans des modèles *in vivo* la leucémogénèse à partir de différentes fusions *MLL* [141-146]. Le type de leucémie qui résulte d'une translocation de *MLL* dépend grandement aussi de son partenaire de fusion, qui comme son nom l'indique, peut amener au développement de LMA, de LLA (type T ou B) et de leucémies mixtes.

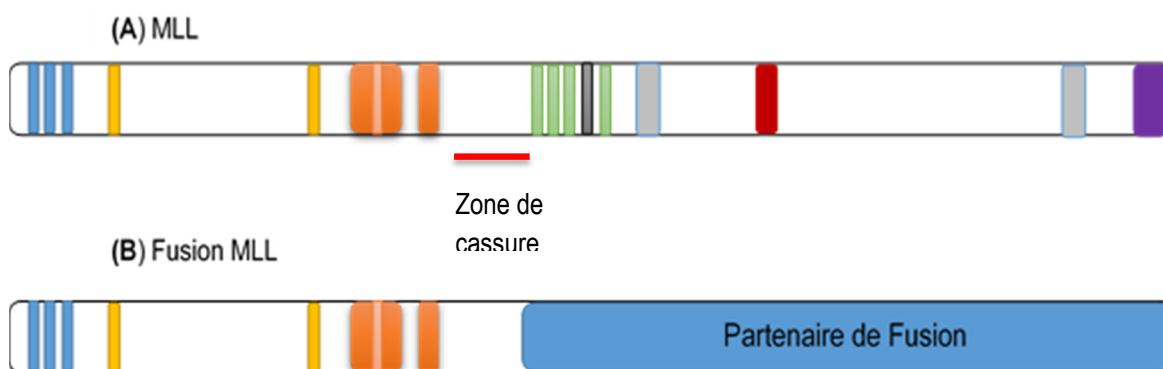


Figure 10 : Translocation chromosomique menant à une fusion MLL

(A) MLL wild-type avec la zone de cassure (BCR) où a lieu la translocation de sa partie N-terminal. (B) Un exemple de fusion MLL avec un partenaire de fusion (longueur variable) remplaçant sa partie C-terminal.

3.3.1 Partenaires de fusion communs de MLL

8 à 10 % des leucémies aiguës sont causées par une translocation du gène *MLL*. Elles sont retrouvées principalement au niveau des LLA chez les bébés (1 an et moins) et les LMA pédiatriques (1 à 18 ans) qui arborent une anomalie au niveau du gène *MLL* dans respectivement 80% et 35-50% des cas [147-151]. Plus de 79 partenaires de fusion directs (*MLL-X*) ont été identifiés et sont classés en 2 grandes catégories selon leur localisation cellulaire ; soit des protéines cytoplasmiques ou des protéines nucléaires [152]. Cependant, avec la caractérisation et l'ajout imminent de nouveaux partenaires de fusion, de nouvelles classifications sont proposées, notamment en séparant les protéines cytoplasmiques selon leur fonction principale. Nous comptons donc à ce jour, 23 protéines nucléaires, 53 protéines cytoplasmiques (ayant des rôles variées dans différentes voies de signalisation cellulaire), une protéine de la matrice extracellulaire et une enzyme de la matrice mitochondriale. Quelques fusions qui ne figurent pas encore dans la liste des partenaires officiels de *MLL* n'ont pas encore été caractérisées quant à leur rôle (s'ils en ont un) autrement que lors de leur fusion à *MLL* (*TRCN18*, *BTBD13*, *LOC100131626* et *LOC100128568*) [152, 153]. Certaines fusions sont très rares et n'ont été caractérisées que chez quelques patients [154-156], mais plus de 80% des translocations *MLL* retrouvées chez les patients sont issues des mêmes 6 partenaires de fusions. Cinq d'entre-eux sont des protéines nucléaires avec un rôle lié à l'élongation transcriptionnelle, soit en faisant partie du super complexe d'élongation (SCE) ou en interagissant avec l'ARN polymérase II (ARNPII), alors que le dernier (AF6) est une protéine cytoplasmique [152, 157, 158]. Ces translocations de *MLL* sont :

- t(4;11)(q21;q23) formant la fusion *MLL-AF4*
- t(9;11)(p22;q23) formant la fusion *MLL-AF9*
- t(11;19)(q23;p13.3) formant la fusion *MLL-ENL*
- t(10;11)(p12;q23) formant la fusion *MLL-AF10*
- t(6;11)(q27;q23) formant la fusion *MLL-AF6*
- t(11;19)(q23;p13.1) formant la fusion *MLL-ELL*

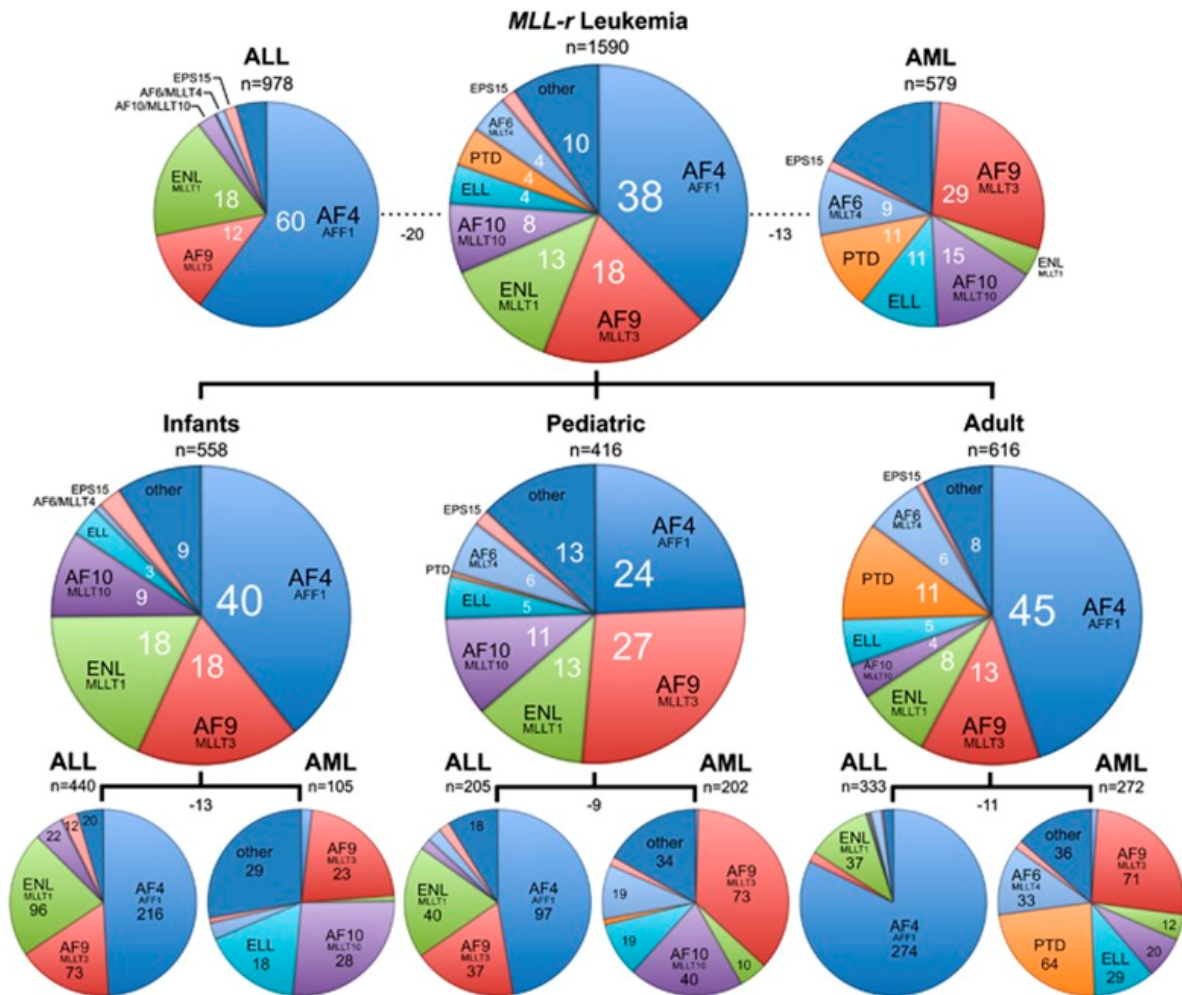


Figure 11 : Cohorte de leucémies issues des principaux réarrangements MLL

Afin d'illustrer les proportions des différents partenaires de fusion MLL en clinique, une cohorte de 1590 patients ayant développé une leucémie à partir d'un réarrangement chromosomique du gène MLL sont classés en fonction du type de leucémies globalement (première rangée) et de l'âge des patients (deuxième rangée), avant de sous-diviser les groupes d'âge à nouveau en fonction des types de leucémies.

Tiré de Meyer, C et al. "The *MLL* Recombinome of Acute Leukemias in 2013." *Leukemia* 27.11 (2013): 2165–2176.

3.4 La fusion MLL-ENL

La protéine de 559 acides aminés Eleven-Nineteen-Leukemia (ENL), aussi appelé MLLT1, tient son nom de sa fusion avec *MLL* qu'il complète en C-terminal pour former un facteur de transcription oncogénique chimérique capable d'initier à lui seul la leucémogénèse de la cellule [159]. On connaît peu quant à la fonction normale de ENL, mais nous savons qu'il fait partie de plusieurs complexes protéiques, desquels le super complexe d'élongation (SCE) avec plusieurs autres protéines souvent

retrouvées dans des fusions directes MLL (AF4, AF10, AF5q31, AF17, ELL, LAF4 et AF9 dont il partage une certaine homologie avec ce dernier) et qu'il semble donc jouer un rôle au niveau de la transcription et dans les modifications épigénétiques de la chromatine [160, 161]. Sa principale caractéristique est son domaine YEATS en N-terminal, généralement perdu lors de la fusion MLL-ENL, qui lui permet notamment d'interagir avec les histones H1 et H3 [162]. On le retrouve aussi dans deux différents complexes SWI/SNF, renforçant son rôle dans les modifications de la chromatine et dans la transcription, consistant avec son homologue Taf14 chez la levure et retrouvé aussi dans des complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF [163, 164]. Sa partie C-terminal est néanmoins plus importante dans la compréhension des fusions MLL-ENL puisqu'elle contient un domaine d'interaction protéique CTD essentiel au potentiel leucémogénique de la protéine chimérique [159, 165]. Ce domaine est responsable entre-autre de l'interaction de ENL avec notamment ABI1 [166], mais surtout pour son interaction avec les plusieurs protéines du SCE et probablement au cœur de la leucémogénèse dans plusieurs cas de fusions MLL [157, 167, 168]. Interagissant avec ENL dans ce complexe d'élongation, on retrouve notamment AF4 qui peut recruter la « positive transcription elongation factor b » (P-TEFb), une kinase connue pour contrôler la phase d'élongation de la transcription en phosphorylant l'ARNPII [169, 170]. Une deuxième protéine clé de ce complexe est « disruptor of telomeric silencing 1 like » (DOT1L), une histone méthyltransférase H3K79 liant aussi ENL [162, 167, 171]. Lors d'une fusion MLL-ENL, DOT1L est recruté, via la partie C-terminal de ENL de cette protéine chimérique, aux promoteurs cibles de MLL et engendre ainsi une accumulation de méthylation H3K79 [172, 173]. S'en suit une surexpression aberrante de ces gènes, notamment les gènes *HOX* du cluster A (*HOXA7* et *HOXA9*) et le cofacteur *MEIS1* menant à la transformation de la cellule [137, 174-176]. Les fusions MLL-ENL peuvent aboutir soit à une LLA-B, une LLA-T, une LMA ou une LAPM [177, 178].

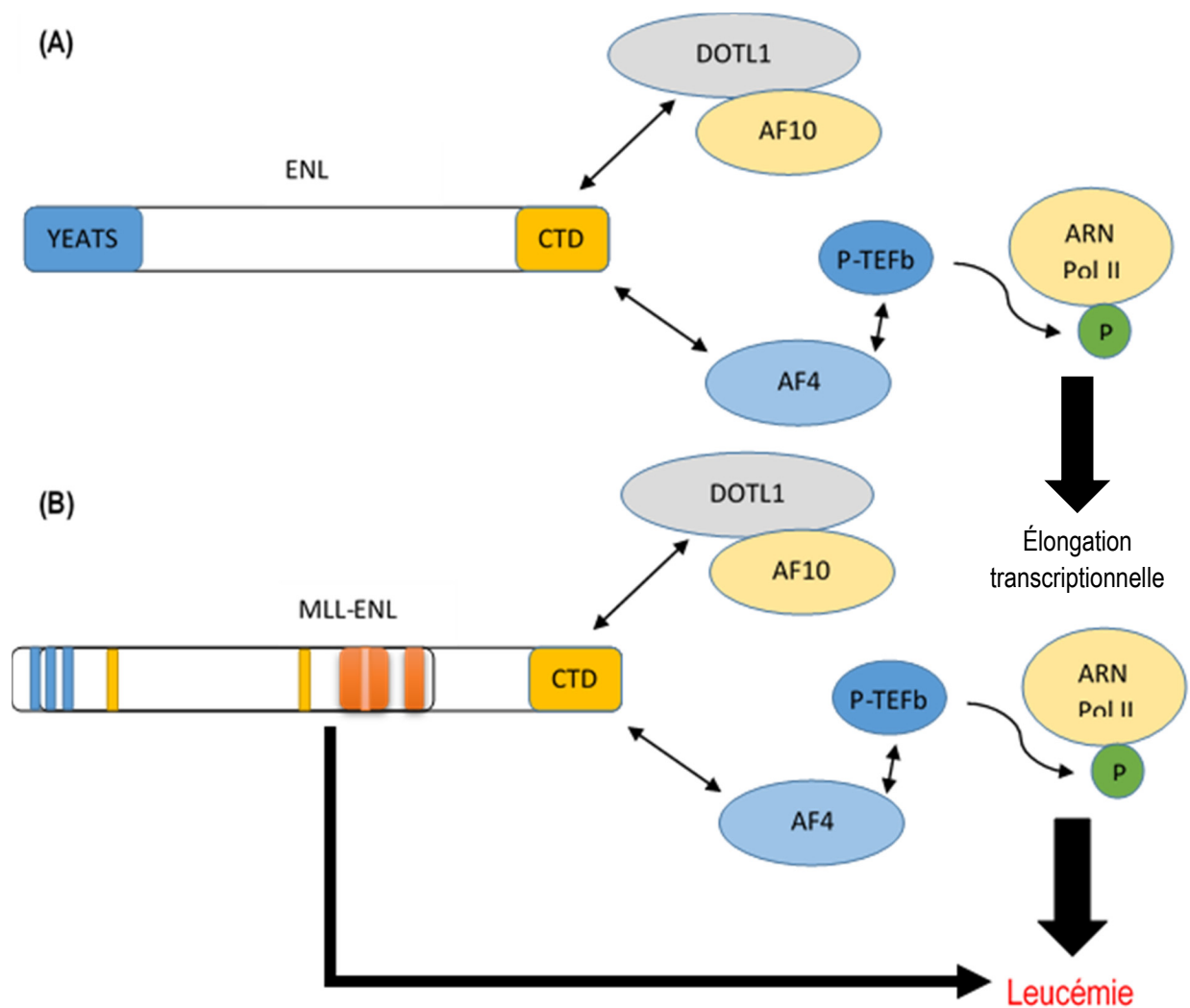


Figure 12 : Structure et interactions avec le super complexe d'élongation de MLL et de la protéine chimérique MLL-ENL

(A) La protéine ENL et son domaine YEATS en N-terminal et son domaine CTD en C-terminal qui interagit avec les protéines du super complexe d'élongation pour mener vers la régulation normale de l'élongation transcriptionnelle. (B) La protéine chimérique MLL-ENL comprend la partie N-terminal de MLL et la partie C-terminal de ENL. Le domaine CTD de ce dernier est d'autant plus toujours fonctionnel et peut aller recruter les protéines du SCE, mais, à cause des domaines en N-terminal de MLL, il y a dérégulation de l'élongation transcriptionnelle qui ciblera plutôt des gènes comme les gènes de la famille *HOX* et mène ainsi vers le développement d'une leucémie.

3.5 Modélisation *in vivo* de leucémies aiguës humaines MLL

Plusieurs modèles *in vivo* ont été développés au cours des années afin de tenter de reproduire et d'étudier le développement des leucémies humaines. Notamment, plusieurs modèles de souris « knock-in » ou des souris qui recevaient des greffes de CSH de souris dans lesquelles on avait incorporé des gènes de fusion et qui développaient des leucémies parfois semblables, mais parfois aussi différentes de celles homologues chez l'humain pour certaines [141, 179-181]. Pour la fusion MLL-ENL plus spécifiquement, plusieurs expériences réalisées chez la souris mettent en évidence son potentiel leucémogénique. Par exemple, une expérience montra la capacité de la fusion MLL-ENL à initier la transformation leucémique *in vitro* de cellules souches hématopoïétiques de souris transduites avec un rétrovirus, mais aussi *in vivo* en les transplantant dans d'autres souris immunodéficientes irradiées pour voir le développement de leucémies myéloïdes [182]. Une autre équipe conçut aussi un modèle *in vivo* de souris qui, par un système cre-recombinase et de site LoxP, produit la translocation *de novo* MLL-ENL dans les cellules de la souris. Celles-ci développent alors aussi des leucémies myéloïdes [183]. Les souris se révèlent ainsi un modèle *in vivo* important dans l'étude du système hématopoïétique et dans le développement des leucémies, mais il n'est pas certain que les conclusions tirées de souris peuvent directement s'appliquer aux humains.

Dans le but de créer un modèle humanisé de leucémies, des modèles de souris immunodéficientes ont alors été mis au point pour être capable de prendre des xénogreffes de cellules leucémiques humaines et d'observer leur développement *in vivo*. Le génie génétique donna ainsi naissance à un modèle de souris issu du croisement entre les lignées de souris *SCID* (Severe Combined Immunodeficiency) et de souris *NOD* (Non-Obese Diabetic) qui est vite devenu très utilisé dans la modélisation des leucémies générées par le gène de fusion MLL : le modèle *NOD/SCID* [184] [185, 186]. Notre laboratoire a utilisé une version de ce modèle, les BxN *NOD/SCID*, dans une première expérience avec des CSH humaines transduites pour exprimer la fusion MLL-ENL et a observé, en les transplantant dans ces souris, le développement de leucémies lymphoïdes aiguës de type B, mais aucune leucémie myéloïde [187]. Cette tendance quant au développement de LLA-B dans ce modèle de souris a pu aussi être observée par une autre équipe avec une autre fusion MLL, la fusion MLL-AF9, alors que les modèles de souris « knock-in » MLL-AF9 favorisent généralement le développement de LMA [188]. Pour d'autres fusions comme MLL-AF4 et MLL-AF10, aucun modèle humanisé ne s'est avéré pour l'instant capable de générer des leucémies *in vivo* [189, 190].

4. Hypothèses et objectifs

4.1 Problématique

Comme il a déjà été plusieurs fois observé, les leucémies aiguës se développent suivant l'apparition de mutations dans des cellules souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices parmi une vaste gamme d'aberrations génétiques capables d'initier le processus leucémogénique, parfois unique ou de manière concomitante, dérégulant les mécanismes de différenciation et d'auto-renouvellement de la cellule. La translocation MLL-ENL semble pour sa part être capable d'initier le processus leucémique dans les modèles *in vivo*, mais, bien que la cellule impliquée et le microenvironnement semblent les facteurs déterminants de la leucémogénèse et du type de leucémie résultant, ce processus n'est toutefois pas encore parfaitement compris surtout quant à la détermination des différents phénotypes leucémiques pour cette mutation et au rôle du gène de fusion MLL-ENL une fois la leucémie engendrée.

4.2 Hypothèse et objectifs

Afin de tirer avantage de la mise au point de nouveaux modèles *in vivo* de leucémies humaines via les xénogreffes de cellules souches hématopoïétiques humaines exprimant différentes translocations chromosomiques dans des souris immunodéficientes, nous voulons voir s'il est possible de répliquer le développement des différentes leucémies retrouvées chez l'humain à partir d'une même translocation MLL-ENL dans notre modèle, soit des LLA-B/T, des LMA ou des LAPM.

Dans un deuxième temps, si le gène de fusion MLL-ENL semble pouvoir initier des leucémies humaines dans notre modèle, il n'est pas encore clair que d'autres événements survenant dans la cellule ne jouent pas aussi un rôle déterminant dans le processus leucémique et son maintien. Nous voulons ainsi déterminer l'importance de l'expression continue de MLL-ENL suivant le développement initial de la maladie, dont nous croyons en effet que le rôle ne se limite pas seulement à la transformation de la cellule en cellule souche leucémique, mais qu'il est nécessaire au maintien du phénotype leucémique. Pour tester cette hypothèse, nous allons induire l'expression de la cre recombinase dans les cellules leucémiques primaires exprimant le gène MLL-ENL bordé par des sites LoxP afin d'exciser MLL-ENL du génome de ces cellules. Par la suite, les cellules

leucémiques n'exprimant plus le gène MLL-ENL seront greffées dans la moelle osseuse de souris secondaires afin de voir s'il leur est possible de régénérer la leucémie sans ce gène de fusion.

Chapitre II – Matériel et méthodes

1. Purification de cellules souches/progénitrices hématopoïétiques de sang de cordon ombilical humain par sélection négative

Suivant l'approbation de mères venant d'accoucher, le sang du cordon ombilical de leur nouveau-né est prélevé et acheminé à notre laboratoire dans des poches de sang, contenant un anticoagulant, via le centre hospitalier de l'Hôtel-Dieu de Lévis et la banque de sang d'Héma-Québec. Le sang de plusieurs poches ayant été récolté il y a moins de 72h est mélangé dans une bouteille, sous une hotte stérile, et dilué avec une quantité équivalente en volume de « phosphate-buffered saline » (PBS) contenant 2% (volume/volume) de sérum de veau fœtal « cosmic calf serum » (CCS) de HyClone®. Le sang dilué est ensuite déposé doucement dans plusieurs tubes falcon de 50mL contenant 12.5mL de Ficoll. Les tubes falcon sont remplis avec le sang en prenant soin de ne pas le mélanger avec la phase de Ficoll dans le fond des tubes, avant d'être centrifugés à 1500 RPM pendant 30 minutes et sans actionner le frein de la centrifugeuse à la fin du cycle. Le sang est alors séparé par gradient, grâce au Ficoll, en plusieurs phases : la première phase contenant le plasma sanguin et les plaquettes est aspirée et jetée, l'interphase est récoltée et contiendra une première couche de cellules mononuclées (dont les CSH et les cellules progénitrices) déposé sur une phase de Ficoll, puis la dernière phase contenant les érythrocytes et les granulocytes est jetée avec les tubes. Les cellules récoltées dans l'interphase sont à nouveau diluées dans du PBS 2% CCS avant d'être centrifugées à 1200 RPM pendant 10 minutes. À ce stade, une lyse des globules rouges au chlorure d'ammonium peut être effectuée si le culot contient visiblement beaucoup de globules rouges. Pour ce faire, on resuspend le culot dans 3.5 mL de chlorure d'ammonium (≈ 0.15 M) et on laisse les cellules à 4°C sur l'orbitron pendant 20 minutes, avant de les centrifuger à nouveau une fois la lyse terminée. Le culot obtenu est redilué dans du tampon PBS 2% CCS dans un volume donnant une concentration d'environ 7×10^7 cellules par mL et un cocktail d'anticorps comprenant CD2, CD3, CD7, CD14, CD16a, CD19, CD24, CD41, CD56, CD66b et CD235a est rajouté et laissé à incuber 20 minutes à température ambiante (Tp) avec agitation lente. Des colloïdes magnétiques sont ensuite ajoutés (60 μ L/mL) et le mélange est laissé 10 mins à Tp afin que ceux-ci se couplent avec les anticorps. Les cellules sont par la suite passées dans une colonne magnétique qui retient les cellules marquées par les anticorps couplés aux colloïdes magnétiques. Les cellules non-

marquées pour les anticorps de lignées (Lin -) sont ainsi éluées et récoltées pour être finalement diluées à nouveau dans du PBS 2% CCS, centrifugées à 1200 RPM et remises en suspension dans du milieu « minimum essential medium alpha » (MEM- α) et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans un cryotube afin d'être congelées viablement à -80°C. Une petite quantité de cellules isolées est cependant analysée par cytométrie de flux après avoir été marquée par deux anticorps, CD34 et CD38 humains. Le pourcentage de CD34+, marquant les cellules souches, est le principal indicateur du succès de la purification.

2. Technique de clonage

2.1 Les plasmides

Dans un premier temps, dans un vecteur d'expression virale « Murine stem cell virus » (MSCV), le gène de fusion MLL-ENL est inséré et bordé par 2 séquences de 13 paires de bases appelées « sites LoxP ». Ces séquences sont les sites de reconnaissance pour la protéine cre-recombinase qui permet à cette enzyme de se lier à l'ADN et d'exciser la séquence à l'intérieur des sites LoxP pour ensuite refermer l'ADN, ce qui sera nécessaire pour la seconde partie de l'expérience. Le plasmide MSCV contient aussi 2 séquences « long terminal repeat » (LTR) en 5' et en 3', la séquence de la protéine fluorescente « enhanced green fluorescent protein » (eGFP), qui nous permet de marquer les cellules infectées par le virus, sous contrôle du promoteur de la PGK humaine. Finalement le gène de résistance à l'ampicilline est aussi présent et permet la sélection des bactéries transformées par le plasmide et donne le vecteur MSCV MLL-ENL LoxP eGFP.

Un deuxième plasmide est aussi préparé pour la deuxième partie de l'expérience en utilisant cette fois un vecteur lentiviral (Pmab) contenant aussi 2 séquences LTR en 5' et 3', le gène de résistance à l'ampicilline ainsi que le promoteur de la PGK humaine. Cependant, celui-ci contient plutôt comme marqueur le gène de la protéine « blue fluorescent protein » (BFP). Deux versions de ce vecteur sont construites, l'une avec le gène de la cre-recombinase (Pmab Cre-rec. BFP), dont l'expression de ce dernier est contrôlée par le promoteur de la PGK humaine, et un vecteur contrôle sans la cre-recombinase (Pmab control BFP).

Ces vecteurs sont créés en introduisant les inserts (MLL-ENL LoxP et Cre-recombinase) avec des sites de restrictions de part et d'autre, dans des sites de clonage multiple (MCS) présents sur les vecteurs. Pour l'insert de la Cre-recombinase, les sites de restrictions ont été rajoutés par réaction PCR avant d'être isolé par migration sur gel d'agarose. Pour ce faire, suivant la réaction de PCR, l'insert de la Cre-recombinase migre sur un gel d'agarose 1% avec bromure d'éthidium pour marquer l'ADN. Celui-ci est ainsi visualisé sous rayonnement UV et la bande correspondante est découpée. L'ADN est extrait du gel en suivant les directives du kit d'extraction de bandes « QIAquick Gel Extraction » de Qiagen ®. Les inserts de MLL-ENL LoxP et de la Cre-recombinase ainsi que les plasmides sont alors digérés par des enzymes de restrictions correspondantes, avant de migrer à nouveau sur un gel d'agarose et ensuite être extraits dans le but d'avoir seulement les inserts et les plasmides clivés sans les parties complémentaires. Ceux-ci sont finalement ligués ensemble sous l'action de la T4 DNA ligase de Invitrogen® (≈ 1 unité/mg d'ADN) pendant 1h à 10°C. Les plasmides créés sont ensuite introduits dans des bactéries *E. coli* compétentes (DH5 α pour MSCV MLL-ENL LoxP eGFP et Stbl2 pour les vecteurs Pmab) par choc thermique. Les bactéries sont étalées sur des géloses de milieu « Luria Broth » (LB) contenant de l'ampicilline (100 μ g/mL) et laissées toute la nuit à 37°C pour les DH5 α et 30°C pour les Stbl2. Au matin, des colonies sont piquées et remisent en suspension dans 3mL de milieu LB avec ampicilline dans un incubateur à leur température de croissance respective sous agitation (225 RPM) pendant environ 8h. Les plasmides sont alors extraits des bactéries à l'aide du kit de « GenElute Plasmid Miniprep » de Sigma-Aldrich®. On peut vérifier l'insertion de l'insert par digestion avec les mêmes enzymes de restriction et migration sur gel d'agarose 1% tel que précédemment réalisé et par séquençage des plasmides.

2.2 Production d'ADN

Il est nécessaire de produire une grande quantité d'ADN pour fabriquer les virus qui nous servent dans les prochaines étapes de l'expérience. Nous procédons donc par transformation bactérienne de la même manière que réalisée précédemment lors de la fabrication initiale des plasmides. Ainsi, quelques μ g d'ADN sont ajoutés à une suspension de bactéries *E. coli* compétentes (DH5 α pour MSCV MLL-ENL LoxP eGFP et Stbl2 pour les vecteurs Pmab) et la transformation est faite par choc thermique (30 minutes sur glace, 90 secondes à 42°C avant de retourner 3 minutes sur glace). Les bactéries sont ensuite étalées sur une gélose de milieu LB avec ampicilline (100 μ g/mL) et incubées à leur température optimale de croissance (37°C pour les DH5 α et 30°C pour les Stbl2) pendant

toute une nuit. Au matin, quelques colonies bactériennes qui ont poussé sont piquées et remises en suspension dans 3mL de milieu LB avec ampicilline dans un incubateur à leur température respective pendant environ 8h avec agitation (225 RPM). En fin de journée, la suspension bactérienne est cette fois transférée dans une fiole de 500mL de milieu LB avec ampicilline et remise dans l'incubateur à la température appropriée et avec agitation. Le lendemain matin, l'ADN est extrait avec le kit « Qiagen Plasmid Maxi Kit » de Qiagen® en suivant le protocole fourni par le fabricant.

3. Production de virus par transfection au phosphate de calcium

Lorsque nous avons une quantité d'ADN suffisante, nous pouvons produire nos virus par transfection au phosphate de calcium avec la lignée cellulaire 293T, une variante des cellules d'épithélium rénal embryonnaires HEK-293 qui exprime l'antigène SV40, optimale pour la production de virus.

Nous produisons donc des rétrovirus avec le vecteur MSCV MLL-ENL LoxP eGFP. Dans un premier temps, environ 7 à 8 flasques T75 adhérentes sontensemencées par les cellules 293T dans du milieu « Iscove's modified Dulbecco's medium » (IMDM) de Hyclone® complété avec 10% de CCS et laissées à 37°C avec 5% de CO₂ dans un incubateur quelques jours avant de débiter la transfection jusqu'à atteindre une confluence de +/- 75%. Les cellules sont alors récoltées, comptées et réensemencées dans 50 pétris pour la culture cellulaire de 100x20mm à 2,5x10⁶ de cellules par pétri et avec 10mL de milieu IMDM 10% CCS. Environ 24h plus tard, le milieu est changé et on procède à la transfection en préparant le mélange d'ADN-eau-CaCl₂. Ce mélange est obtenu en mélangeant premièrement notre plasmide MSCV avec deux plasmides rétroviraux :

- VSV-G (la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse) qui contient notamment le gène *env* de la protéine enveloppe permettant l'assemblage des virions.
- PSY-ENV qui contient les gènes *gag* et *pol*, responsable respectivement de plusieurs protéines de structure de la capsid et, pour *pol*, des enzymes virales comme la reverse transcriptase et l'intégrase qui permettent la traduction de l'ARN en ADN et son intégration dans l'ADN génomique de la cellule hôte.

L'ADN, en quantité bien précise pour chaque plasmide, est par la suite mélangé avec de l'eau nanopure et filtré sur une membrane de 0,2µm sous une hotte stérile avant d'être distribué dans plusieurs tubes. On rajoute alors le chlorure de calcium (CaCl₂) goutte à goutte avant de transférer le

mélange ADN-eau-CaCl₂ dans un volume équivalent de tampon « HEPES buffered saline » 2X (HBS) goutte à goutte et de mélanger doucement. Après avoir reposé pendant 20 minutes, le mélange ADN-eau-CaCl₂-HBS est distribué uniformément dans les pétris de 293T qui sont ensuite remis à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 48h en changeant le milieu après 24h. Après 48h une première récolte des rétrovirus est effectuée prélevant et filtrant le surnageant des pétris sur une membrane de 0,2µm. Le milieu contenant les rétrovirus MSCV MLL-ENL LoxP eGFP est centrifugé à 22 000 RPM pendant 2h à 4°C dans une ultracentrifugeuse. Le milieu est ensuite aspiré et le culot de rétrovirus est resuspendu dans du milieu « Gene Transfer » (GT) pour virus (composé de milieu X-VIVO10© de Bio Whittaker®, de 1% de BSA et de 2mM de L-glutamine). Les virus dans le milieu GT sont ensuite cryogénisés et gardés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Du milieu IMDM 10% CCS est remis dans les pétris et une deuxième récolte peut être faite le lendemain en procédant de la même façon.

Les lentivirus Pmab cre-rec. BFP et Pmab Control BFP sont produits en suivant la même procédure hormis au niveau de l'ADN utilisé qui, en plus du vecteur d'intérêt, comporte maintenant les plasmides :

- VSV-G (le même que pour les rétrovirus)
- RRE contenant principalement *gag* et *pol* en plus d'un site RRE se liant à la protéine rev et facilitant l'exportation de l'ARN du noyau.
- REV contenant pour sa part le gène *rev* de la protéine rev du virus HIV-1.

Aussi, une seule récolte de lentivirus est effectuée avant de jeter les cellules 293T plutôt que deux comme pour les rétrovirus.

3.1 Titration de virus

Suivant la production de virus, une aliquote pour chacune des récoltes est utilisée pour la titration des particules virales. Pour ce faire, une plaque de 24 puits estensemencée par environ 30 000 cellules HeLa dans 500µL de milieu IMDM 10% CCS par puits le matin. Le lendemain, les cellules de deux puits sont récoltées après un lavage avec du PBS et un traitement avec 50µL de trypsine-EDTA de Gibco® pendant 2 minutes à 37°C. Les cellules récoltées sont comptées et la moyenne de cellules par puits est alors établie et sera utile lors du calcul final. Une dilution de virus est alors préparée pour chacun des virus à tester. Chaque rétrovirus demande 6 dilutions par récolte qui sont

préparées dans un volume total de 200µL milieu IMDM-10% CCS avec du polybrene à 4mg/mL de Sigma-Aldrich® : 1/40, 1/160, 1/400, 1/1000, 1/4000 et 1/8000. Pour les lentivirus, 5 dilutions sont nécessaires pour calculer les titres viraux : 1/200, 1/666, 1/2000, 1/6666 et 1/20000. Le surnageant des puits est donc retiré et remplacé par 200µL des dilutions correspondantes. Le troisième jour au matin, le surnageant est aspiré et remplacé par 500µL de milieu IMDM à 10% CCS frais. Au quatrième et dernier jour du protocole, le surnageant est aspiré et les cellules adhérentes sont lavées avec 500µL de PBS avant d'être traitées avec 50µL de trypsine-EDTA 2 minutes dans l'incubateur à 37°C. 300µL de PBS à 5% CCS est ensuite ajouté pour arrêter l'action de la trypsine et cellules HeLa infectées sont récoltées et transférées dans un tube à FACS avec bouchon pour chaque dilution. Les cellules sont finalement analysées au FACS par cytométrie de flux (10 000 cellules par échantillon) en établissant le pourcentage de cellules exprimant eGFP pour les rétrovirus MSCV MLL-ENL LoxP eGFP et le pourcentage de cellules marquées à la BFP pour les lentivirus Pmab. Le pourcentage de cellules exprimant le marqueur du virus correspondant, en sachant le nombre de cellules par puits lors de l'infection, permet de déterminer le nombre de cellules totales transduites et d'établir ainsi, avec la moyenne des différentes dilutions, le nombre de particules virales dans les cryotubes de chaque récolte.

4. Infection de cellules souches/progénitrices hématopoïétiques par les rétrovirus

Pour la première partie de l'expérience, les cellules souches et progéniteurs de lignées hématopoïétiques purifiés à partir de sang de cordon ombilical (Lin -) sont infectées par nos rétrovirus MSCV MLL-ENL LoxP eGFP. Pour ce faire, environ 2×10^6 de cellules sont premièrement décongelées dans un bain-marie à 37°C. Dès que la glace a fini de fondre, les cellules sont transférées goutte à goutte dans un tube falcon de 15mL et le cryotube est rincé avec 1mL de milieu GT (composé de milieu X-VIVO10 de Bio Whittaker®, de 1% de BSA et de 2mM de L-glutamine). Toujours goutte à goutte, le tube est rempli de milieu GT et les cellules sont ensuite centrifugées à 1200 RPM avant d'être resuspendues dans 1 mL de milieu, puis comptées avec du bleu de trypan pour les cellules mortes et vivantes. Les cellules sont alors déposées dans un puits d'une plaque de culture cellulaire 6 puits non-adhérente à une concentration de 1×10^6 de cellules par mL, toujours

dans du milieu GT avec un cocktail de facteurs de croissance de Invitrogen™ comprenant du SCF (100 ng/ml), du FLT3-Ligand (100 ng/ml), du G-CSF (10 ng/ml), de l'IL-6 (10 ng/ml) et de la Tpo (15 ng/ml). On rajoute aussi la molécule UM729 (1µg/mL) fournie par le Dr. Sauvageau de l'Université de Montréal [191]. Les cellules sont laissées dans un incubateur à 37°C en pré-stimulation pendant 24h. Parallèlement, une plaque d'infection de 12 puits adhérents pour la culture cellulaire est préparée en étalant 25µL de rétronectine dans le fond de chaque puits avec une pipette et en rajoutant 2mL de PBS par puits pour les laisser sous une hotte stérile à température pièce pour la nuit. Le lendemain au matin, les cellules pré-stimulées sont récoltées et comptées à nouveau. En même temps, le surnageant de la plaque traitée à la rétronectine est aspiré et remplacé par 2mL de PBS avec 2% de BSA par puits et laissé à Tp pendant environ 20 minutes. Finalement, on met 600 000 cellules pré-stimulées par puits de la plaque 12 puits après avoir enlevé le PBS 2% BSA et on rajoute 500µL de suspension de rétrovirus produits précédemment et comprenant idéalement des titres entre 1×10^7 et 7.5×10^7 de virions dans du milieu GT, avant de compléter le volume de chaque puits à 1mL avec du milieu GT avec les cytokines et facteurs de croissance. Après 4h d'incubation à 37°C, le surnageant est aspiré sans toucher aux cellules collées au fond du puits. Les cellules dans le surnageant sont centrifugées, resuspendues dans 100µL de milieu GT et remises dans chaque puits correspondant, qui seront ensuite complétés à 1mL avec du milieu GT et les cytokines/facteurs de croissance. On procède ensuite à 4 phases d'infection toutes les 12 heures en commençant par retirer le surnageant et centrifuger les cellules s'y trouvant avant de les remettre dans chaque puits. On rajoute alors à nouveau 500µL de suspension de rétrovirus, pour ensuite compléter à nouveau avec 1mL de milieu GT et cytokines/facteurs de croissance. Au dernier jour, l'après-midi, les cellules sont alors récoltées en effectuant plusieurs lavages et centrifugations afin de se débarrasser de toutes les particules virales en suspension dans le milieu, comptées et resuspendues dans du PBS pour être injectées dans une souris.

5. Xénogreffe des cellules infectées dans un modèle *in vivo*

5.1 Souris NSG

Le modèle de souris humanisée de la souche NOD.Cg-Pkdc^{Scid}Il2rg^{Tm1Wjl}/SzJ (abrégée NSG™) est le modèle *in vivo* utilisé au cours de cette expérience et provient du laboratoire Jackson. Les limitations du modèle *NOD/SCID* quant à leur durée de vie relativement courte et l'activité résiduelle de leurs cellules NK apporte tout de même une certaine limite quant à l'utilisation du modèle

NOD/SCID dans certaines xénogreffes, ce qui a mené au développement du modèle NSG. Ce dernier est issu de souris immunodéficientes homozygotes dont lesquelles on a ajouté une mutation ciblée du récepteur de l'interleukine-2 au niveau de sa chaîne gamma (IL-2R γ), prévenant ainsi complètement le développement des cellules NK et des lymphocytes B et T matures [192-194]. Les souris NSG sont capables de recréer une population hématologique multi-lignées à partir de greffes de CSH humaines et sont par le fait même propice à l'étude du processus leucémogénique, tout en ayant une durée de vie beaucoup plus longue (plus de 90 semaines au lieu de ≈ 37 semaines pour les souris *NOD/SCID*) [185, 193, 195]. Les souris sont gardées dans un environnement stérile et manipulées dans des enceintes biologiques au besoin, tout au long de leur vie, pour prévenir l'apparition de maladies infectieuses.

5.2 Irradiation des souris

Pour permettre la prise de greffons humains, il faut affaiblir le système hématopoïétique de nos souris NSG. Pour ce faire, nous procédons par une irradiation sub-létale de nos souris à 200cGy au moins 24h avant la transplantation. Les souris immunodéficientes doivent ensuite rester en conditions stériles jusqu'à leur analyse et reçoivent pour le mois suivant de la liquamycine (oxytétracycline longue action), un antibiotique qui est mélangé à leur eau afin de prévenir des infections opportunistes jusqu'à ce que les cellules souches hématopoïétiques humaines reconstruisent leur système immunitaire.

5.3 Injection intra-fémorale

Les cellules sont injectées dans les souris par voie intra-fémorale. Les cellules se logent ainsi directement dans la moelle osseuse des souris et peuvent ainsi plus facilement se greffer à ce site principal de l'hématopoïèse en comparaison avec une injection intraveineuse, plus facile à réaliser, mais moins efficace. Ainsi, les souris irradiées la veille sont mises sous sédation par un système contrôlé d'inhalation d'isoflurane concentré à 2% dans l'air respiré par la souris. La région du genou droit est rasée et lavée à l'éthanol pour désinfecter et bien mettre en évidence le site d'injection. On procède ensuite à l'injection des cellules en perforant le fémur à partir de sa partie inférieure, au niveau du genou, et en remontant jusqu'à son centre, dans la moelle osseuse. Lors de la première partie de l'expérience où les CSH et cellules progénitrices transduites par nos rétrovirus, 250 000 cellules en suspension dans un volume de 25 μ L de PBS sont injectées par souris. Pour la deuxième partie, c'est entre 2500 et 5000 cellules qui sont injectées dans un même volume de PBS pour

chaque souris (nous avons calculé dans le passé que ce nombre devrait suffire à permettre à au moins une cellule souche leucémique de régénérer la leucémie). Le site d'injection est alors à nouveau désinfecté et 0,1mL de buprénorphine, un analgésique opioïde, est injecté sous-cutané au niveau des omoplates avant de remettre la souris dans sa cage pour son réveil. Elles sont enfin placées sous observation jusqu'à environ 24 semaines pour surveiller l'apparition de symptômes suggestifs de leucémie.

5.4 Euthanasie et prélèvement des cellules pour analyse

Lors de la phase d'observation, on regarde alors tous signes cliniques qui peuvent signifier le développement d'une pathologie chez les souris injectées. Les leucémies primaires et secondaires vont prendre plusieurs semaines avant de se développer et de manifester des symptômes visibles sur la souris qui peuvent être la pâleur (visible au niveau des pattes des souris et des extrémités comme la queue et les oreilles), un pelage hirsute, l'amaigrissement, la faiblesse/fatigue (la souris est moins active que les autres et reste plus souvent sans bouger), un dos recroquevillé et les yeux rouges (pouvant indiquer potentiellement un envahissement méningé par les cellules leucémiques). Une souris qui présente un ou plusieurs de ces symptômes peut être observée quelques jours selon les symptômes et est euthanasiée dès que l'on juge que la souris est véritablement malade. Si aucun signe clinique n'est apparent, les souris sont euthanasiées entre 22 et 24 semaines suivant l'injection et analysées en suivant le même protocole que celles qui présentaient les signes d'une pathologie. Pour ce faire, la souris est anesthésiée et mise sous sédation avec une injection d'un mélange de kétamine et de xylazine et euthanasiée par dislocation cervicale une fois bien endormie. On procède ensuite en prélevant la rate de chaque souris et en récoltant les principaux os des deux pattes postérieures de la souris, soit les tibias, les fémurs et les os du bassin. Les cellules de la moelle osseuse de ces os sont récupérées en lavant l'intérieur des os avec du PBS 5% CCS alors que la rate est pesée et broyée dans du PBS 5% CCS sur un tamis cellulaire pour récolter les cellules de la rate. Une partie des cellules pour les deux tissus est alors utilisée suivant la récolte pour une analyse par cytométrie de flux alors que le reste des cellules sont cryogénisées dans du milieu de congélation (MEM- α avec 10% de DMSO) à -80°C.

6. La cytométrie en flux

Les cellules prélevées dans différentes étapes de cette expérience sont séparées en aliquotes pour être analysées par cytométrie en flux (Fluorescence-activated cell sorting ou FACS). Cette technique permet de faire défiler des cellules à grande vitesse devant un faisceau laser en les comptant et les caractérisant selon la lumière réémise. La caractérisation des cellules s'effectue par fluorescence selon les anticorps couplés à des fluorochromes qui ont été utilisés pour marquer l'échantillon de cellules, ainsi que les protéines fluorescentes qui peuvent être exprimées par la cellule (eGFP et BFP). Ces marquages vont donc séparer un échantillon de cellules en différentes populations quantitativement et qualitativement pour nos analyses (immunophénotypage). Lors de nos analyses par cytométrie en flux, les cellules d'un même échantillon peuvent être marquées avec jusqu'à 3 anticorps associés à nos trois principaux fluorochromes (PE, PC5 et APC) en plus des deux protéines fluorescentes, eGFP et BFP, qu'elles peuvent exprimer pour les caractériser, mais plusieurs combinaisons d'anticorps peuvent être utilisées successivement pour analyser de façon plus exhaustive les cellules provenant d'une même souris. L'appareil utilisé pour nos collectes de données est le FACS Calibur de Becton Dickinson® et le logiciel pour l'analyse des résultats est FlowJo®.

6.1 Analyse des leucémies primaires

Les souris infectées avec les cellules MLL-ENL LoxP eGFP ont les cellules de leur moelle osseuse et les cellules de leur rate analysées en préparant une série de tubes pour chacun de ces organes. Trois combinaisons d'anticorps couplés avec leur fluorochrome sont utilisées dans l'analyse des leucémies primaires :

- CD19 (PE) / CD33 (PC5) / CD45 (APC)
- CD19 (PE) / CD20 (PC5) / CD10 (APC)
- HLA-DR (PE) / CD38 (PC5) / CD34 (APC)

CD19 (PE), CD10 (APC), CD34 (APC) et HLA-DR (PE) proviennent de BD Bioscience® alors que CD33 (PC5), CD45 (APC), CD20 (PC5) et CD38 (PC5) proviennent de Beckman Coulter®. 1µL de chaque anticorps est rajouté dans les tubes correspondants et ceux-ci vont être laissés à incuber à 4°C dans un frigo pendant au moins 20 minutes en évitant le plus possible d'être exposés à la lumière avant leur analyse au FACS. Lorsqu'elle est excitée par une longueur d'onde de 395 nm, la protéine

eGFP, exprimée par les cellules transduites, émet une couleur verte (509 nm) et est analysée simultanément avec les différentes combinaisons d'anticorps.

6.2 Analyse des leucémies secondaires

Pour les leucémies secondaires issues des différentes fractions cellulaires des leucémies primaires ayant été transduites ou non par nos lentivirus Pmab, celles-ci sont toutes analysées par les mêmes anticorps en respectant le même protocole que pour les leucémies primaires. La seule différence est au niveau de l'expression de la BFP qui se rajoute aux combinaisons d'anticorps déjà établis et qui est quantifiée en bleu avec le laser violet (405nm) du FACS.

7. Infection des cellules leucémiques primaires par les lentivirus

Les leucémies primaires MLL-ENL générées dans les souris ont été cryogénisées, suivant leur récolte, à -80°C en aliquotes de 10×10^6 à 20×10^6 cellules. Pour procéder à la deuxième partie de l'expérience, nous sélectionnons une leucémie primaire exprimant fortement eGFP et donc, contenant notre gène de fusion MLL-ENL bordé par deux sites LoxP. Les cellules de cette leucémie sont ainsi décongelées de manière semblable aux CSH. Les cellules sont comptées pour évaluer la mortalité causée par la cryogénisation, et les cellules sont transférées dans une plaque 6 puits non traités pour la culture cellules dans du milieu GT à une concentration de 1×10^6 de cellules par mL. Le cocktail de facteurs de croissance cellulaire d'Invitrogen® comprenant du SCF (100 ng/ml), du FLT3-L (100 ng/ml), du G-CSF (10 ng/ml), de l'IL-6 (10 ng/ml) et de la Tpo (15 ng/ml) est ajouté en plus de la molécule UM729 ($1 \mu\text{g/mL}$) et les cellules sont laissées 24h dans un incubateur à 37°C en préparant en parallèle la plaque 12 puits traités avec la rétronectine pour l'infection tout comme pour l'infection des cellules primaires. Le lendemain, les cellules sont recomptées et séparées en deux puits de la plaque contenant la rétronectine tout en gardant une aliquote de cellules primaires leucémiques en culture, qui seront injectées comme contrôle positif des leucémies secondaires. On procède ensuite en infectant les cellules de la plaque traitée avec les lentivirus Pmab contrôle BFP et Pmab Cre-rec BFP (un par puits, avec au moins 1×10^8 de virions par lentivirus) tel qu'effectué précédemment. Les cellules sont remises dans l'incubateur avec du milieu GT et les cytokines pour 24h seulement et ne subissent donc qu'un seul cycle d'infection comparé aux CSH avec les

rétrovirus. La raison est que contrairement aux rétrovirus, les lentivirus ne nécessitent pas que la cellule entre en division pour pouvoir l'infecter. Le lendemain, les cellules des deux puits sont récoltées en grattant avec un embout le fond des puits, lavées plusieurs fois, comptées et centrifugées. Elles sont ensuite resuspendues dans du tampon de tri (composé de PBS avec 1% de BSA et 2.5mM d'EDTA à pH 7.0) à une concentration de 10×10^6 de cellules par mL dans des tubes à FACS pour être trié par un FACS trieur de cellules Influx™ de Becton Dickinson®.

8. Triage des cellules marquées en eGFP/BFP et injection des souris secondaires

Les cellules infectées par les lentivirus sont analysées et triées par un appareil FACS ayant la capacité de trier les cellules en sélectionnant uniquement celles exprimant eGFP et finalement en séparant et récoltant celles qui expriment BFP et celles qui ne l'expriment pas. Nous nous retrouvons ainsi avec 4 fractions cellulaires différentes :

- Les cellules MLL-ENL LoxP eGFP + Cre-rec BFP (eGFP + / BFP +)
- Les cellules MLL-ENL LoxP eGFP n'ayant pas intégré Cre-rec BFP (eGFP + / BFP -)
- Les cellules MLL-ENL LoxP eGFP + Control BFP (eGFP + / BFP +)
- Les cellules MLL-ENL LoxP eGFP n'ayant pas intégré Control BFP (eGFP + / BFP -)

Ces différentes fractions sont récoltées dans du milieu B-ALL (composé de MEM- α avec 20% de « foetal calf serum » ou FCS caractérisé de HyClone®, 5% de plasma humain, et 1% de pénicilline et de streptomycine). Après un décompte, une partie est conservée en culture pour tester leur croissance et viabilité, alors que l'autre partie des cellules est préparée pour injection dans des souris secondaires. Les cellules injectées (dans des souris ayant été irradiées à 200cGy comme précédemment effectué) sont remises en suspension dans du PBS à une concentration de 2500 à 5000 cellules par 25 μ L selon la quantité de cellules disponible. En plus des 4 fractions cellulaires triées, des cellules de leucémie primaire n'ayant ni été infectées ni triées vont être préparées de la même façon et constituent un contrôle positif supplémentaire pour s'assurer que la régénération de la leucémie est possible avec aussi peu de cellules leucémiques primaires ayant été décongelées. Les cellules sont ainsi injectées dans les souris secondaires par injection intra-fémorale tel que décrit précédemment.

Chapitre III – Résultats

1. Leucémies primaires MLL-ENL LoxP eGFP

La première partie de l'expérience a pour but de voir le développement de leucémies dans notre modèle de souris humanisées via la transduction du gène MLL-ENL dans des cellules de sang de cordon ombilical humaines. Cette expérience est répétée 2 fois pour un total de 35 souris qui ont reçu des greffes de cellules humaines transduites avec le gène de fusion. Les cellules isolées de ces deux cohortes de souris leucémiques primaires permettent ensuite de lancer la deuxième partie de l'expérience où les sites LoxP insérés de part et d'autre du gène MLL-ENL voient leur utilité. Les souris ont été sacrifiées entre 22 et 24 semaines suivant l'injection intra-fémorale.

1.1 Expression du marqueur eGFP dans les cellules transduites par les rétrovirus

Une fois les cycles d'infection des CSH par les rétrovirus MSCV MLL-ENL LoxP eGFP terminés, une fraction des cellules est analysée par FACS pour vérifier le pourcentage de cellules ayant été transduites par les rétrovirus, avant de procéder à l'injection des souris. Les résultats sont obtenus en vérifiant le pourcentage de cellules exprimant la protéine rapporteuse eGFP par fluorescence. Les résultats mis en comparaison avec ceux d'une précédente expérience réalisée avec un rétrovirus « MSCV contrôle eGFP » montrent un taux de transduction d'environ 5%, ce qui est inférieur au virus contrôle (20%).

Ces résultats sont néanmoins satisfaisants dans la mesure où nous injectons 250 000 cellules au total par souris, ce qui équivaut tout de même à 12 500 cellules ayant intégré l'oncogène MLL-ENL bordé de sites LoxP, chacune susceptible de se greffer dans le modèle *in vivo* et d'initier la leucémogénèse. Nous procédons ainsi à l'injection des souris.

1.2 Analyse et caractérisation des xénogreffes dans les souris primaires

Les souris placées en observation pendant une durée maximale de 24 semaines sont euthanasiées dès qu'elles présentent les symptômes de la maladie. Après 24 semaines, les souris restantes sont euthanasiées et analysées de la même façon que les souris présentant les signes de la maladie. Les

premiers symptômes ont été observés environ 15 semaines après l'injection. Des souris affichaient entre-autre un air moribond, de la pâleur au niveau de la paume des pattes et un amaigrissement évident comparé à leurs congénères. Les cellules de la moelle osseuse et de la rate sont prélevées et analysées au FACS afin de déterminer la présence de cellules humaines dans les souris et, advenant le cas, s'il s'agit d'un greffon humain « normal », c'est-à-dire des cellules humaines non-infectées par les rétrovirus MSCV MLL-ENL LoxP eGFP qui se sont greffées et génèrent un système hématopoïétique humain dans la souris, ou encore d'un greffon leucémique issu de cellules infectées. Sur les 35 souris injectées au total, 9 souris développent ainsi une leucémie aigüe, donnant ainsi un taux de pénétrance de leucémie de $\approx 26\%$ pour 250 000 cellules injectées, dont la caractérisation des cellules par immunofluorescence au FACS révèle qu'il s'agit pour chacune d'entre-elles d'une leucémie lymphoïde aigüe de type B (LLA-B) (Tableau 1).

Phénotype Leucémique	% de cellules humaines (CD45 +) dans la moelle osseuse	% de cellules exprimant eGFP dans la moelle osseuse
LLA-B	97	99 *
LLA-B	99	98
LLA-B	97	97
LLA-B	98	96
LLA-B	90	94 *
LLA-B	92	91
LLA-B	70	84
LLA-B	74	71
LLA-B	16	16

Tableau 1 : Résumé des résultats pour les souris primaires

Résumé du phénotype leucémique présent dans la moelle osseuse des 9 souris primaires ayant développé une leucémie, du pourcentage de cellules humaines exprimant CD45 présentes ainsi que le pourcentage de cellules exprimant la protéine eGFP, rapportant de la présence de l'oncogène de fusion MLL-ENL. 2 des 35 souris injectées présentaient aussi un début de greffon leucémique lorsqu'elles ont été sacrifiées à 24 semaines, mais ne sont pas comptées parmi les souris leucémiques puisque leur moelle contenait moins de 5 % de cellules CD45 +, eGFP + au total. Les 24 autres souris ne possédaient soit aucun greffon humain, soit un greffon humain constitué de cellules non-infectées et non-leucémiques. Les souris marquées d'un astérisque (*) sont celles dont les cellules ont été utilisées pour la seconde partie de l'expérience.

La nécropsie révèle une splénomégalie pour la plupart des souris malades en comparaison aux rates des souris n'ayant pas développé de leucémie après 24 semaines, s'expliquant par une invasion de leur rate par les cellules leucémiques. Les souris malades ont effectivement des rates pouvant peser jusqu'à 377mg et pesant en moyenne environ 213mg alors que les rates des souris n'ayant pas développé de leucémie balancent à environ 38 mg. (Figure 13)

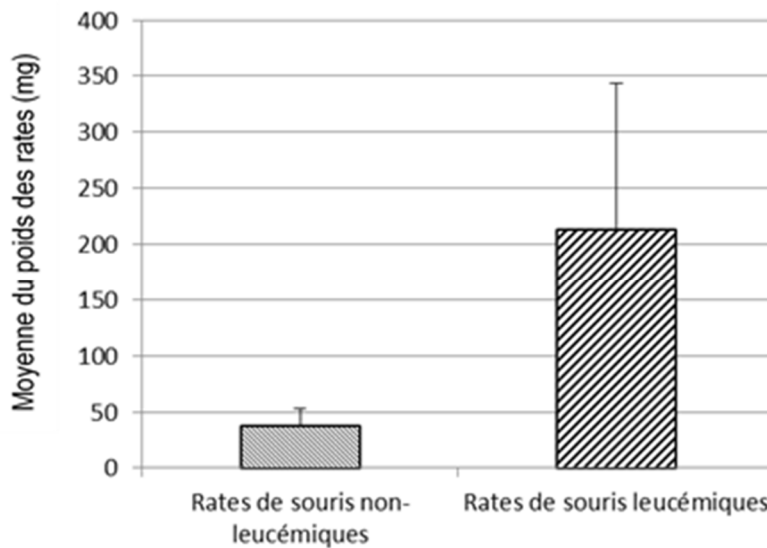


Figure 13 : Moyenne du poids des rates de souris non-leucémiques et leucémiques

La comparaison entre les moyennes des poids des rates montre une splénomégalie chez les souris leucémiques.

1.2.1 Analyse de cellules de la moelle osseuse par cytométrie en flux

La prise de greffe a effectivement pu être confirmée par analyse des cellules de la moelle osseuse par cytométrie en flux. Les premiers paramètres regardés sont la présence de cellules humaines dans la moelle osseuse qui est déterminée par l'anticorps ciblant CD45 humain, un antigène commun retrouvé sur pratiquement toutes les cellules hématopoïétiques, ainsi que l'expression d'eGFP, indiquant que les cellules positives ont été transduites par le virus. Nous distinguons ainsi avec seulement ces 2 paramètres, les souris n'ayant pas de greffon humain, celles ayant un greffon humain normal, mais aucune cellule transduite et les souris ayant potentiellement un greffon humain leucémique. Plus spécifiquement, les souris dont les cellules de la moelle osseuse ne comportent pas de CD45 et n'expriment pas eGFP (CD45 - eGFP -) sont classées comme souris sans greffon humain. Celles qui possèdent des cellules exprimant le marqueur de surface CD45, mais pas eGFP (CD45 + eGFP -) sont considérées comme des souris ayant un greffon humain issu de CSH qui n'ont pas intégré l'ADN du rétrovirus (non transduites) alors que finalement, celles dont les cellules sont doubles positives pour CD45 et eGFP (CD45 + eGFP +) ont un greffon humain dont les cellules sont issues d'une CSH ayant été transduite par notre rétrovirus MLL-ENL LoxP eGFP et donc, cette population doit être plus amplement analysée pour déterminer le type de leucémie qu'elle a engendrée (Figure 14).

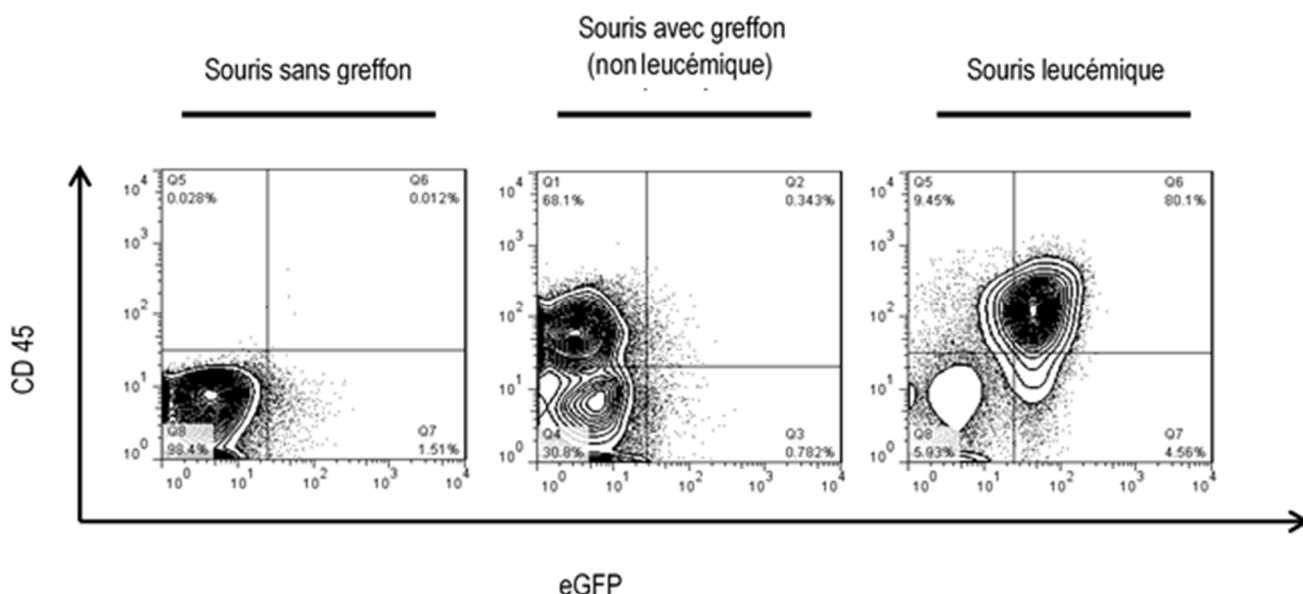


Figure 14 : Analyse par FACS avec CD45 et eGFP des cellules de 3 moelles osseuses représentatives des types de résultats obtenus

Analyse par FACS montrant la distinction initiale entre les 3 types de moelle osseuse retrouvés dans les souris primaires. Les souris sans greffon présentent une population CD45 - eGFP -, les souris avec greffon humain non-leucémique ont en plus une population CD45 + eGFP - alors que les souris leucémiques auront plutôt une population CD45 + eGFP +.

L'analyse des cellules de la moelle osseuse de nos souris primaires se poursuit ainsi avec deux autres marqueurs de surfaces, CD19 et CD33. Le premier est un marqueur de cellules lymphoïdes de type B alors que CD33 se retrouve à la surface des cellules de la lignée myéloïde. Si nous reprenons à nouveau les cellules de la moelle osseuse représentatives des 3 types de souris primaires que nous avons obtenus et que nous regardons la présence de ces deux marqueurs, la souris sans greffon humain (CD45 - eGFP -) est tout aussi négative pour les anticorps ciblant les deux marqueurs humains de CD19 et CD33 (CD19 - CD33 -). Les cellules du greffon humain non-leucémique (CD45 + eGFP -), pour leur part, expriment effectivement soit l'un ou l'autre des deux marqueurs de lignée. Nous retrouvons ainsi 2 populations de cellules humaines (en plus de la population de cellules hématopoïétiques de souris qui restent doublement négatives), soit une petite population de cellules différenciées myéloïdes (CD19 - CD33 +) et une population plus importante de cellules engagées dans la lignée lymphoïde (CD19 + CD33 -). Finalement, les souris ayant développé une leucémie voient les cellules CD 45 + eGFP + de leur moelle osseuse se regrouper en une seule population : des cellules lymphoïdes de type B (CD19 + CD33 -) (Figure 15).

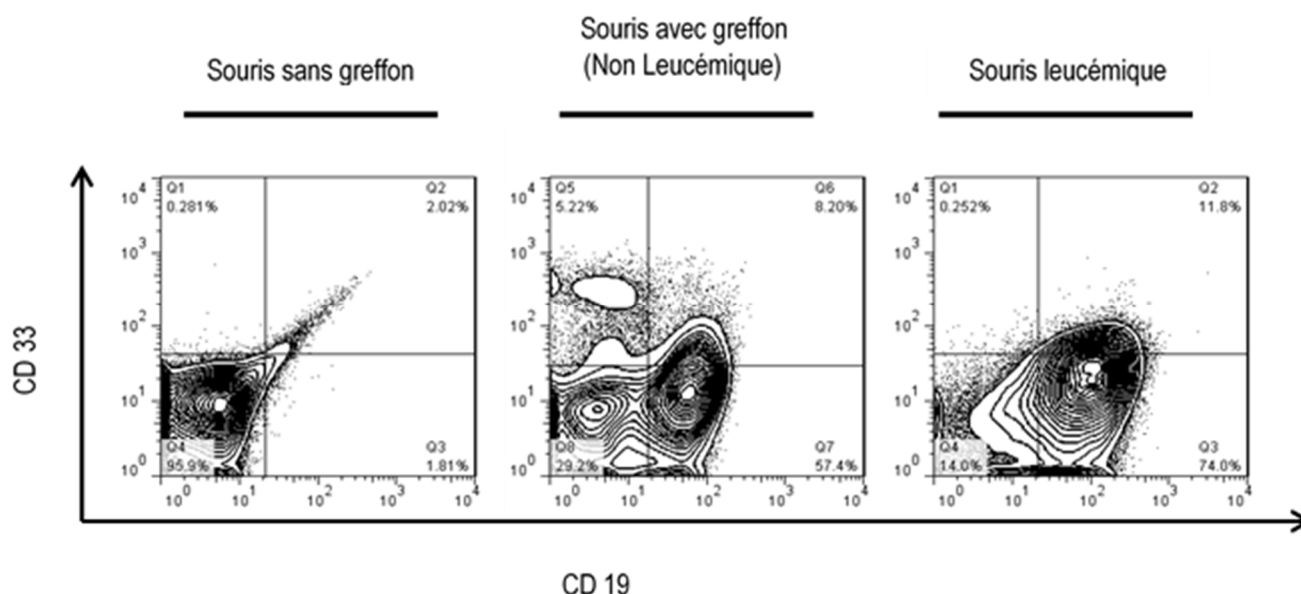


Figure 15 : Analyse au FACS avec CD33 et CD19 des cellules de 3 moelles osseuses représentatives des types de greffons obtenus

Analyse au FACS de l'expression de CD19 et de CD33 des cellules issues des différents greffons obtenus. Les cellules de la moelle osseuse d'une souris sans greffe sont négatives pour tous les marquages (CD19 - CD33 -) alors que les cellules avec un greffon humain ont à la fois une population CD 19 + et une population CD33 + indiquant la capacité des CSH greffées de se différencier en cellules appartenant à l'une ou l'autre des lignées, contrairement aux cellules des souris leucémiques bloquées dans la lignée lymphoïde (CD19 + CD33 -).

Un greffon qui est composé uniquement de cellules lymphoïdes (CD19 +) ne permet toutefois pas, à cette seule observation, de confirmer qu'il s'agit bien d'une leucémie lymphoïde, il faut regarder s'il y a un blocage de différenciation. Ainsi, d'autres combinaisons d'anticorps couplés à un fluorochrome et ciblant CD 19, CD 20, CD 10, CD34 et CD38 permettent d'évaluer le profil cellulaire des cellules B présentes dans les greffons leucémiques et ainsi déterminer l'étape où a eu lieu le blocage de la différenciation cellulaire dans ces leucémies. En analysant ainsi les cellules B des différentes souris primaires obtenues (CD19 +), nous regardons l'expression des marqueurs de surface CD20 et CD10 pour voir si ces cellules B ont atteint un niveau mature ou tout au moins un stade pre-B (CD19 + CD10 + CD20 + CD34 -), ou encore si elles sont bloquées à un stade immature pro-B (CD19 + CD10 + CD20 - CD34 +). Les résultats obtenus par cette analyse montrent effectivement que les cellules lymphoblastiques de nos souris primaires n'expriment pas le CD20, expriment partiellement le CD10 et sont en partie positives pour CD34 dans la plupart des cas, ce qui indique une immaturité d'une partie des cellules de la moelle osseuse, arrêtées au stade pro-B. Ces cellules correspondent aux cellules préalablement décrites et caractérisées davantage au niveau périphérique (sang et rate)

[187] où, contrairement aux cellules B normales, elles demeurent CD20, IgD et IgM négatives, confirmant le bloc de différenciation au stade pro-B (Figure 16).

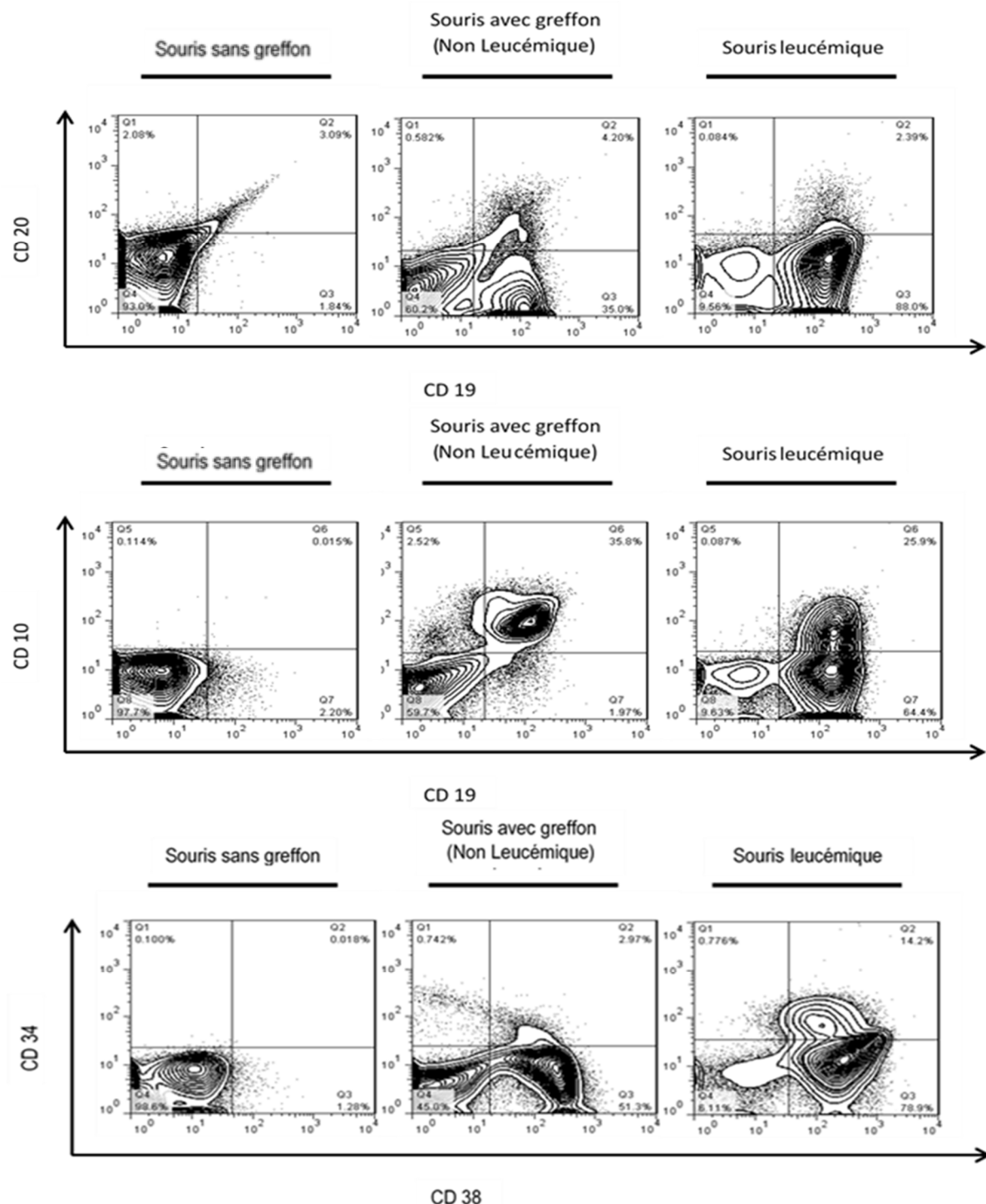


Figure 16 : Caractérisation au FACS du stade de différenciation des cellules de 3 moelles osseuses représentatives des types de résultats obtenus

Analyse comparative au FACS la différenciation des cellules de la moelle osseuse de souris sans greffon, avec greffon humain (non leucémique) et avec greffon leucémique pour différentes combinaisons des marqueurs de surface CD19, CD 33, CD10, CD20, CD34 et CD38.

1.2.2 Analyse de cellules de la rate par cytométrie en flux

Les cellules de la rate des souris primaires sont aussi analysées par cytométrie en flux avec les mêmes combinaisons de marqueurs ainsi que la protéine rapporteuse de la transduction par les rétrovirus MSCV MLL-ENL LoxP, eGFP. Les premiers résultats montrent effectivement une infiltration de la rate des souris par leurs cellules lymphoblastiques (CD45 + eGFP +), causant la splénomégalie observée chez ces souris (Figure 13). En effet, la comparaison des cellules issues de la rate avec celles de la moelle osseuse d'une même souris leucémique pour ces marqueurs montre la similitude entre les principales populations cellulaires retrouvées dans ces deux organes (Figure 17).

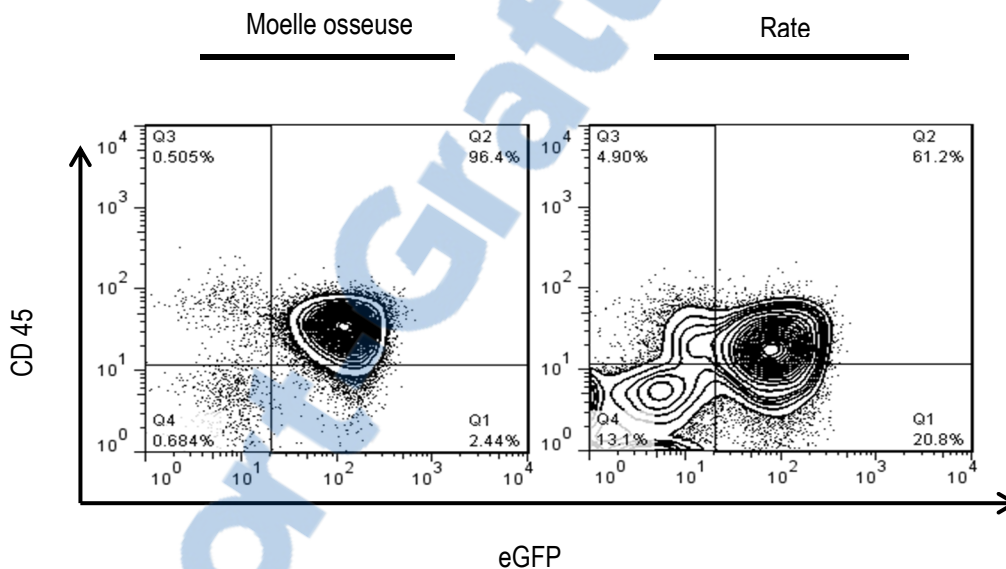


Figure 17 : Analyse au FACS avec CD45 et eGFP des cellules issues de la moelle osseuse d'une souris leucémique avec celles issues de sa rate

Analyse au FACS des cellules issues de la moelle osseuse et celles issues de la rate d'une même souris leucémique avec le marqueur de surface CD45 et la protéine rapporteuse eGFP, montrant l'invasion de la rate par les cellules leucémiques.

Après cette première constatation, l'analyse des cellules de la rate a ainsi été poursuivie pour caractériser de manière encore plus précise leur phénotype leucémique et confirmer, en les regardant en parallèle avec les cellules de la moelle osseuse, qu'il s'agit bien des mêmes cellules lymphoblastiques bloquées à un stade pro-B (CD45 + eGFP + CD19 + CD33 - CD20 - avec expression de CD10 variable) qui se retrouvent aussi dans la rate de cette souris (Figure 18).

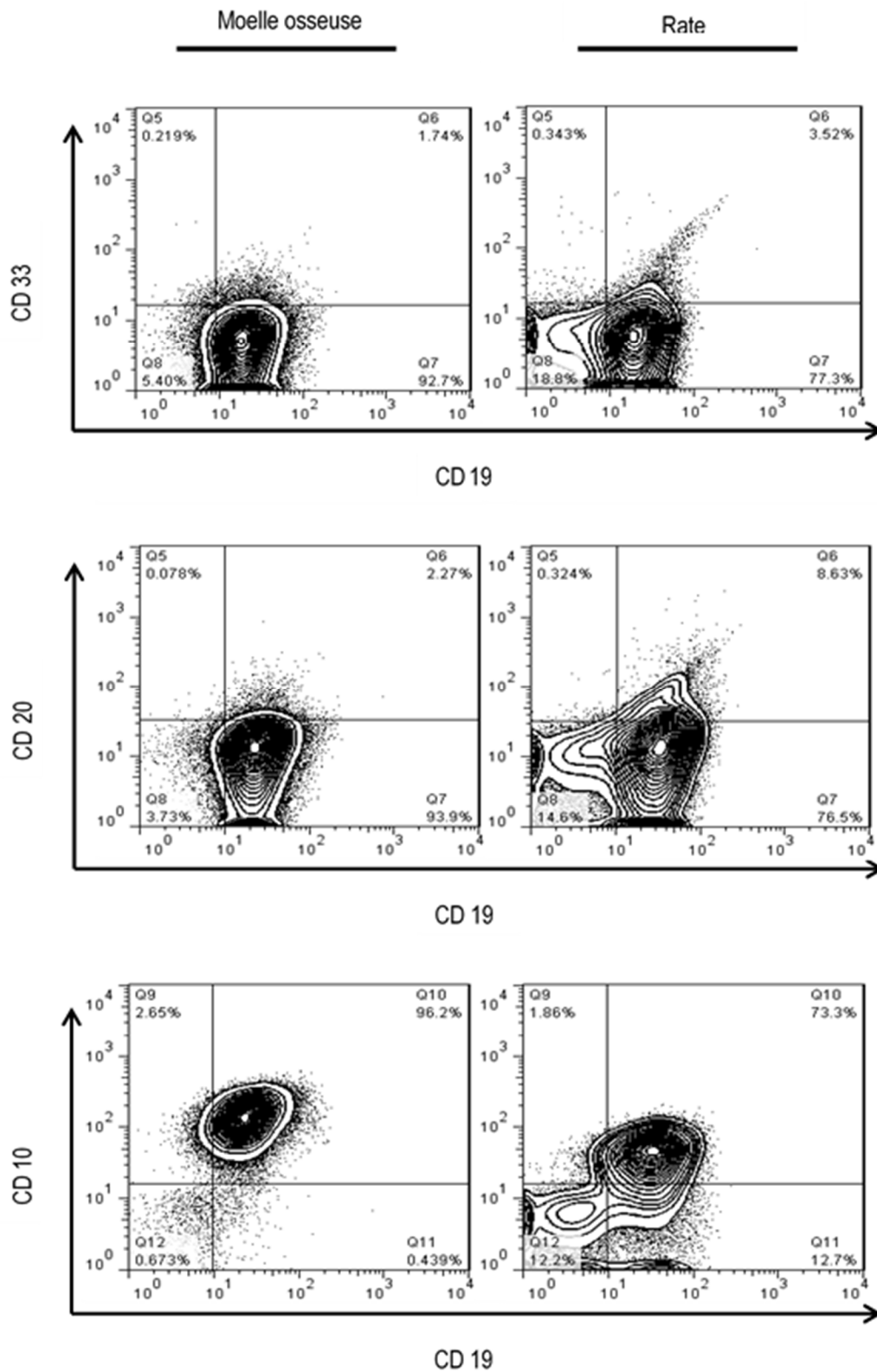


Figure 18 : Caractérisation au FACS du phénotype leucémique des cellules de la rate d'une souris primaire en le comparant avec le phénotype de celles retrouvées dans sa moelle osseuse
 Analyse au FACS du bloc de différenciation des cellules de la moelle osseuse et de la rate d'une souris leucémique. On voit ainsi qu'il s'agit d'une LLA-B Pro-B caractérisé par la population prédominante CD19 + CD33 - CD20 - CD10 +/- CD38+. (CD38 et CD34 non montré)

2. Leucémies secondaires MLL-ENL LoxP eGFP avec cre recombinase

La deuxième partie de l'expérience veut répondre à l'hypothèse selon laquelle les cellules leucémiques issues du gène de fusion MLL-ENL ont besoin que l'expression de ce gène soit maintenue pour garder leur phénotype leucémique et continuer de proliférer. Pour ce faire, une seconde transduction des cellules leucémiques primaires isolées par un lentivirus contrôle (Pmab contrôle BFP) ou un lentivirus contenant la cre recombinase (Pmab cre-rec BFP) a été effectuée avant de les trier et les réinjecter dans des souris secondaires. Les cellules exprimant désormais la cre-recombinase, une enzyme capable de cliver une séquence d'ADN se trouvant entre deux sites LoxP et de la retirer complètement avant de refermer l'ADN, vont ainsi démontrer si la perte de MLL-ENL, bordé par deux sites LoxP, rend impossible la régénération de la leucémie dans ces souris secondaires. 46 souris sont injectées au cours de cette expérience en comptant les contrôles avec au total 5 fractions cellulaires différentes :

- Les cellules primaires MLL-ENL LoxP eGFP non-triées et non-infectées (MLL-ENL N-Inf.)
- Les cellules primaires transduites par Pmab contrôle BFP et triées positivement pour la BFP (MLL-ENL LoxP + Pmab contrôle BFP +)
- Les cellules primaires transduites par Pmab contrôle BFP et triées négativement pour la BFP (MLL-ENL LoxP + Pmab contrôle BFP -)
- Les cellules primaires transduites par Pmab cre-recombinase BFP et triées positivement pour la BFP (MLL-ENL LoxP + Pmab cre-rec BFP +)
- Les cellules primaires transduites par Pmab cre-recombinase BFP et triées négativement pour la BFP (MLL-ENL LoxP + Pmab cre-rec BFP -)

2.1 Expression du marqueur BFP dans les cellules transduites par les lentivirus et tri cellulaire

Une fois l'infection des cellules leucémiques primaires MLL-ENL LoxP par les lentivirus Pmab contrôle BFP et Pmab cre-rec BFP terminée, les cellules sont triées au FACS trieur pour procéder par la suite à l'injection des souris. Les différentes fractions souhaitées sont obtenus d'abord en sélectionnant les cellules exprimant la protéine rapporteuse eGFP par fluorescence afin de véritablement être certain que les cellules infectées par les lentivirus sont bien des cellules leucémiques humaines et non pas des cellules hématopoïétiques de souris se trouvant parmi celles-

ci et n'exprimant donc pas eGFP. Les cellules sont par la suite triées selon leur expression de la BFP. Lors des 4 tris réalisés pour cette expérience, entre 20 000 et 125 000 cellules BFP + pour l'un ou l'autre des lentivirus ont pu être triées avant d'être injectées. L'efficacité du tri est d'environ 96% pour les deux lentivirus. Lors de la 4^e reprise de l'expérience qui a finalement fonctionné et apporté les premiers résultats, nous pouvons observer un taux de transduction de 2.7% pour les lentivirus contrôles et de 1.4% pour les lentivirus contenant la cre recombinase.

2.1.1 Survie et prolifération *in vitro* suivant le tri cellulaire

Les premiers tris effectués se sont cependant avérés insatisfaisants quant à la survie des cellules triées. La plupart des cellules BFP + qui étaient récoltées ne survivaient pas lorsque nous les avons mise en culture dans du milieu B-ALL, contrairement aux cellules non-triées. Après 3 tentatives infructueuses, le problème semble résolu en changeant pour un FACS trieur de cellules Influx™ de Becton Dickinson®. Lors de la mise en culture subséquente nous avons pu observer que les fractions cellulaires triées BFP + et BFP - pour les deux virus semblaient croître normalement sauf pour la fraction MLL-ENL LoxP + Pmab cre-rec BFP + qui n'a pu être testée faute de récolter suffisamment de cellules pour la culture cellulaire sans compromettre le nombre de cellules qui sont injectées dans les souris secondaires pour poursuivre l'expérience (Figure 19).

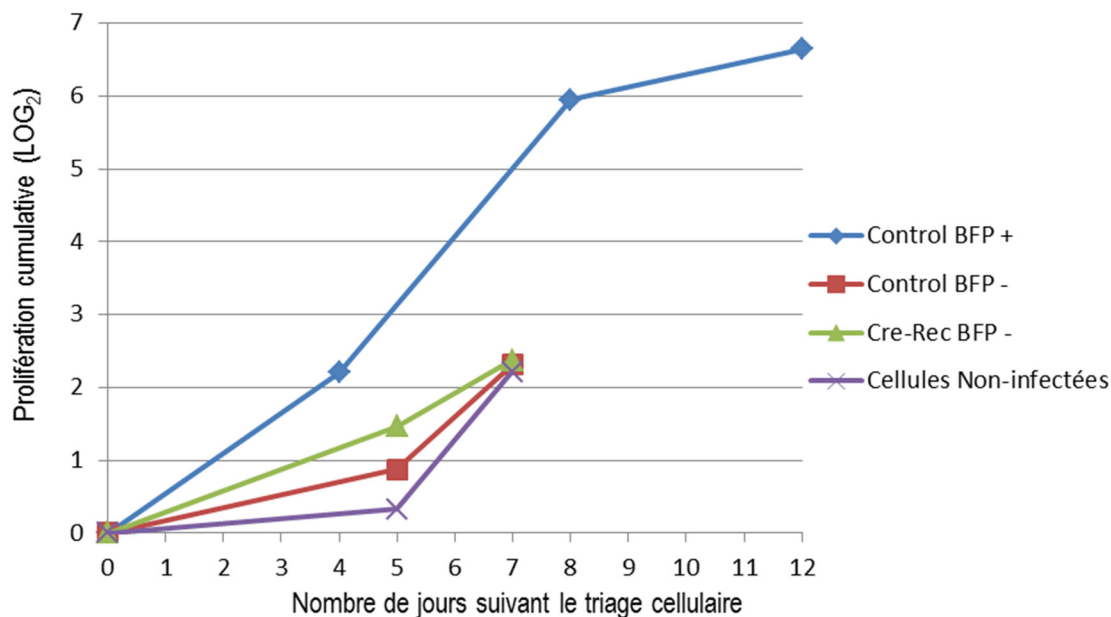


Figure 19 : Prolifération cellulaire cumulative *in vitro* des fractions cellulaires triées

Courbe illustrant la prolifération cellulaire cumulative (Log_2) des différentes fractions cellulaires triées dans du milieu de culture B-ALL avec cytokines et UM729 jusqu'à 12 jours après le tri cellulaire pour s'assurer de la survie de celles-ci après le tri cellulaire et par le fait même, de la possibilité théorique pour chaque fraction de survivre dans la souris secondaire suffisamment longtemps pour s'y greffer et régénérer la leucémie. La fraction MLL-ENL LoxP + Pmab cre-rec BFP + n'a pas pu être isolée en suffisamment grande quantité pour vérifier sa survie *in vitro*, mais a tout de même été injectée dans les modèles *in vivo* pour la suite de l'expérience en extrapolant à cette fraction les résultats obtenus par la prolifération de la fraction MLL-ENL LoxP + Pmab contrôle BFP + (en bleu).

2.2 Analyse et caractérisation des xénogreffes dans les souris secondaires

Au cours des 22 à 24 semaines suivant l'injection des souris secondaires (2500 à 5000 cellules par souris), celles-ci sont placées en observation et euthanasiées dès qu'elles présentent les symptômes de la maladie ou au bout des 24 semaines de la même façon que l'ont été les souris primaires. Sur les 46 souris recevant une xénogreffe de cellules leucémiques secondaires, 26 d'entre-elles sont des contrôles positifs pour s'assurer du bon déroulement de chaque étape de l'expérience. 2 souris secondaires reçoivent des cellules MLL-ENL LoxP eGFP non-infectées et non-triées afin de démontrer la possibilité de régénérer la leucémie avec 2500 de ces cellules dans des souris secondaires. 2 souris reçoivent des cellules de la fraction MLL-ENL LoxP + Pmab contrôle BFP - et 2 autres souris sont injectées avec la fraction équivalente pour l'autre lentivirus (MLL-ENL LoxP + Pmab cre-rec BFP -) ce qui permet de vérifier que le tri cellulaire n'affecte pas les cellules et qu'elles ont toujours le même potentiel leucémogénique. Finalement 20 souris injectées avec les cellules

infectées par les lentivirus contrôle (fraction MLL-ENL LoxP + Pmab contrôle BFP +) démontrent que l'infection par un lentivirus n'empêche pas, encore une fois, la régénération de la leucémie secondaire. Les 20 souris restantes permettent de conclure quant à notre l'hypothèse sur la nécessité de présence de la protéine de fusion MLL-ENL pour maintenir le potentiel leucémogénique. Dans un premier temps, les 3 premiers contrôles positifs s'avèrent très bien fonctionner en donnant 100 % de taux de pénétrance de leucémies secondaires non-infectées, peu importe que les cellules aient été triées ou non. On retrouve aussi à l'analyse de la moelle osseuse au FACS un fort taux de cellules marquées pour CD45 humain et exprimant eGFP (Figure 20) ainsi que les autres marqueurs indiquant une LLA-B, dont la différenciation cellulaire s'est arrêté au stade « pro-B » comme pour les leucémies primaires (résultats non-montrés).

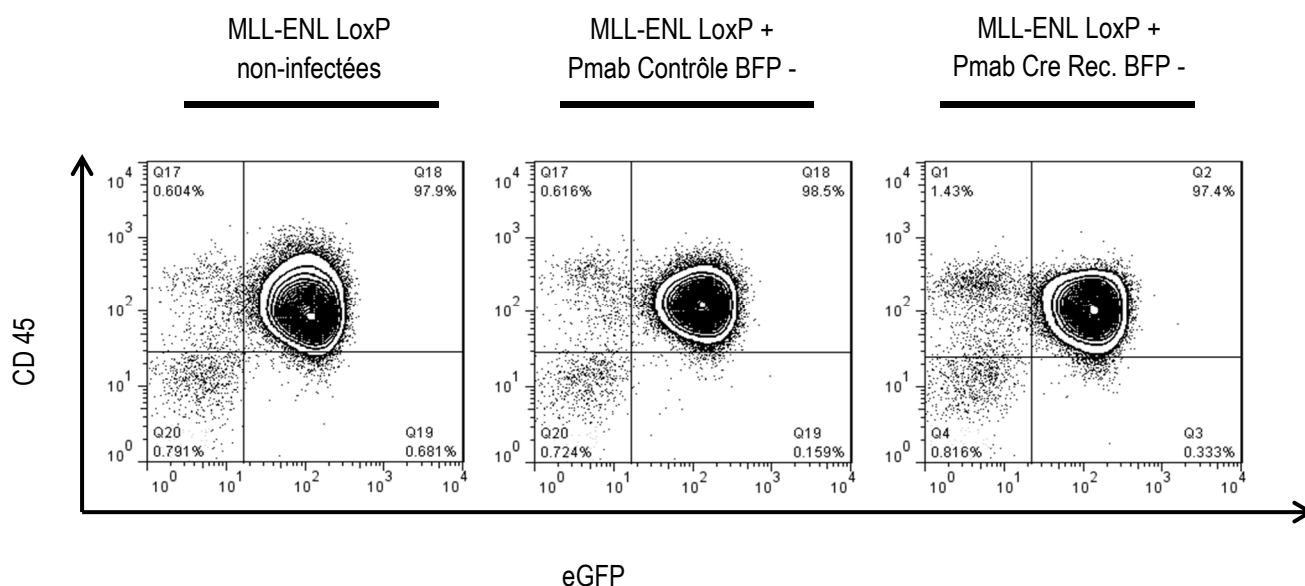


Figure 20 : Analyse au FACS avec CD45 et eGFP des leucémies secondaires engendrées par les 3 premiers types de contrôles positifs

L'analyse concluante d'une population principale fortement majoritaire de cellules CD45 + eGFP + montre que les cellules de la leucémie primaire peuvent engendrer une leucémie secondaire et que le tri cellulaire ne semble pas affecter cette capacité.

Les autres souris ayant reçu la fraction MLL-ENL LoxP + Pmab contrôle BFP + ou la fraction MLL-ENL LoxP + Pmab cre rec BFP + ont aussi été capable de générer des leucémies LLA-B, mais seulement 7 souris sur 20 pour les deux fractions cellulaires ont des cellules leucémiques dans leur moelle osseuse, donnant un taux de pénétrance de leucémie nettement inférieur (35%). Aussi, les

résultats montrent des leucémies qui se sont déclarées beaucoup plus tardivement et donc, globalement moins de cellules leucémiques que les 3 premiers contrôles positifs (Tableau 2).

Fraction cellulaire injectées	<u>Nombre de leucémies</u> Nombre de souris injectées	Phénotype Leucémique	% de cellules leucémiques (CD45/CD19+)	% de cellules exprimant eGFP	% de cellules coexprimant GFP+BFP
C. Leucémiques non- infectées	2/2	LLA-B	99	99	-
		LLA-B	97	98	-
MLL-ENL + Ctrl BFP-	2/2	LLA-B	99	99	-
		LLA-B	97	98	-
MLL-ENL + Cre Rec. BFP-	2/2	LLA-B	98	98	-
		LLA-B	96	98	-
MLL-ENL + Ctrl BFP+	7/20	LLA-B	99	99	87
		LLA-B	98	96	84
		LLA-B	98	99	62
		LLA-B	89	83	50
		LLA-B	99	98	18
		LLA-B	62	2	0
		LLA-B	6	0	4*
MLL-ENL + Cre Rec. BFP+	7/20	LLA-B	87	78	33
		LLA-B	84	14	8
		LLA-B	95	98	< 1
		LLA-B	90	17	<1
		LLA-B	2	0	2*
		LLA-B	2	0	1*
		LLA-B	13	0	0

Tableau 2 : Résumé des résultats pour les souris secondaires

Résumé du phénotype leucémique présent dans la moelle osseuse des 46 souris secondaires ayant développé une leucémie selon la fraction cellulaire injectée dans celles-ci. Toutes les leucémies secondaires sont des LLA-B au même titre que les leucémies primaires d'où elles proviennent. Le pourcentage de cellules leucémiques (CD45 + CD19 + est indiqué de même que leur % d'eGFP et de coexpression de la BFP pour les deux fractions triées initialement pour BFP +. Certaines cellules leucémiques semblent cependant avoir perdu l'expression d'eGFP ou de BFP et même les deux alors que la fraction cellulaire analysée suggère leur présence. Les astérisques (*) indiquent le pourcentage de cellules exprimant seulement la BFP.

Plusieurs leucémies semblent aussi avoir perdu l'expression de l'une ou l'autre des protéines rapporteuses, voir même les deux dans le cas d'une leucémie analysée dans une souris MLL-ENL LoxP + Pnab cre-rec BFP +. Une autre observation intéressante est la présence occasionnelle de plusieurs populations de cellules leucémiques exprimant différent taux de BFP, sans pour autant que cela ne semble avoir un impact sur le phénotype leucémique résultant (Figure 21), ceux-ci étant tous des leucémies aigües lymphoïdes de type B bloquées à un stade pro-B.

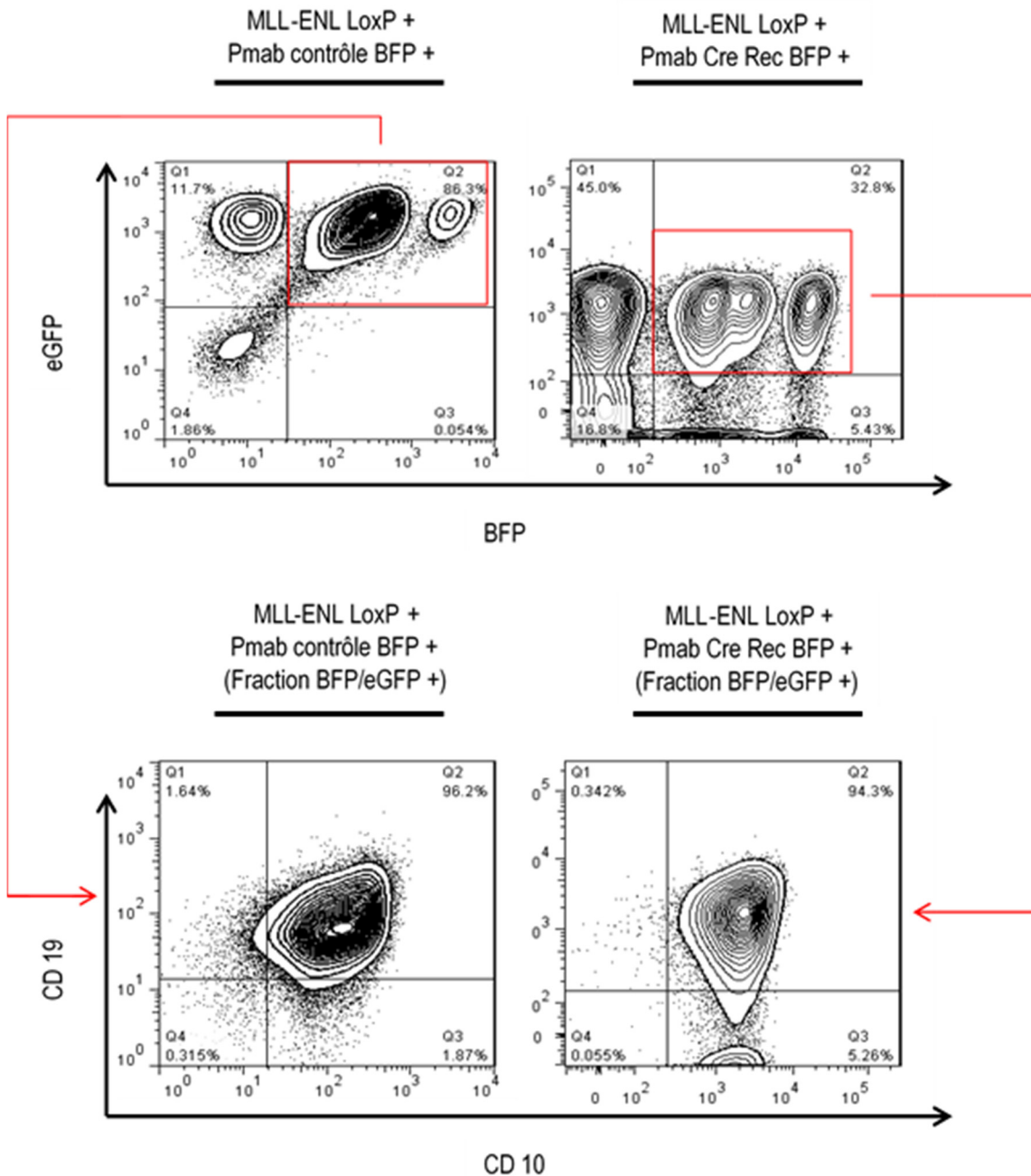


Figure 21 : Analyse au FACS de cellules de moelle osseuse de deux souris représentatives de leur groupe respectif issues de la transfection avec l'un ou l'autre des lentivirus

L'analyse au FACS de cellules de moelle osseuse de deux souris représentatives de leur groupe respectif montre bien le développement d'une LLA-B dans les deux souris secondaires, mais aussi de plusieurs populations exprimant inégalement la BFP, sans pour autant que cela n'influence le phénotype résultant.

Bien qu'ils démontrent la possibilité de régénérer la leucémie dans des souris secondaires, les résultats ne peuvent néanmoins pas servir à conclure sur l'hypothèse de l'expérience puisqu'une

vérification quant à l'orientation correcte de l'enzyme cre recombinase dans les cellules montra après un séquençage de l'ADN viral que le gène de l'enzyme n'a pas été correctement inséré et que la cre recombinase ne pouvait, au final, pas être exprimée dans les cellules transduites par le lentivirus Pmab cre-rec BFP.

Chapitre IV – Discussion et Conclusion

1. Discussion

Les leucémies aiguës posent toujours un défi aux cliniciens tant par la grande variabilité des facteurs oncogéniques et leur pronostic rarement favorable. Causant près de 10% de toutes les leucémies aiguës, le gène MLL à lui seul demeure un incontournable dans la compréhension des mécanismes leucémogéniques. D'autant plus que parmi ses nombreux partenaires de fusion, certains, comme le gène ENL, peuvent générer 4 différentes leucémies aiguës touchant aussi plusieurs tranches d'âges [123]. Les expériences réalisées pour ce mémoire veulent approfondir les connaissances sur cette fusion particulière, en testant les limites de notre modèle *in vivo* quant à la reproductibilité des leucémies humaines issues du gène de fusion MLL-ENL dans des cellules souches et des cellules progénitrices hématopoïétiques et aussi mieux comprendre le rôle de cette protéine chimérique une fois le processus leucémogénique bien établi.

Dans un premier temps, l'infection des cellules souches par nos rétrovirus contenant la fusion MLL-ENL a permis de confirmer sa capacité à générer des leucémies aiguës dans notre modèle animal humanisé, sans pour autant parvenir à atteindre la diversité phénotypique retrouvée chez les patients, c'est-à-dire des LLA-B, des LLA-T, des LMA et des LAPM. La deuxième partie de l'expérience, quant à elle, a voulu répondre au rôle de ce gène dans le maintien des leucémies en le clivant hors de l'ADN des cellules souches leucémiques via l'ajout de la cre recombinase dans celles-ci. Une erreur dans la fabrication de l'ADN viral ne permettra pas de vérifier nos hypothèses, mais nous pouvons tout de même en tirer plusieurs observations intéressantes qui peuvent servir dans nos démarches futures.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1.1 Les leucémies primaires MLL-ENL-LoxP eGFP

Tout d'abord, les constructions virales intégrant notre gène de fusion MLL-ENL bordé par des sites LoxP ont eu un taux de transduction 4 fois inférieur au taux précédemment établi avec notre rétrovirus contrôle. Ceci s'explique par la présence de MLL-ENL de plus de 6,1 Kb au vecteur MSCV contrôle qui fait, à elle seule, doubler la taille de celui-ci et en conséquence, rend l'intégration de l'ADN virale dans la cellule hôte plus difficile [196]. Ce taux de transduction est néanmoins

satisfaisant puisque nous avons injecté 250 000 cellules par souris, ce qui avec un pourcentage de transfert de gène de 5%, permet tout de même de s'assurer d'injecter environ 12500 cellules transduites par souris, un nombre qui s'est avéré suffisant pour permettre la prise de greffe et la génération de leucémie. En effet, nous avons obtenu un taux de pénétrance de leucémie d'environ 26% après 24 semaines pour les 35 souris injectées au cours de la première phase de cette expérience, observable avec notre protéine rapporteuse eGFP. Le fait notable est cependant l'homogénéité des leucémies générées, en comparaison à ce qu'on aurait pu s'attendre chez l'humain avec le gène de fusion MLL-ENL. En effet, alors que MLL-ENL est retrouvé dans tous les types de leucémies aiguës (les LLA-B, les LLA-T, les LMA et les LAPM) [177, 178], cette expérience a seulement généré des leucémies lymphoïdes aiguës de type B. C'est un contraste avec le modèle murin MLL-ENL où seulement des LMA murines sont générées et aucune LLA-B n'a été induite [142]. Cependant une autre expérience plus récente montrait la capacité de CSH humaines transduites par MLL-ENL *in vitro* à se différencier en LMA et en LLA, mais une fois injectées dans un autre modèle *in vivo* (souris NOD/SCID), les CSH transduites ne produisaient cette fois aussi que des LLA-B [187]. En rétrospective, une des plus probables explications à ce phénotype unique de leucémie est sans doute liée aux limites du modèle, plus précisément le microenvironnement médullaire dans lequel les cellules transduites se sont greffées. Les souris irradiées de manière non-létale doivent reconstruire leur système hématopoïétique. Dans ces conditions, les CSH sont plus propices à se différencier en lymphocytes B [197-199], ce qui a d'autant plus pu être observé dans les greffes « normales » non-leucémiques, qui affichent toutes un plus grand nombre de cellules lymphoïdes B exprimant CD19 que de cellules myéloïdes. Ainsi, les leucémies aiguës de type T et les LMA pourraient nécessiter soit plus de temps à se développer ou avoir une fréquence beaucoup plus basse, donnant la priorité à une CSH transduite amorçant le processus leucémogénique d'une LLA-B à rapidement prendre le dessus et causer le phénotype observable une fois la souris malade euthanasiée. Il est aussi important de noter que les cellules isolées pour la transduction de MLL-ENL proviennent de sang de cordon ombilical et que leurs propriétés intrinsèques favorisent potentiellement déjà le développement d'une LLA, puisqu'elles constituent 80% des leucémies infantiles [200-202]. Il n'est donc pas si étonnant que ce soit le principal phénotype observé. On remarque aussi l'invasion des cellules leucémiques au niveau de la rate, causant une splénomégalie, de même que le blocage des LLA-B au stade pro-B, représentatif de ce que nous pouvons observer en clinique. Ainsi, hormis le fait que nous n'avons obtenu qu'un seul phénotype leucémique pour les

11 souris malades, nous avons réussi à engendrer le processus de leucémogénèse par xénogreffe dans notre modèle *in vivo* à partir de cellules CB lin- transduites par le gène de fusion MLL-ENL et ce, de manière semblable aux attentes cliniques.

1.2 Les leucémies secondaires MLL-ENL LoxP avec cre recombinase

Une fois que les xénogreffes de cellules CB lin- transduites avec MLL-ENL ont généré une leucémie *in vivo*, nous avons procédé avec la seconde partie de l'expérience en tenant de retirer le gène MLL-ENL de ces cellules leucémiques afin de mieux comprendre son rôle dans le maintien de la leucémie. C'est dans cette optique que les leucémies ont été transduites initialement avec MLL-ENL bordé par des sites LoxP, dont l'interaction avec l'enzyme cre recombinase permet d'exciser hors du génome la séquence d'ADN se trouvant entre ceux-ci. Nous avons déjà essayé, lors d'expériences précédentes, plusieurs techniques pour retirer le gène de fusion ou empêcher son action au noyau, qui se sont avérées infructueuses. Le laboratoire avait notamment essayé de faire un modèle inductible avec MLL-ENL couplé au récepteur de l'œstrogène et qui l'aurait rendu inductible par l'ajout de tamoxifène, mais aucune leucémie n'avait pu être générée avec ce modèle. Nous nous sommes ainsi tournés vers un modèle d'excision de MLL-ENL dans les cellules humaines avec les sites LoxP et une transduction des leucémies secondaires avec la cre recombinase. Une première expérience a été réalisée avec un adénovirus, mais le taux d'infection des cellules leucémiques était nul, tant avec un adénovirus contrôle qu'un adénovirus avec la cre recombinase. Les lentivirus Pmab contrôle BFP et Pmab cre recombinase BFP ont donc été créés, pour tenter à nouveau le modèle. Malheureusement une erreur dans la fabrication de Pmab cre recombinase BFP qui n'a pu être vu avec le séquençage initial de l'ADN lentiviral ne permet pas de conclure sur l'hypothèse générale, mais offre tout de même certaines observations quant au modèle en soi.

Dans un premier temps, le taux de transfert de gène dans les leucémies secondaires par les lentivirus est inférieur à celui de la transduction des CSH et cellules progénitrices par le rétrovirus, mais les expériences réalisées par le passé [187], ont permis de savoir qu'entre 2500 et 5000 cellules triées et injectées seraient suffisantes pour avoir une bonne pénétrance de leucémies secondaires et tester notre hypothèse. Déjà en injectant 5000 cellules par souris, en tenant compte de l'efficacité de 96% du trieur de cellules, on peut supposer que 200 cellules parmi celles-ci (4% de 5000 cellules) n'appartiennent peut-être pas à la fraction triée voulue et si une de ces cellules arrive

à se greffer avant les autres et proliférer au point de générer la population cellulaire hématopoïétique dominante, les résultats seraient alors potentiellement faussés.

Les premiers essais de cette expérience ont d'abord été freinés par la fragilité des cellules triées, qui ne survivaient vraisemblablement pas aux tris cellulaires, ne proliféraient pas en culture *in vitro* et les souris secondaires restaient toutes négatives après 24 semaines. En changeant le trieur cellulaire et d'opérateur, nous avons alors pu observer pour la première fois la prolifération des différentes fractions triées pendant quelques jours. La seule à ne pas avoir pu être observée *in vitro* était la fraction MLL-ENL LoxP + Pmab cre-rec BFP + qui n'a jamais pu être triée en quantité suffisante pour procéder aux injections et garder assez de cellules en culture pour ces observations. Nous pouvons tout de même extrapoler les résultats de la fraction MLL-ENL LoxP + Pmab contrôle BFP + qui a plutôt été infectée avec le lentivirus contrôle, mais, présente tout de même une forte croissance cellulaire pendant plus de 12 jours et témoignant donc de la survie des cellules après l'infection et le tri de celles-ci.

Les résultats obtenus, bien qu'invalidés au niveau de la fraction MLL-ENL LoxP + Pmab cre-rec BFP + à cause d'une erreur dans l'ADN lentiviral qui ne permet pas l'expression fonctionnelle de la cre recombinase, montrent tout de même que les cellules leucémiques primaires réinjectées dans des souris secondaires vont être parfaitement capable de régénérer la leucémie. De plus, les contrôles des différentes étapes de l'expérience n'exprimant pas la BFP ont tous obtenu un taux de pénétrance de leucémie secondaire de 100%. D'un autre côté, pour les deux fractions injectées et triées pour l'un ou l'autre des lentivirus, même si le taux de pénétrance de leucémie ainsi que le pourcentage de cellules leucémiques (CD45+ CD19+) est inférieur aux contrôles BFP -, on pourra remarquer que plusieurs cellules différentes se sont greffées dans une même souris, générant des populations hétérogènes. On observe que contrairement à nos attentes, ces populations leucémiques perdent l'expression de plusieurs marqueurs de surface ou encore de la protéine rapporteuse eGFP, pour n'exprimer que BFP. Dans d'autres cas, on retrouve des cellules leucémiques eGFP + BFP - dans des souris dont les cellules ont pourtant été triées avec leur expression de la BFP avant d'être injectées. Elles pourraient ainsi avoir perdues l'expression de la BFP une fois greffées dans la souris au même titre que celles ayant perdues l'expression de leur eGFP, mais il faut tenir compte que le trieur de cellulaire (efficace à 96%) a trié de manière aberrante 4% des cellules récoltées, qui n'ont

au final jamais été transduites. Il y a donc une possibilité pour qu'une cellule leucémique non infectée (BFP -) dans la fraction théoriquement BFP + ait réussi à se greffer et ait pu proliférer dans notre modèle *in vivo*, donnant le phénotype de la population observée. Finalement une autre observation plus frappante est le différent taux d'expression de la BFP dans des populations toutes eGFP + CD45+ CD19+ CD10+ (voir Figure 23). Ces différents taux d'expression de la BFP pourraient indiquer que lors de la transduction avec les lentivirus, certaines cellules ont été infectées plus d'une fois et auraient intégré ainsi plusieurs copies du gène de la BFP dans leur génome, l'exprimant ainsi 2 ou même 3 fois plus qu'une cellule infectée une seule fois selon ce que nous pouvons voir avec les résultats obtenus. Ces transductions multiples ne semblent pas affecter le phénotype leucémique et, faute de ne pas avoir de cre recombinase, il n'est pas possible de savoir si cela affecte les résultats si l'on répète l'expérience avec de nouveaux lentivirus Pmab cre-rec BFP.

2. Perspectives et conclusion

Les leucémies aiguës demeurent encore un défi pour les années à venir, mais les avancées de la recherche ont tout de même permis de faire avancer grandement nos connaissances dans le domaine de l'héματο-oncologie. Le développement de nouveaux modèles *in vivo* est un bon exemple de cet avancement dans les outils mis à notre disposition pour mieux comprendre les mécanismes derrière la leucémogénèse. Au cours de ce présent mémoire, nous avons pu tester certaines limites de ce modèle en générant des leucémies humaines à partir de cellules souches hématopoïétiques et progénitrices de sang de cordon ombilical par transduction de celles-ci avec l'oncogène de fusion MLL-ENL. Nous avons ainsi pu montrer que ce modèle est effectivement capable de reproduire les processus de leucémogénèse humain *in vivo*. Les souris NSG possèdent des avantages comme modèle humanisé comparé aux souris que nous utilisions précédemment dans le laboratoire, cependant nous ne parvenons toujours pas à générer d'autres types de leucémies que des LLA-B pro-B avec la fusion MLL-ENL.

La deuxième partie de l'expérience n'a malheureusement pas permis de répondre à notre deuxième hypothèse, c'est-à-dire si les cellules souches leucémiques primaires ayant acquis leurs nouvelles caractéristiques grâce à la fusion MLL-ENL restent tout de même dépendantes de celle-ci pour maintenir ces caractéristiques. Malgré cela, des observations ont pu être faites pour confirmer plusieurs prémisses de notre expérience, notamment la capacité d'un petit nombre de cellules issues

de leucémies primaires de se greffer dans une souris et de générer une leucémie secondaire identique à la leucémie d'origine. Nous avons aussi démontré la viabilité de ces cellules après une infection fructueuse avec des lentivirus contrôles et un triage par un FACS.

L'expérience sera donc à répéter dans le futur après avoir corrigé les lentivirus afin d'apporter une réponse définitive à cette deuxième hypothèse. Nous pouvons tout de même voir d'ici là s'il est possible d'initier d'autres types de leucémies aigües avec la fusion MLL-ENL *in vitro*, par exemple des LMA, en stimulant les CSH transduites avec des cytokines pour qu'elles se dirigent vers la lignée myéloïde avant de les trier et de les injecter dans notre modèle *in vivo* pour éviter la tendance de différenciation vers la lignée lymphoïde. Enfin, si nous réussissons à cliver MLL-ENL des leucémies secondaires avec notre système LoxP-cre recombinaise, nous pourrions tenter l'expérience avec d'autres fusions MLL fréquentes, par exemple MLL-AF4 ou MLL-AF9.

Bibliographie

1. R. Coujard, J.P., J. Racadot, *Précis d'histologie humaine*, ed. L.p.d.I.U. Laval1980, Québec: Masson.
2. White, C., et al., *HRG1 is essential for heme transport from the phagolysosome of macrophages during erythrophagocytosis*. Cell Metab, 2013. **17**(2): p. 261-70.
3. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-644.
4. Fliedner, T.M., et al., *Hematopoietic cell renewal as the limiting factor in low-level radiation exposure: diagnostic implications and therapeutic options*. Mil Med, 2002. **167**(2 Suppl): p. 46-8.
5. Pansky, B., *Review of Medical Embryology*1982: McGraw-Hill.
6. Bautch, V.L., et al., *Blood island formation in attached cultures of murine embryonic stem cells*. Developmental Dynamics, 1996. **205**(1): p. 1-12.
7. Besa, E.C., *Hematology*1992: Williams & Wilkins. 335.
8. Ghanassia, E. and V. Procureur, *Embryologie: biologie du développement et de la reproduction*1999: Editions Estem.
9. Mertelsmann, R., et al., *Précis d'hématologie et d'oncologie*2011: Springer. 1046.
10. McKenzie, S.B., *Textbook of Hematology*1996: Williams & Wilkins.
11. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation*. Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine, 2010. **2**(6): p. 640-653.
12. Pazianos, G., M. Ugoezwa, and T. Reya, *The elements of stem cell self-renewal: a genetic perspective*. Biotechniques, 2003. **35**(6): p. 1240-7.
13. Jacobson, L.O., et al., *The role of the spleen in radiation injury and recovery*. J Lab Clin Med, 1950. **35**(5): p. 746-70.
14. Lorenz, E., C. Congdon, and D. Uphoff, *Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections*. Radiology, 1952. **58**(6): p. 863-77.
15. Guest, I., et al., *Survival of irradiated recipient mice after transplantation of bone marrow from young, old and "early aging" mice*. Aging (Albany NY), 2015. **7**(12): p. 1212-23.
16. McCulloch, E.A. and J.E. Till, *The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice*. Radiation Research, 1960. **13**(1): p. 115-125.
17. Till, J.E. and E.A. McCulloch, *A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells*. Radiation Research, 1961. **14**(2): p. 213-222.
18. Becker, A.J., E.A. McCulloch, and J.E. Till, *Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells*. Nature, 1963. **197**(4866): p. 452-454.
19. Ng, Y.Y., et al., *Isolation of Human and Mouse Hematopoietic Stem Cells*, in *Genetic Modification of Hematopoietic Stem Cells: Methods and Protocols*, C. Baum, Editor 2009, Humana Press: Totowa, NJ. p. 13-21.
20. Gluckman, E., et al., *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling*. N Engl J Med, 1989. **321**(17): p. 1174-8.

21. Malumbres, M. and A. Carnero, *Cell cycle deregulation: a common motif in cancer*. Prog Cell Cycle Res, 2003. **5**: p. 5-18.
22. Gur-Cohen, S., et al., *Regulation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by EPCR/PAR1 signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2016: p. n/a-n/a.
23. Mendelson, A. and P.S. Frenette, *Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration*. Nat Med, 2014. **20**(8): p. 833-846.
24. Baum, C.M., et al., *Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2804-2808.
25. Hao, Q., et al., *Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3306-3313.
26. Lacadie, S.A. and L.I. Zon, *The ERGonomics of hematopoietic stem cell self-renewal*. Genes & Development, 2011. **25**(4): p. 289-293.
27. Pina, C. and T. Enver, *Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6750-6765.
28. Groen, R.W.J., et al., *Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma*. Blood, 2012. **120**(3): p. e9-e16.
29. Horowitz, M., *New IBMTR/ABMTR slides summarize current use and outcome of allogeneic and autologous transplants*. IBMTR News Lett, 1995. **2**: p. 1-8.
30. Verfaillie, C.M., J.B. McCarthy, and P.B. McGlave, *Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin*. J Exp Med, 1991. **174**(3): p. 693-703.
31. Kondo, M., *Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors*. Immunological reviews, 2010. **238**(1): p. 37-46.
32. Golden-Mason, L., et al., *Differential expression of lymphoid and myeloid markers on differentiating hematopoietic stem cells in normal and tumor-bearing adult human liver*. Hepatology, 2000. **31**(6): p. 1251-1256.
33. Iwasaki, H. and K. Akashi, *Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6687-6696.
34. Hoffman, R., et al., *Hematology: Basic Principles and Practice* 2013: Saunders/Elsevier.
35. Thiriet, M., *Tissue Functioning and Remodeling in the Circulatory and Ventilatory Systems* 2013: Springer New York.
36. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-334.
37. Boulais, P.E. and P.S. Frenette, *Making sense of hematopoietic stem cell niches*. Blood, 2015. **125**(17): p. 2621-2629.
38. Hidalgo, A., L.A. Weiss, and P.S. Frenette, *Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally*. The Journal of Clinical Investigation, 2002. **110**(4): p. 559-569.
39. Sharma, M.B., L.S. Limaye, and V.P. Kale, *Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells*. Haematologica, 2012. **97**(5): p. 651-660.
40. Barrett, O., R. Sottocornola, and C.L. Celso, *In Vivo Imaging of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Niche*, in *Progenitor Cells: Methods and Protocols*, A.K. Mace and M.K. Braun, Editors. 2012, Humana Press: Totowa, NJ. p. 231-242.

41. Ponader, S. and J.A. Burger, *Modeling the marrow stem cell niche in vitro: is proximity the key to reproduction?* Haematologica, 2010. **95**(9): p. e5-e5.
42. Serafini, M., et al., *Establishment of bone marrow and hematopoietic niches in vivo by reversion of chondrocyte differentiation of human bone marrow stromal cells.* Stem Cell Research, 2014. **12**(3): p. 659-672.
43. Heike, T. and T. Nakahata, *Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2002. **1592**(3): p. 313-321.
44. Zhu, J. and S.G. Emerson, *Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment.* Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3295-313.
45. Bigas, A. and L. Espinosa, *Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be.* Blood, 2012. **119**(14): p. 3226-3235.
46. Blank, U., G. Karlsson, and S. Karlsson, *Signaling pathways governing stem-cell fate.* Blood, 2008. **111**(2): p. 492-503.
47. Luis, T.C., et al., *Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development.* Leukemia, 2012. **26**(3): p. 414-421.
48. Frelin, C., et al., *GATA-3 regulates the self-renewal of long-term hematopoietic stem cells.* Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 1037-1044.
49. Wang, Y., et al., *GATA-3 controls T cell maintenance and proliferation downstream of TCR and cytokine signals.* Nat Immunol, 2013. **14**(7): p. 714-722.
50. Hock, H., et al., *Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival.* Genes & Development, 2004. **18**(19): p. 2336-2341.
51. Riether, C., C.M. Schurch, and A.F. Ochsenbein, *Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system.* Cell Death Differ, 2015. **22**(2): p. 187-198.
52. Kampen, K.R., *The discovery and early understanding of leukemia.* Leukemia Research, 2012. **36**(1): p. 6-13.
53. Schultz, M., *Rudolf Virchow.* Emerging Infectious Diseases, 2008. **14**(9): p. 1480-1481.
54. Passegue, E., et al., *Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100** Suppl 1: p. 11842-9.
55. Kasper, D.L. and T.R. Harrison, *Harrison's principles of internal medicine* 2005, New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
56. Swerdlow, S.H., I.A.f.R.o. Cancer, and W.H. Organization, *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* 2008: International Agency for Research on Cancer.
57. Cozzio, A., et al., *Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors.* Genes & Development, 2003. **17**(24): p. 3029-3035.
58. Krivtsov, A.V., et al., *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9.* Nature, 2006. **442**(7104): p. 818-822.
59. Horton, S.J. and B.J.P. Huntly, *Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology.* Haematologica, 2012. **97**(7): p. 966-974.
60. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group.* British Journal of Haematology, 1976. **33**(4): p. 451-458.
61. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.* Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-2405.
62. Belson, M., B. Kingsley, and A. Holmes, *Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review.* Environmental Health Perspectives, 2007. **115**(1): p. 138-145.

63. Maynadié, M. and X. Troussard, *Épidémiologie des leucémies aiguës*. Revue Francophone des Laboratoires, 2015. **2015**(471): p. 29-33.
64. Chiaretti, S. and R. Foà, *T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Haematologica, 2009. **94**(2): p. 160-162.
65. Oran, B. and D.J. Weisdorf, *Survival for older patients with acute myeloid leukemia: a population-based study*. Haematologica, 2012. **97**(12): p. 1916-1924.
66. Juliusson, G., et al., *Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry*. Blood, 2009. **113**(18): p. 4179-4187.
67. Estey, E.H., *Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management*. American Journal of Hematology, 2012. **87**(1): p. 89-99.
68. Frohling, S., et al., *CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations*. J Clin Oncol, 2004. **22**(4): p. 624-33.
69. Owaidah, T.M., et al., *Cytogenetics, molecular and ultrastructural characteristics of biphenotypic acute leukemia identified by the EGIL scoring system*. Leukemia, 2006. **20**(4): p. 620-626.
70. Weir, E.G., et al., *Acute bilineal leukemia: a rare disease with poor outcome*. Leukemia, 2007. **21**(11): p. 2264-2270.
71. Béné, M.C., *Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias!* Haematologica, 2009. **94**(7): p. 891-893.
72. McGraw, T.P., et al., *Terminal deoxynucleotidyl transferase-positive acute myeloblastic leukemia*. Am J Hematol, 1981. **10**(3): p. 251-8.
73. Catovsky, D., et al., *A classification of acute leukaemia for the 1990s*. Ann Hematol, 1991. **62**(1): p. 16-21.
74. Bene, M.C., et al., *Proposals for the immunological classification of acute leukemias*. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia, 1995. **9**(10): p. 1783-6.
75. Gu, Y., et al., *The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene*. Cell, 1992. **71**(4): p. 701-708.
76. Tkachuk, D.C., S. Kohler, and M.L. Cleary, *Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias*. Cell, 1992. **71**(4): p. 691-700.
77. Ziemer-van der Poel, S., et al., *Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(23): p. 10735-10739.
78. Ford, A.M., et al., *In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias*. Nature, 1993. **363**(6427): p. 358-360.
79. Schuettengruber, B., et al., *Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins*. Cell, 2007. **128**(4): p. 735-745.
80. Dalla-Favera, R., et al., *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982. **79**(24): p. 7824-7827.
81. Nowell, P.C. and D.A. Hungerford, *Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes*. J Natl Cancer Inst, 1960. **25**: p. 85-109.
82. Djabali, M., et al., *A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias*. Nat Genet, 1992. **2**(2): p. 113-118.

83. DiMartino, J.F. and M.L. Cleary, *MLL rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies*. British Journal of Haematology, 1999. **106**(3): p. 614-626.
84. Milne, T.A., et al., *MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to *Hox* Gene Promoters*. Molecular Cell, 2002. **10**(5): p. 1107-1117.
85. Nakamura, T., et al., *ALL-1 Is a Histone Methyltransferase that Assembles a Supercomplex of Proteins Involved in Transcriptional Regulation*. Molecular Cell, 2002. **10**(5): p. 1119-1128.
86. Li, Y., et al., *Structural basis for activity regulation of MLL family methyltransferases*. Nature, 2016. **530**(7591): p. 447-452.
87. Dou, Y., et al., *Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(8): p. 713-719.
88. Hsieh, J.J.-D., et al., *Proteolytic Cleavage of MLL Generates a Complex of N- and C-Terminal Fragments That Confers Protein Stability and Subnuclear Localization*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 186-194.
89. Hsieh, J.J.D., E.H.Y. Cheng, and S.J. Korsmeyer, *Taspase1*. Cell, 2003. **115**(3): p. 293-303.
90. Yokoyama, A., et al., *Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3710-3718.
91. Xia, Z.-B., et al., *MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8342-8347.
92. Zeleznik-Le, N.J., A.M. Harden, and J.D. Rowley, *11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10610-10614.
93. Reeves, R. and M.S. Nissen, *The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(15): p. 8573-8582.
94. Adler, H.T., et al., *HRX Leukemic Fusion Proteins Form a Heterocomplex with the Leukemia-associated Protein SET and Protein Phosphatase 2A*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(45): p. 28407-28414.
95. Adler, H.T., et al., *Leukemic HRX Fusion Proteins Inhibit GADD34-Induced Apoptosis and Associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 Proteins*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7050-7060.
96. Yano, T., et al., *Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7286-7291.
97. Cierpicki, T., et al., *Structure of the MLL CXXC domain – DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(1): p. 62-68.
98. Santillan, D.A., et al., *Bromodomain and Histone Acetyltransferase Domain Specificities Control Mixed Lineage Leukemia Phenotype*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 10032-10039.
99. Ali, M., et al., *Diverse functions of PHD fingers of the MLL/KMT2 subfamily*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(2): p. 366-371.
100. Yokoyama, A., et al., *Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways*. Journal of Cell Science, 2011. **124**(13): p. 2208-2219.
101. Wang, J., et al., *A Subset of Mixed Lineage Leukemia Proteins Has Plant Homeodomain (PHD)-mediated E3 Ligase Activity*. The Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(52): p. 43410-43416.

102. Fair, K., et al., *Protein Interactions of the MLL PHD Fingers Modulate MLL Target Gene Regulation in Human Cells*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(10): p. 3589-3597.
103. Wang, Z., et al., *Pro Isomerization in MLL1 PHD3-Bromo Cassette Connects H3K4me Readout to CYP33 and HDAC-Mediated Repression*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1183-1194.
104. Chang, P.-Y., et al., *Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription*. Journal of molecular biology, 2010. **400**(2): p. 137-144.
105. Park, S., et al., *The PHD3 Domain of MLL Acts as a CYP33-Regulated Switch between MLL-Mediated Activation and Repression*. Biochemistry, 2010. **49**(31): p. 6576-6586.
106. Muntean, A.G., et al., *The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4690-4693.
107. Chen, J., et al., *Loss of MLL PHD-finger-3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6199-6207.
108. Ernst, P., et al., *MLL and CREB Bind Cooperatively to the Nuclear Coactivator CREB-Binding Protein*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2249-2258.
109. Malik, S. and S.R. Bhaumik, *Mixed lineage leukemia: histone H3 lysine 4 methyltransferases from yeast to human*. The FEBS journal, 2010. **277**(8): p. 1805-1821.
110. Wysocka, J., et al., *WDR5 Associates with Histone H3 Methylated at K4 and Is Essential for H3 K4 Methylation and Vertebrate Development*. Cell, 2005. **121**(6): p. 859-872.
111. Dou, Y., et al., *Physical Association and Coordinate Function of the H3 K4 Methyltransferase MLL1 and the H4 K16 Acetyltransferase MOF*. Cell, 2005. **121**(6): p. 873-885.
112. Steward, M.M., et al., *Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(9): p. 852-854.
113. Deschamps, J. and M. Wijgerde, *Two Phases in the Establishment of HOX Expression Domains*. Developmental Biology, 1993. **156**(2): p. 473-480.
114. Hanson, R.D., et al., *Mammalian Trithorax and Polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14372-14377.
115. Yu, B.D., et al., *MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(18): p. 10632-10636.
116. Yu, B.D., et al., *Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice*. Nature, 1995. **378**(6556): p. 505-508.
117. Yagi, H., et al., *Growth Disturbance in Fetal Liver Hematopoiesis of Mll-Mutant Mice*. Blood, 1998. **92**(1): p. 108-117.
118. McMahon, K.A., et al., *Mll Has a Critical Role in Fetal and Adult Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 338-345.
119. Jude, C.D., et al., *Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 324-337.
120. Schraets, D., et al., *MLL-mediated transcriptional gene regulation investigated by gene expression profiling*. Oncogene, 2003. **22**(23): p. 3655-3668.
121. Guenther, M.G., et al., *Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8603-8608.
122. Rowley, J.D., *A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining*. Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-293.
123. Meyer, C., et al., *New insights to the MLL recombinome of acute leukemias*. Leukemia, 2009. **23**(8): p. 1490-1499.

124. Gué, M., J.-S. Sun, and T. Boudier, *Simultaneous localization of MLL, AF4 and ENL genes in interphase nuclei by 3D-FISH: MLL translocation revisited*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 20-20.
125. Gillert, E., et al., *A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells*. Oncogene, 1999. **18**(33): p. 4663-71.
126. Ikeda, H., *12 DNA Topoisomerase-mediated Illegitimate Recombination*. 19901990.
127. Bae, Y.S., et al., *Illegitimate recombination mediated by calf thymus DNA topoisomerase II in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(7): p. 2076-2080.
128. Strissel, P.L., et al., *An In Vivo Topoisomerase II Cleavage Site and a DNase I Hypersensitive Site Colocalize Near Exon 9 in the MLLBreakpoint Cluster Region*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3793-3803.
129. Lieber, M.R., K. Yu, and S.C. Raghavan, *Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations*. DNA Repair, 2006. **5**(9-10): p. 1234-1245.
130. Zhang, Y. and J.D. Rowley, *Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia*. DNA Repair, 2006. **5**(9-10): p. 1282-1297.
131. Felix, C.A., *Leukemias related to treatment with DNA topoisomerase II inhibitors**. Medical and Pediatric Oncology, 2001. **36**(5): p. 525-535.
132. Richardson, C. and M. Jasin, *Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks*. Nature, 2000. **405**(6787): p. 697-700.
133. Damer, P.H., et al., *Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7884-7888.
134. Arai, S., et al., *Evi-1 is a transcriptional target of mixed-lineage leukemia oncoproteins in hematopoietic stem cells*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6304-6314.
135. Huang, X., et al., *Enhancers of Polycomb EPC1 and EPC2 sustain the oncogenic potential of MLL leukemia stem cells*. Leukemia, 2014. **28**(5): p. 1081-1091.
136. Park, S.-M., et al., *Musashi2 sustains the mixed-lineage leukemia-driven stem cell regulatory program*. The Journal of Clinical Investigation, 2015. **125**(3): p. 1286-1298.
137. Ayton, P.M. and M.L. Cleary, *Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9*. Genes & Development, 2003. **17**(18): p. 2298-2307.
138. Ernst, P., et al., *An Mll-Dependent Hox Program Drives Hematopoietic Progenitor Expansion*. Current Biology, 2004. **14**(22): p. 2063-2069.
139. Krivtsov, A.V., et al., *H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias*. Cancer cell, 2008. **14**(5): p. 355-368.
140. Greaves, M., *When One Mutation Is All It Takes*. Cancer cell, 2015. **27**(4): p. 433-434.
141. Corral, J., et al., *An Mll;AF9 Fusion Gene Made by Homologous Recombination Causes Acute Leukemia in Chimeric Mice: A Method to Create Fusion Oncogenes*. Cell, 1996. **85**(6): p. 853-861.
142. Lavau, C., et al., *Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL*. The EMBO Journal, 1997. **16**(14): p. 4226-4237.
143. DiMartino, J.F., et al., *A carboxy-terminal domain of ELL is required and sufficient for immortalization of myeloid progenitors by MLL-ELL*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3887-3893.
144. DiMartino, J.F., et al., *The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3780-3785.
145. So, C.W., et al., *Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by MLL-GAS7 in the absence of Hoxa7 or Hoxa9*. Blood, 2004. **103**(8): p. 3192-3199.
146. Bursen, A., et al., *The AF4·MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL·AF4*. Blood, 2010. **115**(17): p. 3570-3579.

147. Chessells, J.M., et al., *Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party*. Leukemia, 2002. **16**(5): p. 776-84.
148. Pieters, R., et al., *A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial*. The Lancet, 2007. **370**(9583): p. 240-250.
149. Tomizawa, D., et al., *Outcome of risk-based therapy for infant acute lymphoblastic leukemia with or without an MLL gene rearrangement, with emphasis on late effects: a final report of two consecutive studies, MLL96 and MLL98, of the Japan Infant Leukemia Study Group*. Leukemia, 2007. **21**(11): p. 2258-2263.
150. von Neuhoff, C., et al., *Prognostic Impact of Specific Chromosomal Aberrations in a Large Group of Pediatric Patients With Acute Myeloid Leukemia Treated Uniformly According to Trial AML-BFM 98*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(16): p. 2682-2689.
151. Pui, C.H., J.R. Kane, and W.M. Crist, *Biology and treatment of infant leukemias*. Leukemia, 1995. **9**(5): p. 762-9.
152. Meyer, C., et al., *The MLL recombinome of acute leukemias in 2013*. Leukemia, 2013. **27**(11): p. 2165-2176.
153. Marschalek, R., *Systematic Classification of Mixed-Lineage Leukemia Fusion Partners Predicts Additional Cancer Pathways*. Annals of Laboratory Medicine, 2016. **36**(2): p. 85-100.
154. Fu, J.-F., et al., *Molecular analysis of t(X;11)(q24;q23) in an infant with AML-M4*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2003. **38**(3): p. 253-259.
155. Fu, J.-F., et al., *Identification of CBL, a proto-oncogene at 11q23.3, as a novel MLL fusion partner in a patient with de novo acute myeloid leukemia*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2003. **37**(2): p. 214-219.
156. Shih, L.y., et al., *Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement*. Leukemia, 2005. **20**(2): p. 218-223.
157. Smith, E., C. Lin, and A. Shilatifard, *The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease*. Genes & Development, 2011. **25**(7): p. 661-672.
158. Luo, Z., C. Lin, and A. Shilatifard, *The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(9): p. 543-547.
159. Slany, R.K., C. Lavau, and M.L. Cleary, *The Oncogenic Capacity of HRX-ENL Requires the Transcriptional Transactivation Activity of ENL and the DNA Binding Motifs of HRX*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 122-129.
160. Erfurth, F., et al., *MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci*. Leukemia, 2003. **18**(1): p. 92-102.
161. Mueller, D., et al., *A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4445-4454.
162. Zeisig, D.T., et al., *The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin*. Oncogene, 2005. **24**(35): p. 5525-5532.
163. Nie, Z., et al., *Novel SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complexes Contain a Mixed-Lineage Leukemia Chromosomal Translocation Partner*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(8): p. 2942-2952.
164. Schulze, J.M.S.M., A.Y.W.Y. Wang, and M.S.K.S. Kobor, *YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription* This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB's 51st Annual Meeting – Epigenetics and Chromatin Dynamics, and has undergone the Journal's usual peer review process. Biochemistry and Cell Biology, 2009. **87**(1): p. 65-75.

165. Garcia-Cuellar, M.P., et al., *The ENL moiety of the childhood leukemia-associated MLL-ENL oncoprotein recruits human Polycomb 3*. *Oncogene*, 2001. **20**(4): p. 411-9.
166. Garcia-Cuellar, M.P., et al., *ENL, the MLL fusion partner in t(11;19), binds to the c-Abl interactor protein 1 (ABI1) that is fused to MLL in t(10;11)+*. *Oncogene*, 2000. **19**(14): p. 1744-51.
167. Mueller, D., et al., *Misguided Transcriptional Elongation Causes Mixed Lineage Leukemia*. *PLoS Biology*, 2009. **7**(11): p. e1000249.
168. Slany, R.K., *The molecular mechanics of mixed lineage leukemia*. *Oncogene*, 2016.
169. Peterlin, B.M. and D.H. Price, *Controlling the Elongation Phase of Transcription with P-TEFb*. *Molecular Cell*, 2006. **23**(3): p. 297-305.
170. Bitoun, E., P.L. Oliver, and K.E. Davies, *The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling*. *Human Molecular Genetics*, 2007. **16**(1): p. 92-106.
171. Monroe, S.C., et al., *MLL-AF9 and MLL-ENL alter the dynamic association of transcriptional regulators with genes critical for leukemia*. *Exp Hematol*, 2010. **39**(1): p. 77-86.e5.
172. Okada, Y., et al., *hDOT1L Links Histone Methylation to Leukemogenesis*. *Cell*, 2005. **121**(2): p. 167-178.
173. Deshpande, A.J., et al., *AF10 Regulates Progressive H3K79 Methylation and HOX Gene Expression in Diverse AML Subtypes*. *Cancer cell*, 2014. **26**(6): p. 896-908.
174. Milne, T.A., et al., *Leukemogenic MLL Fusion Proteins Bind across a Broad Region of the Hox a9 Locus, Promoting Transcription and Multiple Histone Modifications*. *Cancer Res*, 2005. **65**(24): p. 11367-11374.
175. Kroon, E., et al., *Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b*. *The EMBO Journal*, 1998. **17**(13): p. 3714-3725.
176. Dou, Y. and J.L. Hess, *Mechanisms of transcriptional regulation by MLL and its disruption in acute leukemia*. *Int J Hematol*, 2008. **87**(1): p. 10-18.
177. Fu, J.-F., D.-C. Liang, and L.-Y. Shih, *Analysis of Acute Leukemias With MLL/ENL Fusion Transcripts. Identification of Two Novel Breakpoints in ENL*, 2007. **127**(1): p. 24-30.
178. Naghashpour, M., et al., *Mixed phenotype acute leukemia with t(11;19)(q23;p13.3)/ MLL-MLLT1(ENL), B/T-lymphoid type: A first case report*. *American Journal of Hematology*, 2010. **85**(6): p. 451-454.
179. Chen, W., et al., *A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy*. *Blood*, 2006. **108**(2): p. 669-677.
180. Somerville, T.C.P. and M.L. Cleary, *Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia*. *Cancer cell*, 2006. **10**(4): p. 257-268.
181. Liu, H., E.H.Y. Cheng, and J.J.D. Hsieh, *MLL fusions: Pathways to leukemia*. *Cancer Biology & Therapy*, 2009. **8**(13): p. 1204-1211.
182. Lavau, C., et al., *Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL*. *The EMBO Journal*, 1997. **16**(14): p. 4226-4237.
183. Forster, A., et al., *Engineering de novo reciprocal chromosomal translocations associated with Mll to replicate primary events of human cancer*. *Cancer cell*, 2003. **3**(5): p. 449-458.
184. Ishikawa, F., et al., *Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region*. *Nat Biotech*, 2007. **25**(11): p. 1315-1321.
185. Shultz, L.D., et al., *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice*. *The Journal of Immunology*, 1995. **154**(1): p. 180-91.

186. Hesselton, R.M., et al., *High Levels of Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Engraftment and Enhanced Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in NOD/LtSz-scid/scid Mice*. Journal of Infectious Diseases, 1995. **172**(4): p. 974-982.
187. Barabé, F., et al., *Modeling the Initiation and Progression of Human Acute Leukemia in Mice*. Science, 2007. **316**(5824): p. 600-604.
188. Wei, J., et al., *Microenvironment Determines Lineage Fate in a Human Model of MLL-AF9 Leukemia*. Cancer cell. **13**(6): p. 483-495.
189. Moriya, K., et al., *Development of a Multi-Step Leukemogenesis Model of MLL-Rearranged Leukemia Using Humanized Mice*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e37892.
190. Montes, R., et al., *Enforced expression of MLL-AF4 fusion in cord blood CD34+ cells enhances the hematopoietic repopulating cell function and clonogenic potential but is not sufficient to initiate leukemia*. Blood, 2011. **117**(18): p. 4746-4758.
191. Pabst, C., et al., *Identification of small molecules that support human leukemia stem cell activity ex vivo*. Nat Meth, 2014. **11**(4): p. 436-442.
192. Ito, M., et al., *NOD/SCID/γ mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3175-3182.
193. Shultz, L.D., et al., *Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2Rγnull Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(10): p. 6477-6489.
194. Ohbo, K., et al., *Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain*. Blood, 1996. **87**(3): p. 956-967.
195. Ishikawa, F., et al., *Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain(null) mice*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1565-1573.
196. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *Principles of Retroviral Vector Design*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
197. Storek, J., et al., *Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3380-3389.
198. Rossi, M.I.D., et al., *Relatively Normal Human Lymphopoiesis but Rapid Turnover of Newly Formed B Cells in Transplanted Nonobese Diabetic/SCID Mice*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(6): p. 3033-3042.
199. Guenechea, G., et al., *Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential*. Nat Immunol, 2001. **2**(1): p. 75-82.
200. Hilden, J.M., et al., *Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group*. Blood, 2006. **108**(2): p. 441-451.
201. Rubnitz, J., et al., *Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study*. Blood, 1994. **84**(2): p. 570-573.
202. Brown, P., *Treatment of infant leukemias: challenge and promise*. ASH Education Program Book, 2013. **2013**(1): p. 596-600.