UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

LNOx, Niche Leucémique et métabolisme Oxydatif

Equipe 2 de l'unité CNRS-université UMR 7292 GICC

THÈSE présentée par :

Joan LECLERC

soutenue le : **13 décembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Activité NADPH oxydase des cellules de leucémie aiguë myéloïde

THÈSE dirigée par :

Mr Hérault Olivier	Professeur, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme Maguer-Satta Véronique	Directeur de Recherche, CNRS, Lyon
Mr Mazurier Frédéric	Directeur de Recherche, INSERM, Bordeaux

---

JURY :

Mme Stasia-Pauger Marie-José	Maître de Conférence, Université Grenoble 1, Grenoble
Mr Domenech Jorge	Professeur, Université de Tours, Tours

Des souvenirs ne remplaceront jamais ton sourire,
J’aurai tant aimé que tu sois parmi nous…

Remerciements

A Monsieur le Professeur Olivier Hérault,

Je vous remercie d'avoir dirigé cette thèse, et de m'avoir confié cette mission d'initier au laboratoire les recherches sur ce sujet si intéressant qui vous tient tant à cœur. Votre implication, votre intérêt pour cette nouvelle thématique, vos travaux préliminaires, vos connaissances, vos conseils mais aussi votre optimisme au sujet des oxydases m'ont été d'une grande aide et m'auront beaucoup appris soyez en sûr.
Pour tout cela et tout ce que j'oublie sûrement, je vous remercie sincèrement et vous en suis reconnaissant.

A Madame Véronique Maguer-Satta,

Vous me faites un très grand honneur de juger ce travail, vos compétences dans le domaine et vos remarques seront importantes à prendre en considération pour la suite de ce projet. Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus profond respect et de toute ma reconnaissance.

A Monsieur Frédéric Mazurier,

Vous me faites un très grand honneur d'avoir accepté de juger ce travail. Vos connaissances hématologiques et des oxydases rendent votre jugement important à mes yeux. Veuillez trouver ici toute ma gratitude et mon respect.

A Madame Marie-José Stasia-Pauger,

Votre présence dans ce jury, est un immense honneur. J'ai eu le plaisir de venir me former aux techniques d'analyse de l'activité oxydase dans votre laboratoire. J'y ai appris énormément de techniques, énormément de connaissances, énormément de détails et de « trucs » si importants qu'on ne trouve nulle part ailleurs que dans des discussions avec des spécialistes. Vous présenter les résultats de ce travail auquel vous avez grandement contribué sera un plaisir. Pour votre présence dans ce jury, pour m'avoir chaleureusement ouvert les portes de votre laboratoire pour partager votre expérience et votre expertise, veuillez trouver

ici le témoignage de mon plus profond respect et de toute ma reconnaissance et remercier également toute votre équipe.

A Monsieur Jorge Domenech,

C'est un grand honneur de vous compter parmi les membres de ce jury. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail par vos remarques, vos questions, vos suggestions depuis le début de ce projet ainsi que pour votre sympathie.

Aux membres de l'équipe LNOx,

J'en oublierai certainement, mais…

Christelle, un merci tout particulier pour toute l'aide que tu as pu m'apporter en discutant de l'élaboration des protocoles, en partageant tes connaissances et en collaborant très activement à tous ces travaux ! Tu as toujours été disponible, l'organisation du travail et la gestion des expériences animales ont été très efficaces et ont toujours bien fonctionnées C'est très agréable de travailler dans ces conditions.

Merci à Florence, Emmanuel et Fabrice d'avoir porté votre attention sur ce projet à chacune de mes présentations, et surtout à chaque fois que je vous ai sollicité pour en discuter, ce qui a toujours été source d'idées, d'encouragements et de points positifs. Pour votre gentillesse et votre disponibilité, un grand merci.

Un grand merci à Elfi et Sophie qui gèrent la vie du laboratoire! Votre disponibilité, votre aide pour certaines manip, votre apport technique, votre efficacité à gérer les aléas de la vie du laboratoire et à toujours réagir le plus vite possible nous facilitent grandement la vie. De plus vous faîtes tout cela avec le sourire et dans la bonne humeur ce qui contribue grandement à la bonne ambiance qui règne dans cette équipe. A vous j'associe évidement Marie Christine, toujours à l'écoute, ayant toujours une idée pour résoudre chaque problème et connaissant chaque recoin du laboratoire comme sa poche ! (Tu aurais pu retarder ta retraite d'un an et rester jusqu'à la fin de ma thèse, mais tu m'as préféré Derrick… Je te comprends !) Soyez assurées toutes les trois de toute ma reconnaissance et de toute mon amitié.

Merci à Georges et Manu, qui du haut du 4ème étage ont toujours été prêt à apporter leur aide en cas de besoin et gèrent eux aussi de façon agréable leur partie du laboratoire !

Christine, nous avons longtemps partagé un bureau et un directeur de thèse, deux choses qui rapprochent évidemment. Je te remercie de ta sympathie à mon arrivée, de tes conseils et de la transmission de nombreuses techniques et connaissances que tu n'as jamais hésité à partager. Tu as toujours répondu présente en cas de besoin, question ou appel au secours… une collègue de thèse comme toi facilite grandement l'arrivée dans une nouvelle équipe, pour tout cela, merci.

Enfin, merci à tous les autres étudiants, Laura, Nicole, Aurore, Jean, Jérôme et bien d'autres que j'oublie certainement au moment de rédiger ces remerciement dans la précipitation…

Aux membres du N2C,

Un merci particulier à Sébastien et Jean-Yves présents à l'origine du projet de « patcher » des cellules leucémiques ! On aura eut quelques courants ! Sébastien, merci de tes conseils, de ton soutien et d'avoir toujours été disponible pour discuter, échanger et prendre de mes nouvelles, sois assuré que je l'ai apprécié et t'exprime ici toute mon amitié.
Je pense aussi à tous ceux avec qui j'ai partagé de bons moments (et des bières) lors de mon passage parmi vous, en vrac : Aurélie, Catherine, Isa, Caro, Karine, Marie, Aurore, Stephan, Jacques, Christophe, Pierre, Stéphane, Jean-François… et à tous les étudiants que j'ai pu croiser, dont Mimsy, les deux Lucie (la petite et la grande), Emeline, Amandine, Alban, Ludo, Romain, Fabio…

Aux personnels du Service d'Hématologie Biologique,

Une partie de mon travail ayant nécessité l'utilisation de certaines de vos plateformes, je vous remercie de votre accueil, de votre disponibilité à chaque fois que j'en ai eut besoin. De même je remercie l'ensemble des secrétaires pour leur accueil toujours sympathique et agréable.

Aux associations qui ont contribuées à la réalisation de cette thèse,

Monsieur le président de l'association CANCEN, je vous remercie ainsi que tous les bénévoles participant à la vie de votre association d'avoir contribué au financement de cette thèse. Je vous en suis très reconnaissant.

A la Société Française d'Hématologie, je remercie la SFH d'avoir financé la fin de cette thèse. L'intérêt que vous avez porté à ce travail à été très encourageant et nous a permis d'aboutir à ce manuscrit.

A la l'Association d'Hématologie Biologique du CHU de Tours, merci pour votre soutien et pour l'aide que vous avez apporté pour permettre la réalisation de ce projet.

A ceux dont je suis sûre et certain qu'ils ne regarderont jamais cette thèse au-delà des remerciements,

A Marie, tu m'as supporté avant la thèse, tu m'as supporté pendant la thèse, je suis rassuré a priori tu devrais donc pouvoir me supporter après la thèse ! Je suis content d'avoir traversé cela avec toi : ton amour, ta présence, ton aide m'ont apporté un équilibre et une vie agréable à tous les instants ce n'est pas négligeable ! Cette période a été la cause de beaucoup de contraintes que tu m'as toujours aidé à traverser avec le sourire … Sois rassurée, l'été arrive et avec lui son lot de changements ! Sois assurée de tout mon amour…

A Erwan, ça y est ça se termine… J'aurai un peu plus de temps à te consacrer et ce n'est pas un mal. Je te remercie pour plein de choses, je ne vais pas les énumérer ici… bref merci d'être toujours là, toujours prêt à rendre service… un frangin quoi !

A papa, bon ça ne te rajeunit pas mais ça y est je vois le bout de ma thèse. Comme tu me l'as si souvent répété, c'est pour moi que je travaille, pas pour faire plaisir à mes parents. Donc voilà, c'est fait et j'en suis content j'aurai été au bout de cette thèse et c'est ce que je voulais ! Merci pour tout.

A mes grands-parents, merci à vous tous d'avoir été si présents depuis toujours. Vos pensées, vos encouragements et votre présence a toujours été source de réconfort.

A Nicolas, Laurence, Gwen et Coco, Cédric, c'est toujours un plaisir de vous voir, même si c'est rare ces derniers temps. C'est toujours un bol d'air de partager un moment avec vous et ça fait du bien ! C'est super de savoir qu'on peut toujours compter sur vous !

A Isabelle, Amélie, Elise, Baptiste, Hervé, Antoine, Florian et tout le reste de la famille, un grand merci d'avoir été là aussi. C'est toujours un plaisir de vous voir et de passer de bons moments avec vous !

A Flo, c'est toujours un plaisir de t'avoir au téléphone… Depuis peu nous étions compagnons de galère de thèse, tu comprendras que finalement je préfère qu'on ne le reste pas longtemps ! Mais je serai quand même là pour prendre des nouvelles, parler de tout et de rien comme tu l'as fait ces derniers temps… C'est loin l'Ecosse ?

A Michael, tu vas être content j'arrive enfin au bout des études, c'est fini ! Du coup on aura quelques trucs à rattraper depuis le temps !

A Alice, Vincent, Marmotte, Lucie, je pensais être le dernier à soutenir ma thèse, mais finalement j'ai peut être une chance de laisser la place à Marmotte… Vous avez pensé à aller le réveiller, jamais à l'heure celui-là.

A Iggy, tu es un chien, tu ne liras donc pas ma thèse mais comme Marie te le racontera je te réserve quand même quelques lignes pour te dire que ta présence pendant la rédaction de ma thèse et ta volonté de me faire sortir de mon bureau pour venir te voir c'était marrant… il y a encore du travail mais t'es un super chien !

A ceux qui s'attendent maintenant à ce qu'après le chien je remercie les poissons de mon aquarium, vous serez déçus je ne le ferai pas…

Merci à tous, d'avoir contribué à votre façon de près ou de loin à rendre le déroulement de cette thèse efficace et dans le contexte le plus agréable possible. Merci aussi à tous ceux que j'aurai éventuellement oublié dans la précipitation…

Résumé

Le métabolisme oxydatif joue un rôle important dans l'hématopoïèse normale et leucémique. L'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est un élément crucial qui repose sur une balance finement régulée entre leur élimination et leur production. A ce niveau, des études ont montrés une différence entre cellules souches leucémique (CSL) présentant un faible niveau de ROS et cellules différenciées leucoblastiques présentant un plus fort niveau de ROS. Dans cette étude nous avons montré que les NADPH oxydases sont des producteurs majeurs de ROS des cellules de leucémies aiguës myéloïdes. Les cellules leucoblastiques, quelque soit le stade de différenciation présentent une activité NADPH oxydase constitutive qui contribue à leur niveau de ROS élevé et favorise leur prolifération en accélérant le cycle cellulaire. A l'inverse, les analyses réalisées sur des CSL grâce à des modèles murins de leucémies primaires induites par les oncogènes *Hoxa9* et *Meis1* suggèrent qu'il existerait une plus faible activité oxydase dans les cellules souches leucémiques.

Mots clés : NADPH oxydase, Leucémie aiguë myéloïde, Espèces réactives de l'oxygène, Cellules souches leucémiques, Prolifération leucémique

Résumé en anglais

Oxydative metabolism play a key role in normal and leukemic hematopoiesis. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis is a crucial point which is the result of a finely regulated balance between elimination and production. Recent studies establishe a difference in ROS level between leukemic stem cells (LSC, ROS^{low}) and differentiated leucoblasts (higher level). In our study we have shown that NADPH oxidases are major ROS producers in acute myeloid leukemic cells. Leukoblasts, wathever their differentition stage, have a constitutive NADPH oxydase activity that contributes to the ROS level and promotes the proliferation by accelerating the cell cycle. Conversly, the analyses of LSCs performed by using murins primary leukemia induced by *Hoxa9* and *Meis1* oncogens suggest a potential lower NADPH oxidase activity in LSCs.

Key words : NADPH oxidases, Acute myeloïd leukemia, Reactive oxygen species, Leukemic stem cells, Leukemic proliferation

Table des matières

Remerciements 5
Résumé 11
Résumé en anglais 13
Table des matières 15
Liste des tableaux 19
Liste des figures 21
Liste des abréviations 23
Introduction générale, objectifs 27
Première partie La famille des NADPH oxydases et l'hématopoïèse normale et leucémique . 33
Chapitre 1 : La famille des NADPH oxydases 35
1. Historique : du "burst oxydatif" à la famille des NADPH oxydases 35
2. Les composants de la famille des oxydases 37
2.1. Les fonctions et structures communes des oxydases 37
2.2. Les sous-unités catalytiques membranaires 39
2.3. Le second composant membranaire 51
2.4. Les sous-unités cytosoliques organisatrices 51
2.5. Les sous-unités cytosoliques régulatrices 52
2.6. Rôle de la protéine Rac 54
3. La composition des complexes NADPH oxydase et leur activation 55
3.1. NOX2, le complexe phagocytaire 55
3.2. Le complexe NOX1 59
3.3. Le complexe NOX3 60
3.4. Le complexe NOX4 61
3.5. Le complexe NOX5 62
3.6. Les complexes DUOX1 et DUOX2 63
3.7. Hétérogénéité de formation des complexes oxydases 64
4. Inhibiteurs des oxydases 65
4.1. Les différents inhibiteurs 66
4.2. Aspects critiques de l’inhibition des oxydases 67

Chapitre 2 : Les ROS dans l'hématopoïèse normale et leucémique 69
1. Généralités sur l'hématopoïèse 69
1.1. Les CSH 71
1.2. Les progéniteurs hématopoïétiques 72
1.3. Les précurseurs hématopoïétiques 72
1.4. Les cellules matures 73
1.5. Caractérisation des cellules hématopoïétiques 73
2. Microenvironnement et concept de niche hématopoïétique 77
2.1. Composante cellulaire du microenvironnement 78
2.2. Composante moléculaire du microenvironnement 79
2.3. Le concept de niche hématopoïétique 81
3. Influence de l'oxygène et des ROS sur l'hématopoïèse normale 84
3.1. Influence des basses concentrations en O_2 sur les cellules hématopoïétiques 84
3.2. Influence des ROS sur l'auto-renouvellement des CSH 85
3.3. Influence des ROS sur la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques 88
3.4. Influence des ROS sur la mort cellulaire 90
4. Influence des ROS sur l'hématopoïèse leucémique 90
4.1. Les leucémies aigües myéloïdes (LAM) 90
4.2. L'hématopoïèse leucémique 91
4.3. Les ROS dans les leucémies aiguës myéloïdes 93
Chapitre 3 : De la CSH à la cellule mature, métabolismes énergétique et oxydatif 97
1. Influence du métabolisme sur le devenir de la CSH 97
2. Influence du statut oxydatif sur le devenir de la CSH 103
2.1. Généralités 103
2.2. Influence des oxydases dans la physiologie des CSH 104
3. Croisement des aspects métaboliques et oxydatifs déterminants pour le devenir de la CSH106
4. La CSL, une cellule souche différente de la CSH 110
Seconde partie : Résultats 113
Article 1 : L'activité NADPH oxydase favorise la prolifération des cellules de leucémies aiguës myéloïdes humaines. 115
1. Introduction 117

2. Article 119
2.1. Abstract 121
2.2. Introduction 123
2.3. Material and Methods 125
2.4. Results 129
2.5. Discussion 133
2.6. Aknowlegments 137
2.8. Figures 139
2.8. References 157
3. Discussion 161
Article 2 : Une plus faible activité NADPH oxydase dans les cellules souches leucémiques induites par les oncogènes Hoxa9 et Meis1. (Article en préparation) 163
1. Introduction 165
2. Matériel et méthode 166
2.1. Reconstitution in vivo des leucémies FLA2 et FLB1 166
2.2. Inhibition *in vivo* de p38MAPK et PLA2c 166
2.3. Western blot pour MAPKAPK2 et PLA2c 167
2.4. Quantification de l'acide arachidonique 167
2.5. Colocalisation des sous-unités NOX2 et $p67^{phox}$ 167
2.6. Analyse du niveau de production de ROS 168
2.7. Expression des sous-unités de la NADPH oxydases phagocytaire 169
3. Résultats 169
3.1. Contrôle de l'envahissement par les leucémies greffées 169
3.2. Activation de PLA2c 170
3.3. Analyse de la composition en acides gras des leucémies FLA2 et FLB1 170
3.4. Colocalisation des sous-unités 170
3.5. Production de ROS des leucémies FLA2 et FLB1 171
4. Discussion, perspectives 171
5. Figures 174
Conclusion générale 189
Bibliographie 201

Liste des tableaux

Tableau 1 : Le complexe oxydase phagocytaire. 59

Liste des figures

Figure 1 : La famille des NADPH oxydases. 38
Figure 2 : Transfert d'électrons par les oxydases. 39
Figure 3 : Conformation de NOX2. 40
Figure 4 : NOX2. 42
Figure 5 : NOX1 43
Figure 6 : NOX3 45
Figure 7 : NOX4 46
Figure 8 : NOX5 48
Figure 9 : DUOX1 49
Figure 10 : DUOX2 50
Figure 11 : La sous-unité organisatrice de référence, $p47^{phox}$. 52
Figure 12 : La sous-unité activatrice de référence, $p67^{phox}$. 53
Figure 13 : La sous-unité régulatrice $p40^{phox}$. 53
Figure 14 : Le complexe NOX2. 56
Figure 15 : Evénements de phosphorylation des sous-unités de l'oxydase phagocytaire 58
Figure 16 : Le complexe NOX1. 60
Figure 17 : Le complexe NOX3. 61
Figure 18 : Le complexe NOX4. 62
Figure 19 : Le complexe NOX5. 63
Figure 20 : Les complexes DUOX1/2. 64
Figure 21 : Héterogénéité dans la formation des complexes oxydases. 65
Figure 22 : Hématopoïèse. 70
Figure 23 : Evolution de l'expression des marqueurs de surfaces au cours de l'hématopoïèse. (Bryder et al., 2006) 77
Figure 24 : La niche hématopoïétique (Graf and Trumpp 2007) 81
Figure 25 : Interactions au sein de la niche hématopoïétique (Graf and Trumpp 2007) 82
Figure 26 : Les niches hématopoïétiques de la moelle osseuse. 85
Figure 27 : Influence des ROS sur l'auto-renouvellement des CSH 88
Figure 28 : La phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. 97

Figure 29 : Corrélation entre l'expression du CD34, le nombre de mitochondries 99
Figure 30 : Rôle des mitochondries dans le maintien du caractère souche. 100
Figure 31 : Hypothèse sur la ségrégation asymétrique des mitochondries lors de la division asymétrique des CSH. 102
Figure 32 : Hypothèse du rôle des NOX dans le devenir de la CSH 106
Figure 33 : Production de ROS mitochondriale. 107
Figure 34 : Cross-talk entre ROS issus des mitochondries et des NOX. 109
Figure 35 : Cross-talk des aspects métaboliques et oxydatifs. 110
Figure 36: Modélisation de l'activité NADPH oxydase constitutive des cellules leucémiques qui produit des ROS favorisant leur prolifération. 196
Figure 37 : Modèle de contrôle des ROS dans les cellules leucémiques 198

Article 1, Figure 1 : NADPH oxidases expression in AML cell lines 141
Article 1, Figure 2 : Nox2 complex expression in AML cell lines 143
Article 1, Figure 3 : Effects of oxidases modulation on ROS production by AML cell lines 145
Article 1, Figure 4 : Effects of oxidases modulation on intracellular ROS level in AML cell lines 147
Article 1, Figure 5 : Effect of oxidases inhibition on Nrf21 sub-cellular localization..... 149
Article 1, Figure 6 : Effect of oxidases inhibition on the number of viable AML cells 151
Article 1, Figure 7 : Effect of oxidases inhibition on the viability and cell-cycle phases distribution 153
Article 1, Figure 8 : Effect of oxidases inhibition on the number of mitoses. 155

Article 2, Figure 1: Différence d'activation de PLA2c (Ser505)..... 177
Article 2, Figure 2: Analyse de la composition en acides gras des leucémies FLA2 et FLB1 179
Article 2, Figure 3: Différence de colocalisation de NOX2 et $p67^{phox}$ dans les leucémies FLA2 et FLB1..... 181
Article 2, Figure 4: Analyse de la production de ROS des moelles de souris FLA2 et FLB1 183
Article 2, Figure 5: Etat d'activation des oxydases dans les leucémies FLA2 et FLB1..... 185
Article 2, Figure 6: Expression des sous-unités du complexe oxydase phagocytaire. 187

Liste des abréviations

AA	Acide Arachidonique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AG	Acide Gras
AIR	Auto-Inhibitory Region
ALDH	Aldehyde Dehydrogenase
AMP	Adénosine Monophosphate
AMPK	Adénosine Monophosphate kinase
ARN	Acide Ribonucléique
Atg7	Autophagy related protein 7
ATP	Adénosine Triphosphate
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCR-ABL	Philadelphie Translocation
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovin Serum Albumin
$CaCl_2$	Calcium chloride
CAT	Catalase
CFC	Colony Forming Cell
CFU	Colony Forming Unit
CFU-F	CFU-Fibroblasts
CFU-GEMM	CFU-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte, Megacaryocyte
CFU-S	CFU in the spleen
CGD	Chronic Granulomatous Deases
cPLA2	cytosolic Phospholipase A2
CRU	Competitive Repopulation Unit
CSF	Colony Stimulating Factor
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CSL	Cellule Souche Leucémique
CSM	Cellule Souche Mésenchymateuse
CXCL12	SDF1, Stromal Cell Derived Factor 1
CXCR4	CD4, SDF1 receptor

CYBA	Cytochrom b245A
CYBB	Cytochrom b245B
DCF	2,7-dichlorodihydrofluorescein
DCF-DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DPI	Diphenylene Iodonium
DUOX	Dual Oxydase
EPO	Erythropoïétine
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FAB	French-American-British
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Isothiocyanate de fluoresceine
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FoxO	ForKhead box O
FRET	Transfert d'énergie de fluorescence
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine nucleotid Exchange Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GPx	Glutathion Peroxydase
GR	Glutathion Reductase
GTP	Guanosine Triphosphate
HEK	Human Embryonic Kidney
HLA-DR	Antigène HLA
HPP-CFU	High Proliferation Potential-CFU
IDH	Isocitrate Dehydrogenase
IL	InterLeukine
INT	IodoNitroTetrazolium
IRIC	Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Montréal
JAK	Janus Kinase
KLS	$cKit^+$ Lin^- $Sca\text{-}1^+$
KO	Knock out

LAM	Leucémie aiguë Myéloïde
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
Lin	Lineage
Lkb1	Liver Kinase B1
LTC-IC	Long Term Culture-Initiating Cell
LTRA	Long Term Repopulating Ability
LT-SRC	Long Term SCID Repopulation Cell
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MgCL2	Magnesium chloride
MMP	Matrix Metalloproteins
MPO	Myéloperoxydase
MRA	Marrow Repopulating Ability
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
NAC	N-acetyl cystein
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Déhydrogénase
NCF	Neutrophile Cytosolic Factor
NK	Natural Killer
NOD/SCID	Non Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency
NOX	NADPH Oxydase
NOXA	NOX Assembly protein
NOXO	NOX Organisation protein
PARP	PolyADP Ribose Polymerase
PB1	Domaine d'interaction protéine/protéine
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Phycoérythrine
Phox	Phagocyte Oxydase
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbol myristate acetate
pO2	Pression partielle en Oxygène
PPAR	Recepteur activé par les proliférateurs des péroxysomes

PPR	Pentatricopeptide repeat
PRR	Pattern recognition receptor
PTH	Hormone Para-Thyroïdienne
PX	Phosphoinositide binding domain
ROS	Reactiv Oxygen Specie
Sca-1	Stem Cell Antigen-1
SCF	Stem Cell Factor
SH3	SRC homology 3 domain
shARN	Small Hairpin ARN
siARN	Small interferancy ARN
SOD	Superoxyde Dismutase
SRC	SCID Repopulating Cell
STAT	Signal Transducers And Activators of Transcription
ST-LRC	Short term-Leukemia reconstituting cell
SVF	Sérum de Veau Foetal
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TPO	Thrombopoïétine
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
VLA-4	Very Late Antigen 4

Introduction générale, objectifs

L'hématopoïèse normale est le processus physiologique qui permet la production des cellules hématopoïétiques matures nécessaires à la production des cellules sanguines de chaque individu durant toute sa vie. Ce processus nécessite deux impératifs : la conservation d'un stock de cellules souches, et la production de cellules matures rejoignant la circulation sanguine pour exercer leurs fonctions spécifiques (transport d'oxygène, défense immunitaire, coagulation…). La cellule souche hématopoïétique (CSH) est donc le point clé de l'hématopoïèse. C'est à son niveau que se joue la régulation de la balance entre auto-renouvellement et production de cellules matures. Les CSH majoritairement quiescentes ont la capacité de s'auto-renouveler ce qui permet de conserver un stock constant de CSH. Lors de divisions asymétriques elles ont la capacité de générer deux cellules filles aux avenirs différents. L'une restera une cellule souche, l'autre va entrer en différenciation. Le résultat de cette asymétrie permet de ne pas appauvrir le pool de CSH et d'obtenir une cellule qui va générer des progéniteurs hématopoïétiques, puis des précuseurs hématopoïétiques et aboutir aux cellules fonctionnelles du sang (Metcalf, 2007; Osawa et al., 1996a).

Ces dernières années, l'étude des espèces réactives de l'oxygène (ROS) a fait émerger leur rôle fondamental de seconds messagers mis en œuvre dans la signalisation cellulaire. Il est devenu clair que l'homéostasie des ROS résultant d'un équilibre dynamique entre leur production et leur élimination finement régulée est un facteur crucial du contrôle de l'auto-renouvellement, de la prolifération, de la progression dans le cycle cellulaire, la différenciation ou la mort cellulaire. Ces observations sont à l'origine de nombreux travaux permettant des progrès majeurs dans la compréhension de l'hématopoïèse. Il est aujourd'hui admis que les CSH présentent un faible niveau intracellulaire de ROS nécessaire à leur maintien et favorisant leur auto-renouvellement (Ito et al., 2004; Tothova et al., 2007). A l'inverse, un niveau de ROS plus élevé est observé dans les cellules engagées en différenciation. Ces ROS sont produits en réponse aux cytokines et facteurs de croissance et favorisent la différenciation et la prolifération (Sattler et al., 1999). L'importance des mécanismes anti-oxydants pour le maintien des CSH et de leurs caractéristiques a été rapidement mis en évidence, avec notamment la démonstration d'un rôle de la catalase dans le maintien des CSH dans un système de culture à long terme (Gupta et al., 2006) et le rôle de la glutathion peroxydase 3 (GPx3) dans l'auto-renouvellement in vivo des CSH murines (Herault et al., 2012). Le versant pro-oxydant a été moins étudié. Cependant il a été mis en évidence que des ROS issus des NADPH oxydases sont impliqués dans la différenciation des cellules hématopoïétiques. Surtout, il a été proposé qu'une activité oxydase faible dans la

CSH pourrait augmenter spontanément au cours de l'hématopoïèse en parallèle à l'action des cytokines et facteurs de croissance et contribuer à l'augmentation globale du niveau de ROS (Piccoli et al., 2005).

En parallèle, l'étude des leucémies a mis en évidence une hématopoïèse leucémique qui mime l'hématopoïèse normale à partir de cellules souches leucémiques (CSL) (Bonnet and Dick, 1997; Clarke et al., 2006; Jordan et al., 2006; Lapidot et al., 1994; Wicha et al., 2006). Il a été mis en évidence que les cellules cancéreuses possèdent des mécanismes comme la résistance à l'apoptose, l'activation des signaux de survie, la résistance au stress oxydatif qui leur permet une résistance aux chimiothérapies et radiothérapies. De plus, les CSL, majoritairement quiescentes sont peu sensibles aux thérapies conventionnelles et sont responsables de fréquentes rechutes résistantes aux traitements (Ishikawa et al., 2007). Dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), l'hématopoïèse leucémique prend le dessus sur l'hématopoïèse normale. Cela se traduit dans la moelle osseuse par une prolifération de cellules bloquées dans leur différenciation qui l'envahissent rapidement. A l'image de l'hématopoïèse normale, l'influence des ROS sur l'hématopoïèse leucémique présente un intérêt d'étude croissant. Il a en effet été mis en évidence que les CSL présentent un niveau de ROS plus faible que les blastes. De plus, une surexpression de l'enzyme antioxydante GPx3 est observée dans les cellules souches leucémiques dans des modèles murins celle-ci étant indispensable à leur survie *in vivo* et concomitante d'un plus faible niveau de ROS et d'une moins grande activation de l'axe p38MAPK inhibiteur d'auto-renouvellement (Herault et al., 2012; Trost et al., 2012). Ces résultats renforcés par la mise en évidence d'un rôle de la niche hématopoïétique contrôlant l'axe GPx3/ROS/p38MAPK, le contact CSM/cellule leucémique étant responsable d'une diminution du niveau de ROS des cellules leucémiques, d'une surexpression de GPx3 et d'une moins grande activation de p38MAPK (Vignon et al., 2010). Ces données mettent donc en lumière la mise en place d'une stratégie antioxydante des CSL favorable à leur auto-renouvellement.

Le niveau de ROS dans les cellules leucémiques étant la résultante de leur production et de leur élimination, l'analyse de la production de ROS dans la population leucémique apparait importante. Les ROS sont produits prioritairement par la chaîne respiratoire mitochondriale et par les NADPH oxydases. Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes intéressés aux NADPH oxydases dans les cellules leucémiques. L'activité de ces enzymes décrites dans les cellules hématopoïétiques normales pourrait avoir des conséquences sur la physiopathologie des LAM. Il est possible d'émettre l'hypothèse qu'une moins grande

activité oxydase dans les CSL favoriserait leur auto-renouvellement alors qu'une activation dans les blastes pourrait renforcer leur capacité prolifération.

L'objectif de ce travail est donc d'évaluer l'influence de l'activité NADPH oxydase en s'intéressant à la fois aux cellules blastiques et aux CSL. Pour cela, une première partie de l'étude repose sur la caractérisation de l'activité oxydase de différentes leucémies humaines (lignées continues). L'analyse de l'expression des oxydases et de leur contribution à la production et au niveau de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans ces cellules permet d'envisager leur influence sur des processus clés de la leucémogénèse. L'étude de lignées leucémique est considérée ici comme un modèle de leucoblastes à différents niveaux de différenciation reflétés par leur classification FAB (French American British). Dans une seconde partie, la comparaison de leucémies murines primaires ayant des fréquences en CSL bien caractérisées (FLA2 : 70% et FLB1 <1%) (Wilhelm et al., 2011) permet d'appréhender l'influence de l'activité oxydase sur le potentiel souche des cellules de LAM. Dans ce cadre, une comparaison de l'activation et de la production de ROS par les oxydases des deux leucémies permettra de vérifier cette hypothèse.

Le présent manuscrit comporte ainsi en première partie une revue bibliographique descriptive de la famille des oxydases et de l'influence des ROS sur l'hématopoïèse normale et leucémique mettant en lumière l'intérêt de l'étude de l'activité oxydase dans la population hétérogène des LAM. Cette partie est complétée par un dernier chapitre qui offre une vision plus globale des mécanismes de régulation de l'hématopoïèse où les aspects oxydatifs développés au cours de cette thèse pourraient être croisés et complémentaires des aspects métaboliques décrits dans la littérature.

La seconde partie du manuscrit repose sur l'exposé des travaux expérimentaux effectués au cours de cette étude descriptive de l'activité NADPH oxydase des leucémies aiguës myéloïdes. Elle comprend un premier chapitre sur l'étude des lignées leucémiques humaines (modèles de leucoblastes) très largement utilisé dans le monde, et un second chapitre sur l'étude *in vivo* de leucémies murines primaires visant à caractériser les CSL.

Première partie
La famille des NADPH oxydases et l'hématopoïèse normale et leucémique

Chapitre 1 : La famille des NADPH oxydases

1. Historique : du "burst oxydatif" à la famille des NADPH oxydases

L'histoire des Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate (NADPH) oxydases a commencé bien avant leur identification par l'observation d'un « burst oxydatif » ou flambée oxydative dans différents types cellulaires. Dès la première moitié du vingtième siècle ce phénomène a été décrit dans les œufs d'oursins, puis les phagocytes et les spermatocytes. Suite à ces observations préliminaires le burst oxydatif a été étudiée plus en détail. Rapidement, l'influence du métabolisme du glucose comme source d'énergie et surtout une production de peroxyde d'hydrogène ont été mises en évidence. En 1964, Rossi and Zatti identifient une NADPH oxydase à l'origine de ce phénomène (Bedard and Krause, 2007). En parallèle la recherche clinique a aussi contribué à l'identification des oxydases. La découverte de la granulomatose septique chronique (Chronic Granulomatous Disease, CGD) a permis une avancée considérable (Berendes et al., 1957; Stasia, 2007; Stasia et al., 2009). Ce syndrome rare a été décrit chez de jeunes garçons atteints d'affections pyogènes récurrentes accompagnées de réactions granulomateuses, lymphadénopathies et hypergammaglobulinémies. La comparaison des phagocytes de patients atteints et de sujets sains à mis en évidence une différence fondamentale : la diminution de leur capacité bactéricide corrélée à l'absence de burst oxydatif. Les autres fonctions des phagocytes (chemotaxie, phagocytose, dégranulation) ne sont elles pas altérées dans les cas de CGD.

La CGD a ainsi été utilisée comme modèle pour l'étude du burst oxydatif. L'étude des phagocytes sous l'angle de la production des ROS a mis en évidence différents points clés. Le substrat de ce phénomène est le NADPH. Son produit est l'anion superoxyde transformé en aval en peroxyde d'hydrogène. Cette production de ROS n'est pas liée à la myéloperoxydase (MPO) ou à la mitochondrie car elle n'est pas sensible au cyanure. Ce burst oxydatif est observé dans les phagocytes des sujets sains, et des sujets présentant un déficit en MPO. Par contre il n'existe pas chez les sujets atteints de CGD. La comparaison des phagocytes sains et des phagocytes pathologiques a donc été un outil puissant pour identifier l'enzyme responsable de ce processus. En 1978, Segal et Jones ont identifié un composant membranaire faisant défaut dans les leucocytes de nombreux patients atteints de CGD : le cytochrome b_{558} (Segal et al., 1978). Ensuite Royer-Pokora et al. et Teahan et al. ont cloné le gène codant pour

la sous-unité membranaire catalytique de la NADPH oxydase du phagocyte gp91^{phox} (Royer-Pokora et al., 1986; Teahan et al., 1987). La sous-unité membranaire p22^{phox} a rapidement été identifiée comme le second acteur du cytochrome b_{558}. Par la suite, l'utilisation de systèmes acellulaires utilisant des fractions membranaires et des fractions cytosoliques purifiées a permis l'étude des mécanismes d'activation et de régulation du processus de flambée oxydative dans le phagocyte. Des sous-unités régulatrices cytosoliques ont alors été mises en évidence. Les sous-unités p47^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} ont été associées au complexe NADPH oxydase phagocytaire.

Le complexe NADPH oxydase phagocytaire est considéré comme le modèle historique des systèmes enzymatiques oxydases. Mais l'observation de la production de ROS de cellules non phagocytaires a fait émerger l'hypothèse de l'existence de systèmes homologues dans d'autres types cellulaires. Par exemple dans les fibroblastes où la production de ROS n'est pas modifiée chez les patients atteints de CGD avec absence de la sous-unité catalytique phagocytaire. L'existence de tels systèmes a également été proposée dans différentes cellules cancéreuses et dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis la recherche d'homologues des composants de l'oxydase phagocytaire par homologie de séquence. Différents homologues de gp91^{phox} ont rapidement été décrits. Ces découvertes ont conduit à mettre en place une nouvelle terminologie dans laquelle la sous-unité catalytique phagocytaire gp91phox est appelée NOX2. Les isoformes NOX1, NOX3, NOX4 et NOX5 ont rapidement été clonées. De la même façon DUOX1 et DUOX2 ont ensuite été ajoutés à cette nouvelle famille des NADPH oxydases. La découverte de chaque isoforme protéique a logiquement été suivie de tests fonctionnels. Pour certaines isoformes, la transfection spécifique n'a pas donné lieu à une activité fonctionnelle avec les sous-unités cytosoliques régulatrices classiques. La recherche d'homologues de p47phox et p67phox a permis de mettre en évidence NOXO1 et NOXA1 qui confèrent la fonctionnalité aux isoformes non fonctionnelles seules ou avec les sous-unités régulatrices classiques.

La famille des NADPH oxydases est donc actuellement constituée de 7 isoformes de sous-unités catalytiques membranaires (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, DUOX2) et d'un ensemble de sous-unités régulatrices (p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, NOXA1, NOXO1).

2. Les composants de la famille des oxydases

2.1. Les fonctions et structures communes des oxydases

Les NADPH oxydases sont des complexes multiprotéiques. Ces enzymes ont pour rôle le transfert d'électrons du NADPH intracellulaire vers l'oxygène extracellulaire à travers la membrane plasmique. Elles se composent d'une sous-unité catalytique membranaire par laquelle transitent les électrons. La famille des oxydases comporte actuellement 7 membres qui ont été découverts par leur très grande homologie de séquence avec NOX2. Chaque isoforme comporte *a minima* les domaines clés de l'activité oxydase : sites de liaison au NADPH et FAD, site de liaisons des hèmes internes et externes (Figure 1). La majorité des isoformes catalytiques (NOX1, NOX2, NOX3 et NOX4) requière une association avec $p22^{phox}$ pour être fonctionnelles et stabilisées. Certaines isoformes (NOX1, NOX2 et NOX3) nécessitent aussi le recrutement de sous-unités régulatrices cytosoliques. On distingue les sous-unités régulatrices à rôle d'organisation et celles à rôle d'activation. Les sous-unités $p47^{phox}$ et NOXO1 sont des sous-unités organisatrices. Elles ont une très forte homologie et permettent l'assemblage des complexes par leur forte affinité pour $p22^{phox}$. De plus elles interagissent avec $p67^{phox}$ et NOXA1, les sous-unités activatrices pour les adresser à la membrane plasmique. Au contraire, certains complexes oxydases (NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2) ne nécessitent pas de sous-unités régulatrices. Enfin les sous-unités catalytiques NOX5 et DUOX sont fonctionnelles par elles mêmes sans sous-unités régulatrices car elles possédent leurs propres systèmes de régulation.

La fonction de transfert d'électron est supportée par la sous-unité catalytique (Figure 2). L'appartenance à la famille des NADPH oxydases repose historiquement sur une forte homologie avec la phagocyte oxydase NOX2. Elle nécessite *a minima*, la présence de sites de fixation du NADPH et du FAD et de domaines de fixation pour deux groupements hèmes.
Le transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène se fait par étapes. Dans un premier temps deux électrons sont transférés du NADPH vers le co-enzyme FAD qui se trouve alors réduit en $FADH_2$. Ces électrons vont alors réduire l'hème interne qui va à son tour réduire l'hème externe. C'est l'hème externe qui transfère un électron à l'oxygène moléculaire formant ainsi un anion superoxyde très réactif. Les réactions d'oxydo-réduction impliquées entre les hèmes puis vers l'oxygène n'impliquent qu'un seul électron. Le $FADH_2$ réduit cède donc ses deux électrons séquentiellement, mais le bilan final reste de deux anions superoxydes produits pour une molécule de NADPH oxydée (Figure 2). Lors de ce transfert d'électrons on peut

distinguer l'activité diaphorase qui correspond au transfert des électrons jusqu'au FAD. Cette activité propre aux sous-unités catalytiques ne fait pas intervenir les sous-unités cytosoliques régulatrices, cependant $p67^{phox}$ et Rac semblent la favoriser (Han et al., 2001). Pour distinguer cette activité diaphorase, il est possible de court-circuiter la suite de l'activité oxydase en utilisant le iodonitrotetrazolium (IDNT) qui devient l'accepteur final d'électrons et forme un produit dosable en spectrophotométrie.

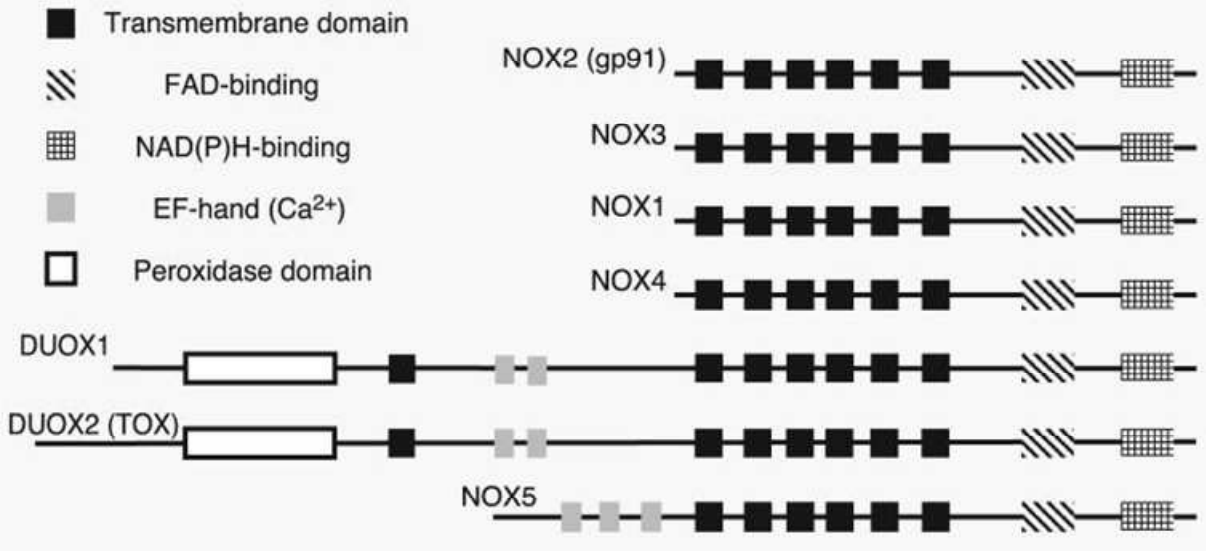


Figure 1 : La famille des NADPH oxydases.

Les composants de la famille des oxydases ont été découverts par homologie de séquence avec NOX2. L'étude prédictive de leurs séquences recense *a minima* les domaines clés de fixation du NADPH, du FAD et 6 domaines transmembranaires. Certaines isoformes possèdent en plus des domaines de régulation par le calcium. Les DUOX se différencient par la présence d'un domaine transmembranaire supplémentaire peroxydase like. (Cross and Segal, 2004)

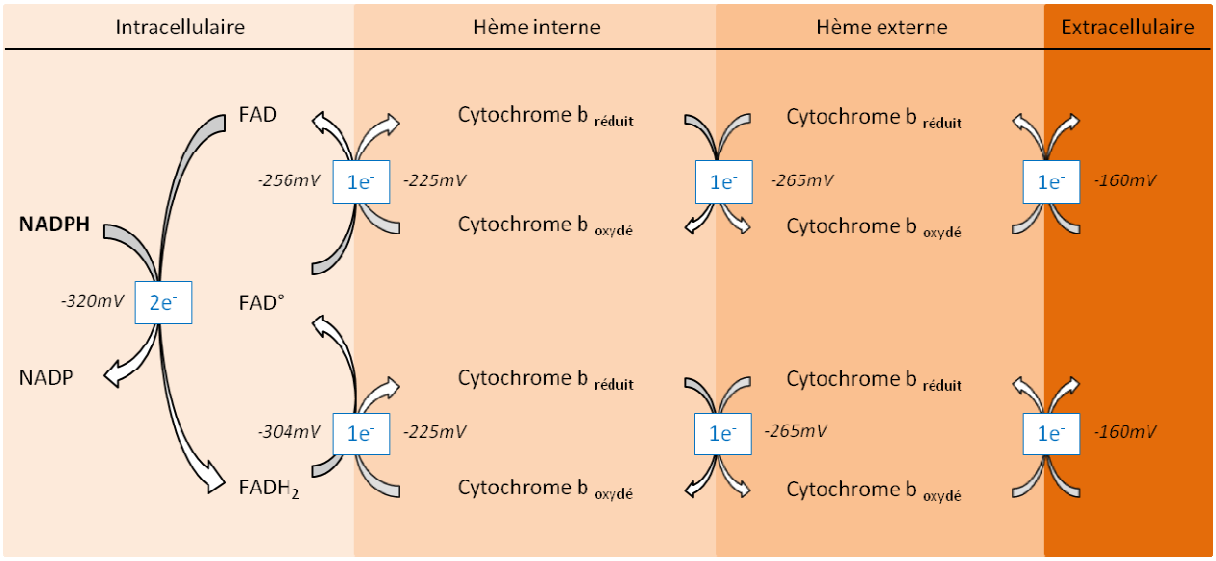


Figure 2 : Transfert d'électrons par les oxydases.

Deux électrons sont transférés du NADPH vers l'oxygène en 7 étapes. Les électrons sont transférés ensemble au FAD, puis un à un via l'hème externe puis l'hème interne vers l'oxygène. La réaction intracellulaire de transfert d'électrons au FAD correspond à l'activité diaphorase. (d'après (Cross and Segal, 2004))

2.2. Les sous-unités catalytiques membranaires

2.2.1. NOX2

La sous-unité catalytique de la phagocyte oxydase gp91^{phox}, ou NOX2 est codée par le gène *CYBB* (*Cytochrom B-245 Beta Polypeptide*, *NOX2*, *GP91^{phox}*) localisé sur le chromosome X au locus Xp21.1 (Figure 4) (Royer-Pokora et al., 1986). C'est une glycoprotéine de 570 acides aminés (65,3kDa). Les N-glycosylations portent sur les asparagines (Asn^{132}, Asn^{149}, Asn^{240}) dans le neutrophile humain (Harper et al., 1985; Wallach and Segal, 1997). NOX2 est synthétisé sous forme d'un précurseur gp65 contenant des chaînes latérales riches en mannoses (Porter et al., 1994). L'association de NOX2 avec p22^{phox} favorise sa glycosylation. La forme mature de NOX2 est riche en N-acetyl glucosamine et galactose et comporte aussi des mannoses, fructoses et xyloses (Harper et al., 1985). La glycosylation a été décrite comme un protecteur de la protéine contre la dégradation mais n'est pas nécessaire pour sa fonction (Paclet et al., 2001).

D'après le modèle proposé par Paclet et al. NOX2 contient six hélices alpha transmembranaires (Figure 3) (Paclet et al., 2004). Les extrémités N et C-terminales sont

intracellulaires (Burritt et al., 2003; Imajoh-Ohmi et al., 1992; Moskwa et al., 2004; Nakamura et al., 1987; Teahan et al., 1987) impliquant trois boucles extracellulaires et deux boucles cytosoliques (Figure 3). Les sites de glycosylation sont portés par les boucles extracellulaires 2 et 3 (Wallach and Segal, 1997).

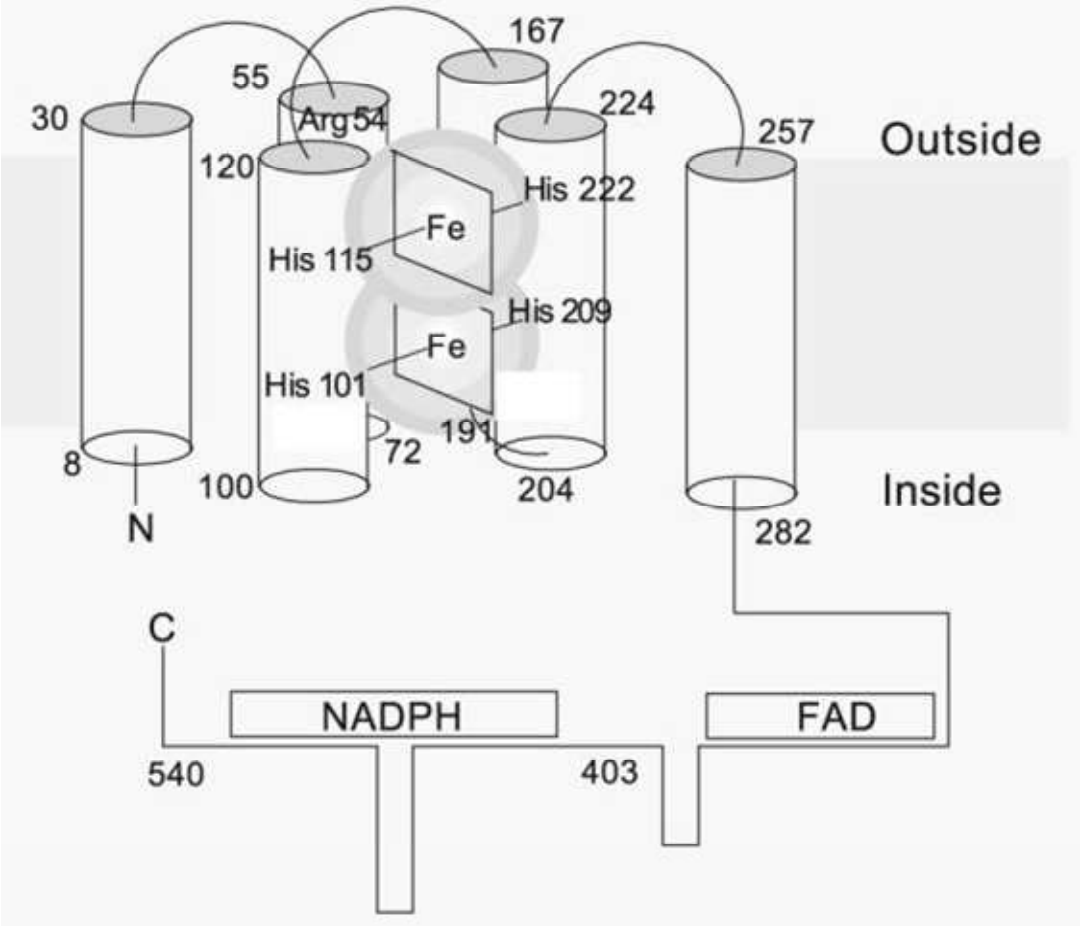


Figure 3 : Conformation de NOX2.

La protéine NOX2 contient 6 domaines transmembranaires. Les histidines[101, 115, 209, 222] ont un rôle important pour la fixation des hèmes internes et externes. La partie C-terminale intracellulaire porte les sites de liaison au FAD et au NADPH nécessaire à l'activité de transfert d'électrons. (Cross and Segal, 2004)

NOX2 est un acteur essentiel du système immunitaire. Il y contribue par sa forte production de ROS dirigée contre le pathogène après la phagocytose que par la capacité de ces ROS à déclencher les réponses inflammatoires et immunitaires (Rada et al., 2008). Les phagocytes sont donc les cellules l'exprimant le plus. Mais son expression a été retrouvée à des niveaux plus faibles dans les cellules du système nerveux central, les cellules

endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cardiomyocytes, les cellules musculaires squelettiques et les cellules souches hématopoïétiques (Bedard and Krause, 2007) (Figure 4).

Dans les neutrophiles, NOX2 se trouve à la membrane des phagosomes. On l'observe aussi au bord supérieur des lamellipodes dans des caveoles des cellules endothéliales (Ushio-Fukai, 2006). On le trouve aussi dans des cellules non phagocytaires, au niveau des endosomes (Li et al., 2006; Li et al., 2008; Mumbengegwi et al., 2008; Oakley et al., 2009; Ushio-Fukai, 2006). Lors de la transfection de *NOX2* dans des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) ne l'exprimant pas à l'origine, NOX2 se trouve à la membrane plasmique.

2.2.2. NOX1

NOX1 est le premier homologue de NOX2 découvert à partir d'une banque d'ADNc de cellules épithéliales de colon (Suh et al., 1999). La sous-unité NOX1 est codée par le gène *NOX1* (*NADPH Oxidase 1, MOX1, NOH1, GP91-2, Mitogenic Oxidase 1*) localisé sur le chromosome X au locus Xq22.1 (Figure 5) (Bánfi et al., 2000b). C'est une protéine de 564 acides aminés identique à 56% à NOX2 qui ne semble pas glycosylée. Elle contient six hélices alpha transmembranaire avec les extrémités N et C-terminales en intracellulaire. Elle a conservé les domaines de liaison aux flavines et nucléotides à pyridine ainsi que les histidines impliquées dans la liaison des groupements hèmes (Kikuchi et al., 2000). NOX1 est surtout exprimé dans l'épithélium colique (Rokutan et al., 2008). On le trouve aussi dans les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, l'uterus, le placenta, la prostate, la rétine, les neurones, les astrocytes et la microglie (Figure 5).

Les fonctions principales de NOX1 sont la défense immunitaire et la prolifération dans le colon (Kawahara et al., 2005a; Kusumoto et al., 2005). Dans le tissu vasculaire, NOX1 a un rôle dans la régulation de la pression artérielle.

Différentes localisations de NOX1 ont été rapportées. NOX1 est observé dans le noyau, dans le cytoplasme (Brodsky et al., 2004) et à la membrane plasmique dans les keratinocytes (Helmcke et al., 2009; Hilenski et al., 2004).

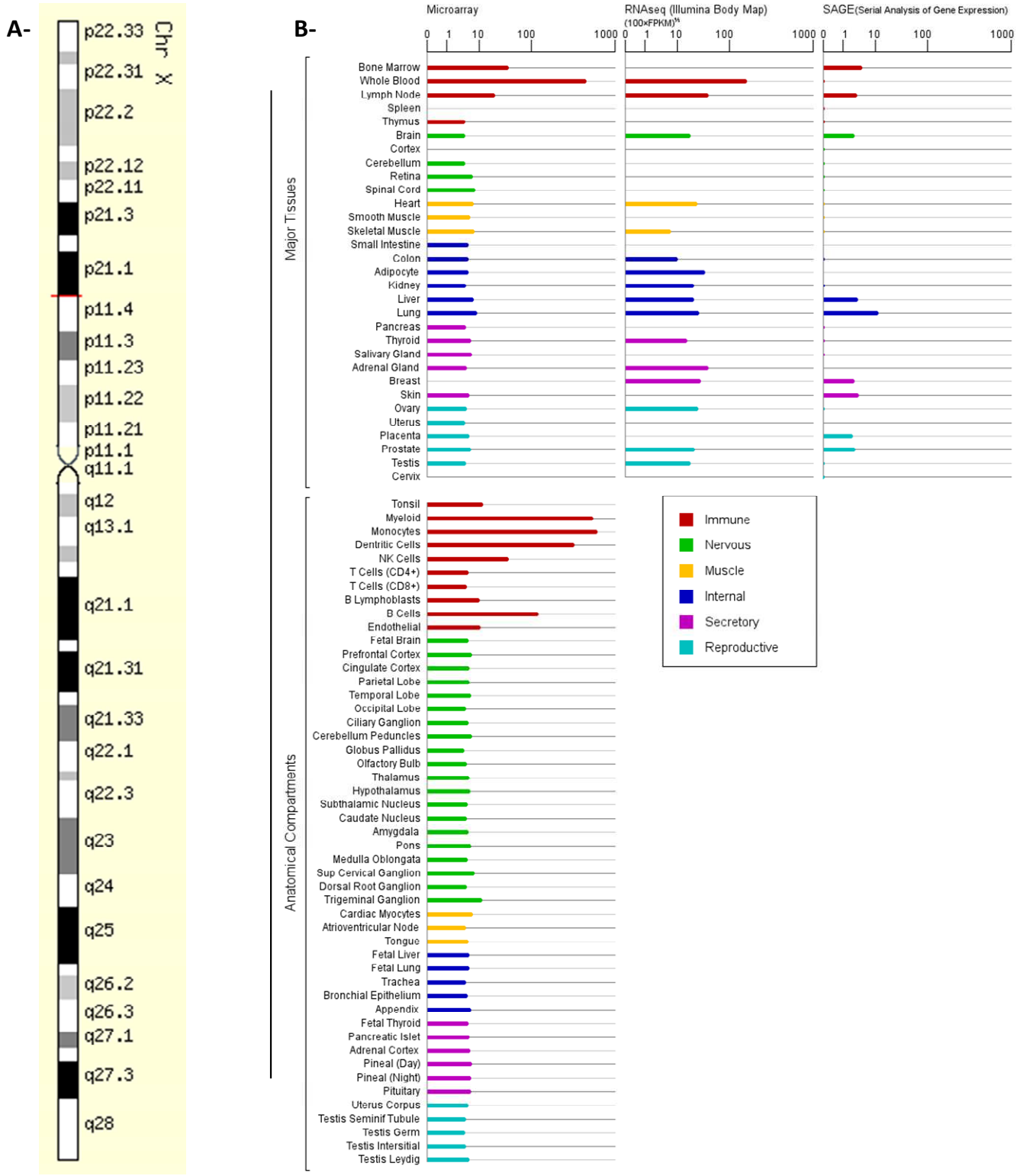


Figure 4 : NOX2.

A- Le gène codant pour NOX2 est localisé sur le bras court du chromosome X.

B- B- L'analyse d'expression de l'ARN de *NOX2* en Microarray, Illumina Body Map et Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) dans différents tissus et compartiments représentatifs de l'organisme montre une expression majoritaire dans le compartiment immunitaire. (www.genecards.org)

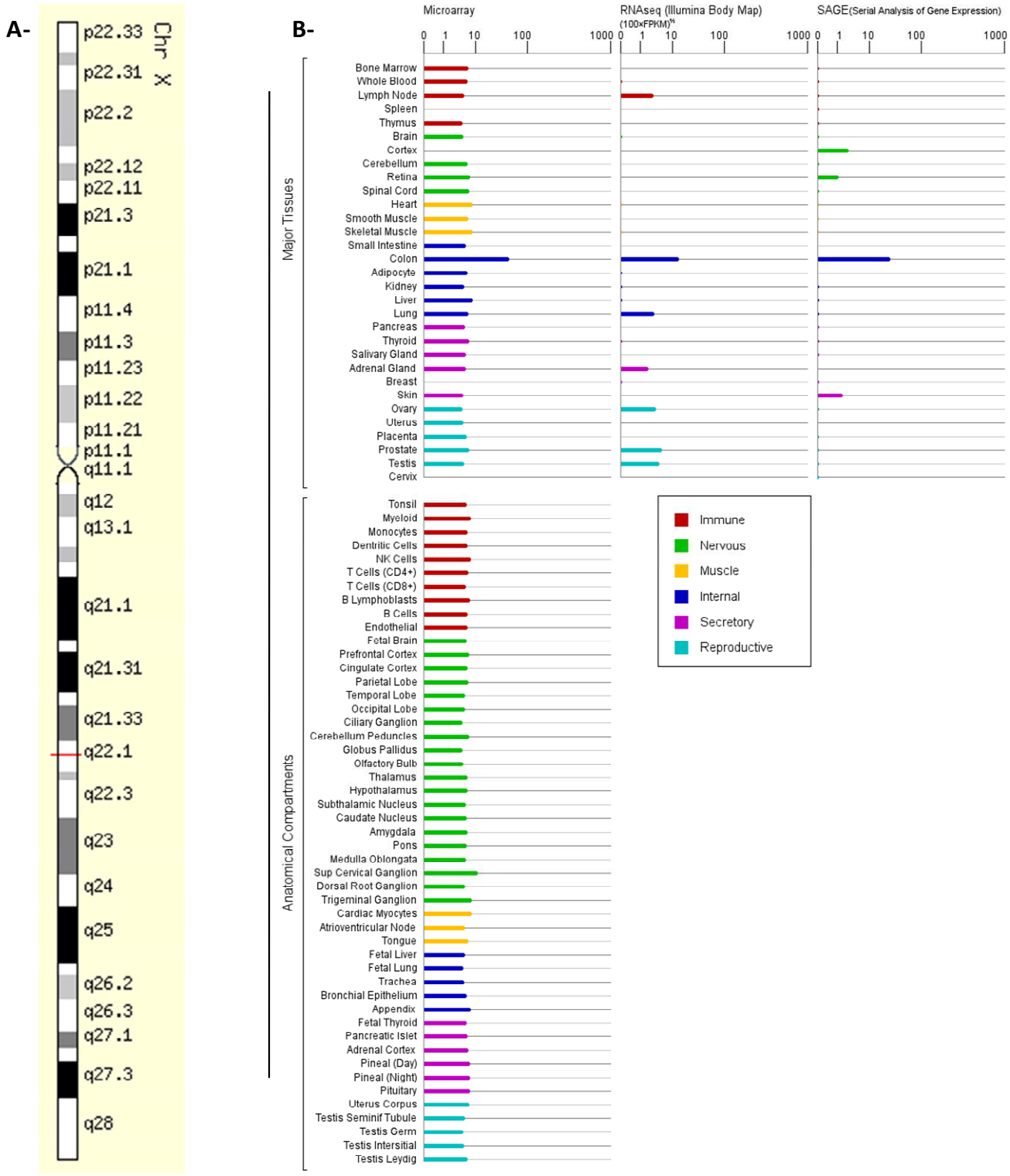


Figure 5 : NOX1

A- Le gène codant pour NOX1 est localisé sur le bras long du chromosome X.

B- L'analyse d'expression de l'ARN de *NOX1* en Microarray, Illumina Body Map et Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) dans différents tissus et compartiments représentatifs de l'organisme montre une expression majoritaire dans le colon (www.genecards.org).

2.2.3. NOX3

NOX3 est un homologue de NOX2 découvert en 2000 (Bánfi et al., 2000a). La sous-unité NOX3 est codée par le gène *NOX3* (*NADPH oxidase 3, MOX2, GP91-3*) localisé sur le chromosome 6 au locus 6q25.3 (Figure 6). C'est une protéine de 566 acides aminés identique à 58% à NOX2. Elle est retrouvée dans de nombreux tissus fœtaux. Elle a conservé les six domaines transmembranaires avec ses deux extrémités cytosoliques. Les sites de liaison aux flavines, aux nucléotides à pyrine et les histidines de liaison des hèmes sont également conservés (Kikuchi et al., 2000). NOX3 est surtout observé dans l'oreille interne, et contribue aux fonctions d'équilibre (Nakano et al., 2008). NOX3 a aussi été détecté dans le foie, les reins, les poumons et le squelette fœtal (Figure 6). Cela suppose que NOX3 jouerait un rôle dans le développement des tissus, puis serait éteint dans les tissus adultes (Bánfi et al., 2000a; Cheng et al., 2001).

La localisation des formes endogènes de NOX3 est peu connue. Il est cependant observé que lors de la coexpression de NOX3 et p22phox dans des cellules HEK293 ne les exprimant pas à l'origine, on observe les deux protéines à la membrane plasmique (Nakano et al., 2007). Par contre, en l'absence de $p22^{phox}$, on détecte NOX3 dans le cytoplasme.

2.2.4. NOX4

NOX4 est un homologue de NOX2 codé par le gène *NOX4* (*NADPH Oxidase 4, KOX, Kidney Oxidase*) localisé sur le chromosome 11 en 11q14.3 (Figure 7). C'est une protéine de 578 acides aminées et 39% d'homologie avec NOX2 qui conserve six hélices transmembranaires et les domaines importants des oxydases de liaison au FAD, NADPH et aux deux hèmes (Shiose et al., 2001) .

NOX4 est fortement exprimé dans le rein (Geiszt et al., 2000). On trouve son expression dans les cellules mésengiales (Gorin et al., 2003), mais également les cellules musculaires lisses (Hilenski et al., 2004), les cellules endothéliales (Ago et al., 2004), les fibroblastes (Cucoranu et al., 2005), les keratinocytes (Chamulitrat et al., 2004), les ostéoclastes (Yang et al., 2001), les neurones (Vallet et al., 2005), les hépatocytes (Carmona-Cuenca et al., 2006) (Figure 7).

NOX4 est souvent relié aux fonctions de croissance, de mort cellulaire et de différenciation. De plus un rôle de senseur du niveau d'oxygène est souvent proposé en raison de son activité constitutive dont la production de ROS directement corrélée à la pO_2 régulerait l'activation de signalisations selon ce dernier paramètre.

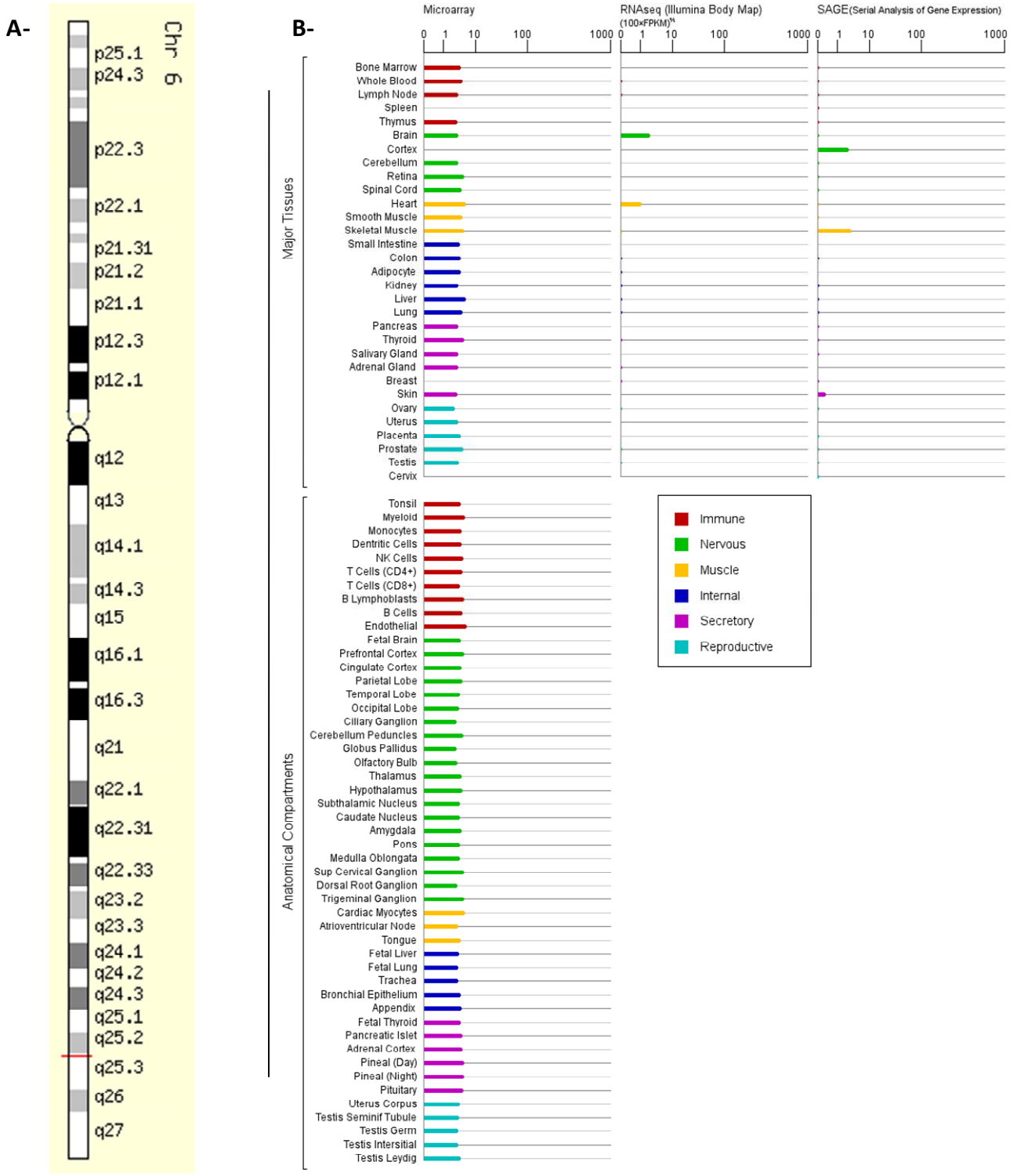


Figure 6 : NOX3

A- Le gène codant pour NOX3 est localisé sur le bras long du chromosome 6.

B- L'analyse d'expression de l'ARN de *NOX3* en Microarray, Illumina Body Map et Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) dans différents tissus et compartiments représentatifs de l'organisme montre une expression faible dans les tissus observés (www.genecards.org).

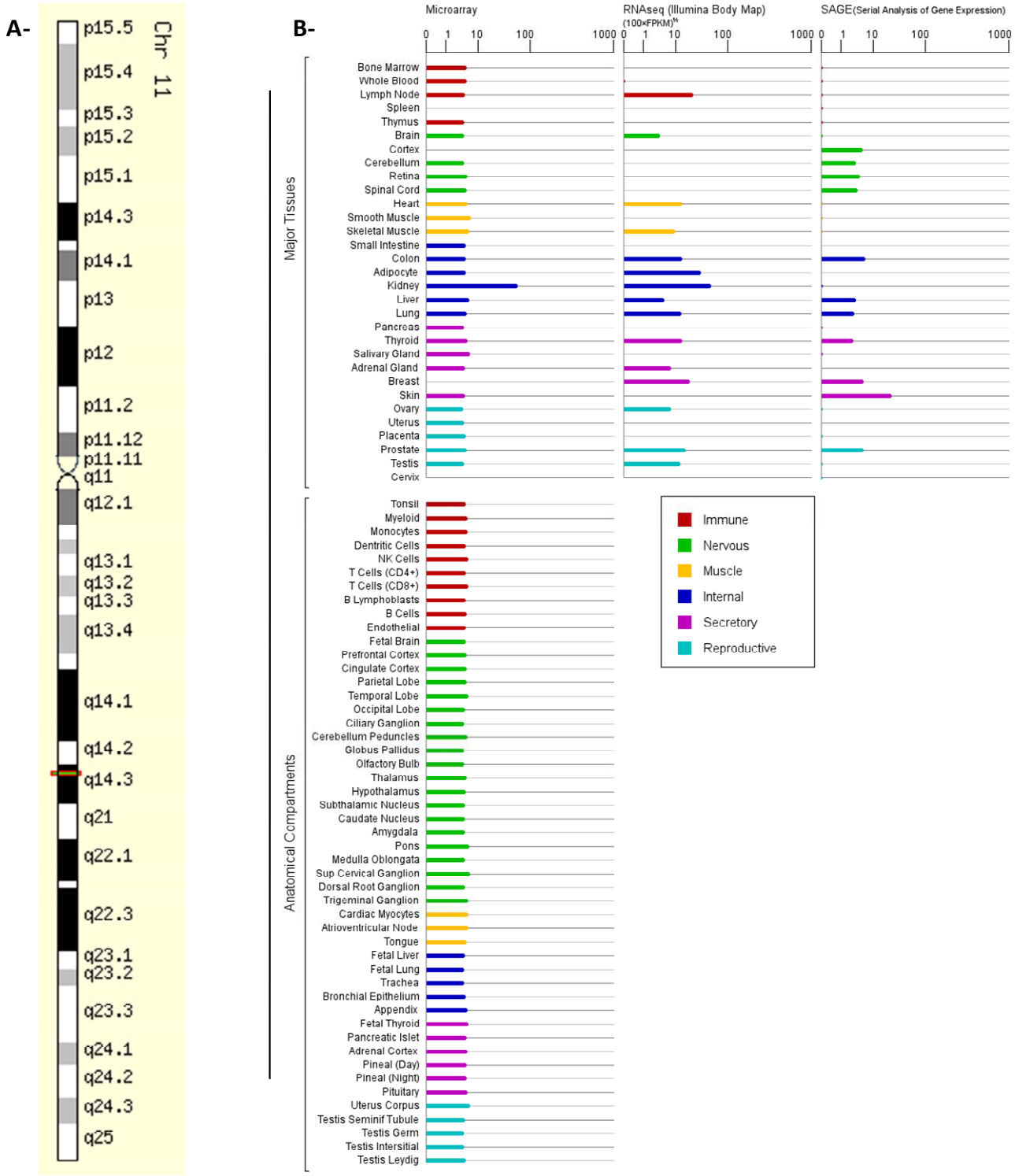


Figure 7 : NOX4

A- Le gène codant pour NOX4 est localisé sur le bras long du chromosome 11.

B- L'analyse d'expression de l'ARN de *NOX4* en Microarray, Illumina Body Map et Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) dans différents tissus et compartiments représentatifs de l'organisme montre une expression majoritaire dans le rein (www.genecards.org).

2.2.5. NOX5

NOX5 est codé par le gène *NOX5* (*NADPH Oxidase 5, NOX5A, NOX5B*) localisé sur le chromosome 15 en 15q23 (Figure 8). Il en existe plusieurs formes de 719 à 737 acides aminés. Les régions de liaison du NADPH, du FAD et de l'hème nécessaires à la fonction oxydase y sont présentes (Bánfi et al., 2001). Différentes isoformes longues de NOX5 ont été mises en évidences. Elles diffèrent pour leur partie N-terminale comportant des sites de liaison au calcium (Musset et al., 2012) ou domaines EF-hand. La structure de NOX5 possède 27% d'homologie avec NOX2.

NOX5 est exprimé dans le tissu lymphatique (BelAiba et al., 2007), le testicule (Bánfi et al., 2001), les cellules vasculaires musculaires lisses (Jay et al., 2008), les cellules endothéliales (BelAiba et al., 2007), le foie, l'uterus (Cheng et al., 2001) (Figure 8).

Son rôle est souvent proposé dans les processus de prolifération (BelAiba et al., 2007; Brar et al., 2003; Jay et al., 2008; Kamiguti et al., 2005; Krause, 2004; Si et al., 2007).

2.2.6. DUOX1 et DUOX2

Les DUOX ont été clonés à partir de glandes thyroïdes humaines et porcines (De Deken et al., 2000; Dupuy et al., 1999). Elles sont codées par les gènes *DUOX1* (*Dual Oxidase 1, THOX1, LNOX1, NOXEF1, Thyroid Oxidase 1*) (Figure 9) et *DUOX2* (*Dual Oxidase 2, THOX2, LNOX2, NOXEF2, Thyroid Oxidase 2*) (Figure 10), portés par le chromosome 15 au locus 15q21.1. Elles sont respectivement composées de 1551 et 1548 acides aminés. Elles comportent les domaines classiques de définition des oxydases complémenté par des domaines de fixation du calcium. Elles possèdent un septième domaine transmembranaire qui n'existe pas chez les autres oxydases. Leur appellation dual oxydase provient de la présence de ce domaine proche des peroxydases (Donkó et al., 2005). Une fonction de signalisation rapide *via* la création d'un gradient d'H_2O_2 dépendant des DUOX dans certains organes a été mise en évidence chez le poisson zèbre. Certains proposent que ce domaine peroxydase permettrait aux DUOX de former eux-mêmes de l'H_2O_2 (Ameziane-El-Hassani et al., 2005).

Les DUOX sont très exprimés dans la thyroïde, où leur production de ROS servirait à oxyder l'iode durant la synthèse d'hormones. Les DUOX sont aussi largement exprimés dans les épithéliums (Ris-Stalpers, 2006).

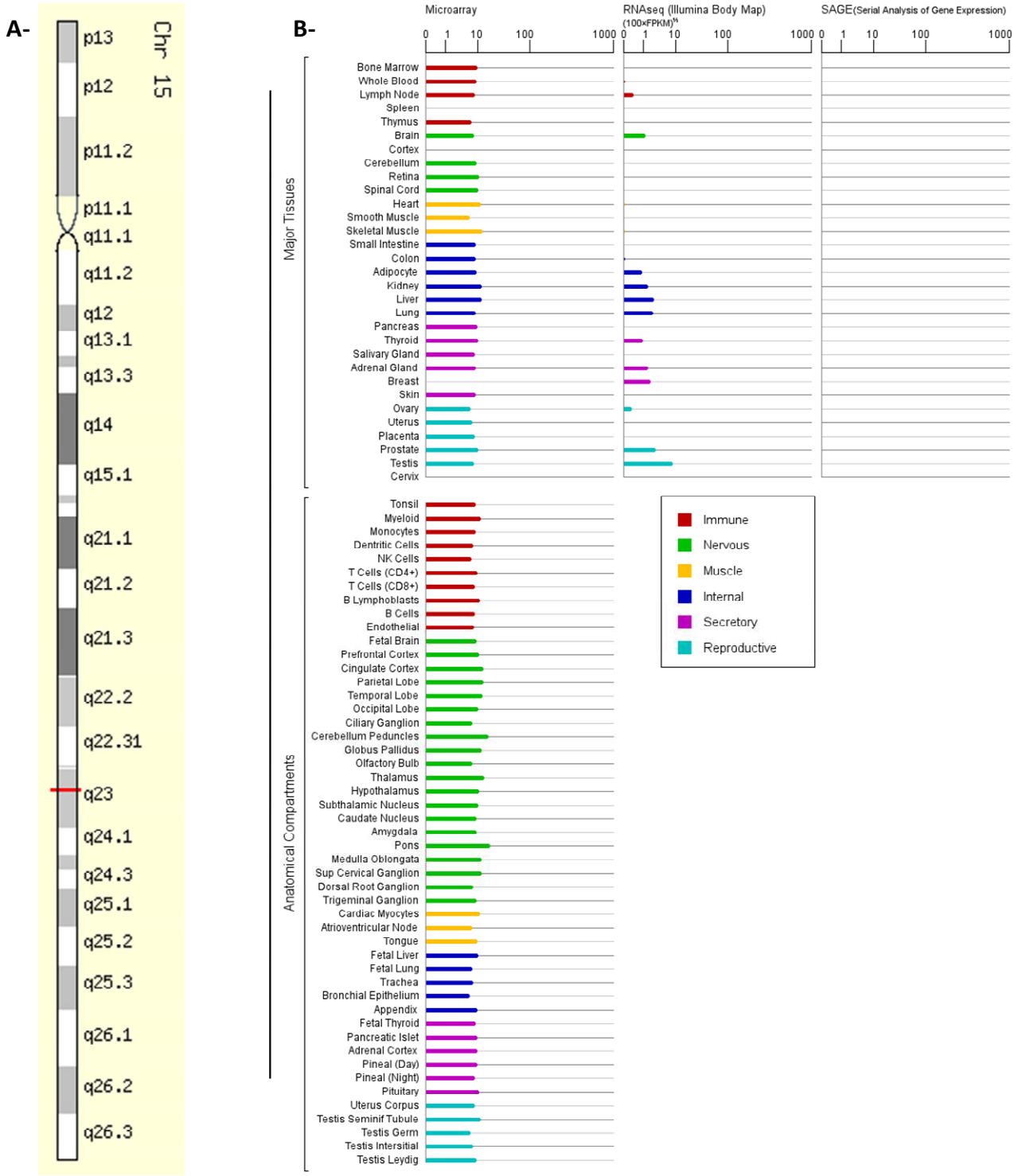


Figure 8 : NOX5

A- Le gène codant pour NOX5 est localisé sur le bras long du chromosome 15.

B- L'analyse d'expression de l'ARN de *NOX5* en Microarray, Illumina Body Map et Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) dans différents tissus et compartiments représentatifs de l'organisme montre une expression majoritaire dans le testicule (www.genecards.org)

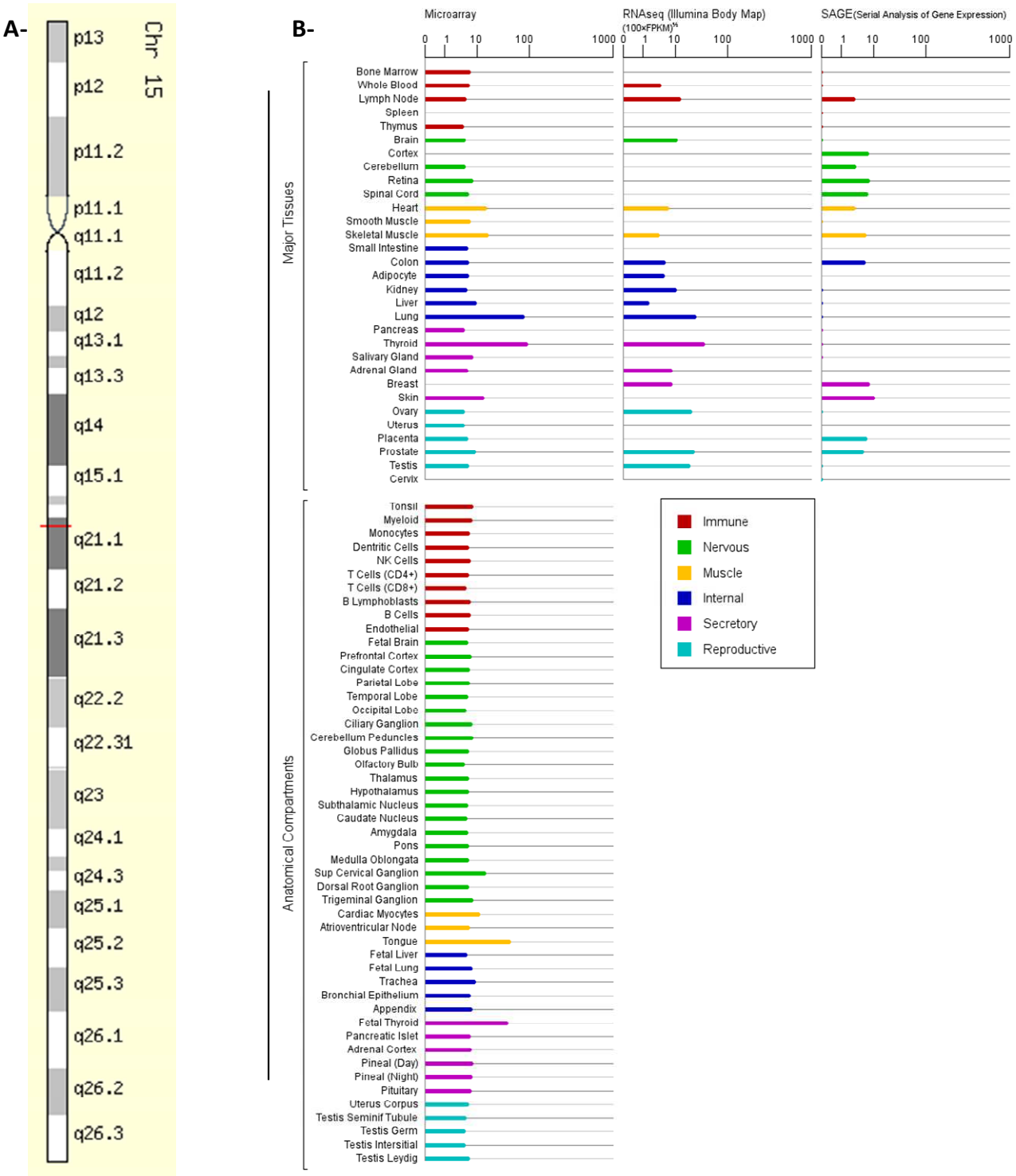


Figure 9 : DUOX1

A- Le gène codant pour DUOX1 et celui codant pour DUOX2 sont localisés sur le bras long du chromosome 15.

B- L'analyse d'expression de l'ARN des *DUOX* en Microarray, Illumina Body Map et Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) dans différents tissus et compartiments représentatifs de l'organisme montre une expression homogène dans les tissus testés (www.genecards.org).

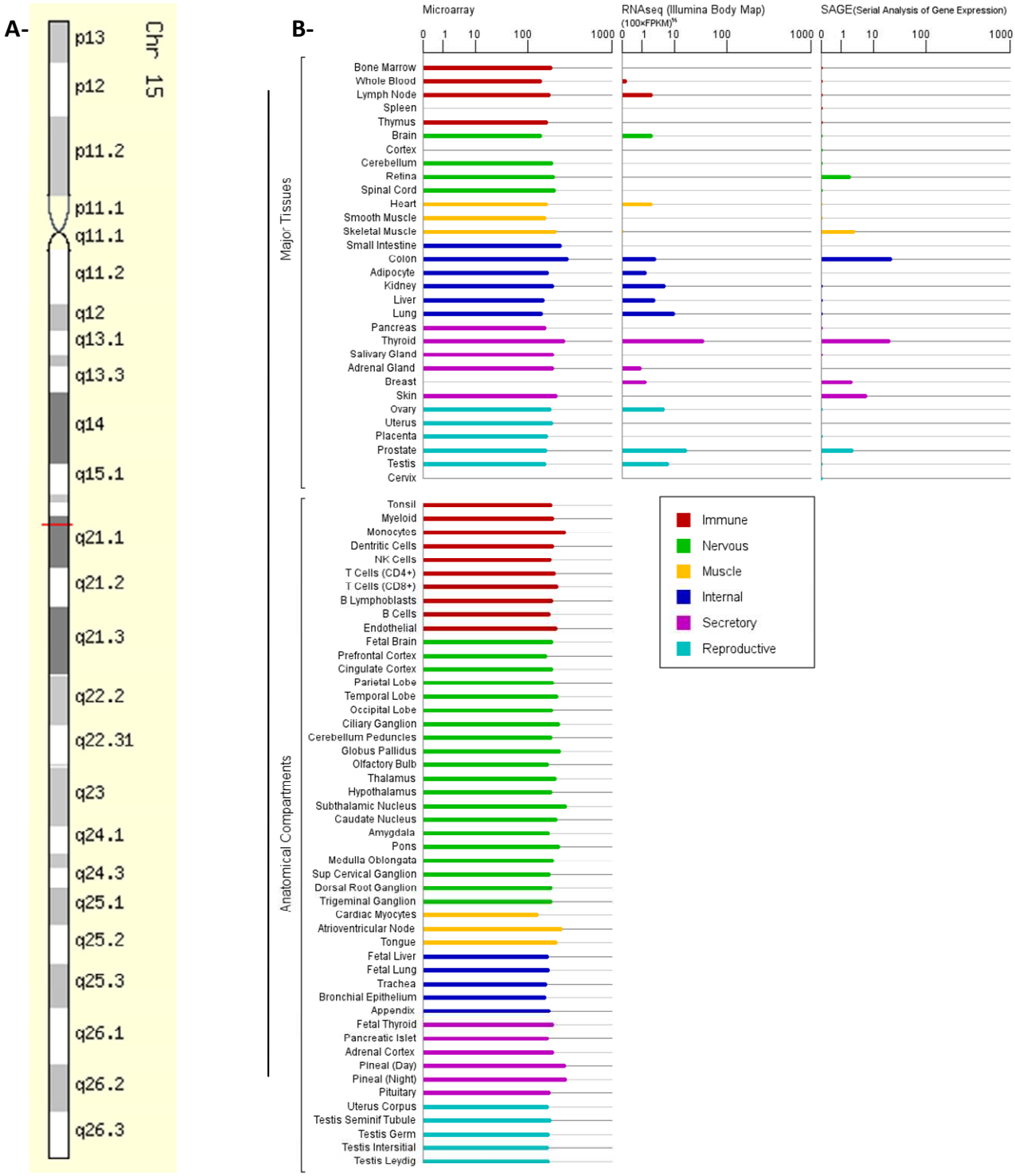


Figure 10 : DUOX2

A- Le gène codant pour DUOX1 et celui codant pour DUOX2 sont localisés sur le bras long du chromosome 15.

B- L'analyse d'expression de l'ARN des *DUOX* en Microarray, Illumina Body Map et Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) dans différents tissus et compartiments représentatifs de l'organisme montre une expression homogène dans les tissus testés (www.genecards.org).

2.3. Le second composant membranaire

La sous-unité membranaire $p22^{phox}$ de 195 acides aminés est codée par le gène *CYBA* (Cytochrom B-245 Alpha polypeptide) situé au locus 16q24.3. Il est le composant mis en évidence en complément de NOX2 lors de la découverte du cytochrome b_{558}. On la retrouve dans la membrane plasmique associée à NOX1, NOX2, NOX3 et NOX4. Elle contient des régions riches en prolines impliquées dans la liaison aux domaines SH3 de $p40^{phox}$ et $p47^{phox}$ (Tamura et al., 2007). Cette sous-unité n'intervient pas dans l'activité catalytique puisqu'elle n'est pas nécessaire et n'a pas d'homologue pour l'activité de NOX5 et des DUOX. Par contre elle intervient dans la stabilisation des sous-unités catalytiques auxquelles elle s'associe. Certaines NOX et $p22^{phox}$ ne sont stables que sous forme associée ce qui lui confère un rôle très important (DeLeo et al., 2000).

2.4. Les sous-unités cytosoliques organisatrices

Les sous-unités organisatrices ont un rôle fondamental dans l'assemblage des complexes oxydases. Elles servent d'adaptateur entre la sous-unité catalytique et les autres sous unités-régulatrices. La première découverte est $p47^{phox}$, dans l'oxydase phagocytaire. Elle est codée par le gène *NCF1* (*Neutrophile Cytosolic Factor 1, NOXO2, P47^{phox}*) et comporte 390 acides aminés pour 44,7 kDa (Volpp 1989). Elle possède quatre domaines fonctionnels importants (Figure 11). Deux domaines SH3 servent à l'interaction avec les régions riches en proline de $p22^{phox}$ pour former la composante membranaire (Nobuhisa et al., 2006). Un domaine PRR riche en proline est important pour l'interaction avec les autres sous-unités cytosoliques régulatrices (Durand et al., 2006). Un domaine PX permet de renforcer l'ancrage des complexes à la membrane plasmique en créant une interaction avec les phosphoinositols membranaires. Le dernier domaine remarquable est un domaine AIR, auto-inhibiteur. A l'état de repos, il bloque l'interaction avec $p22^{phox}$. La phosphorylation des sérines$^{303, 304, 310, 315, 320, 328}$ modifient la conformation de $p47^{phox}$ et démasque les domaines SH3 et PX autorisant l'interaction avec $p22^{phox}$.

Une seconde sous-unité organisatrice a été mise en évidence, la sous-unité NOXO1. Elle est codée par le gène *NOXO1*(*NADPH Oxidase Organizer 1, P41NOX*), sur le chromosome 16 au locus 16p13.3. Cette protéine de 371 acides aminés possède les domaines fonctionnels importants de $p47^{phox}$. Les deux domaines SH3, les domaines PX et PRR y sont présents. Elle ne porte pas de domaine auto-inhibiteur AIR, elle est donc constitutivement active.

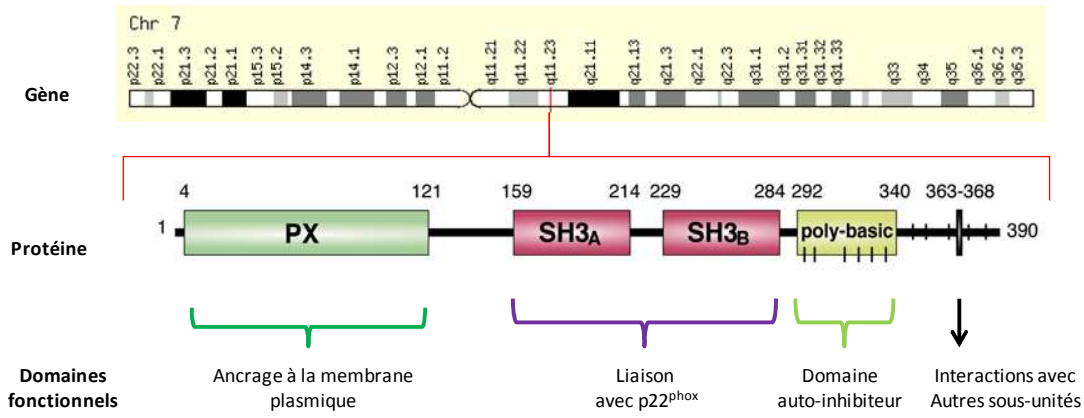


Figure 11 : La sous-unité organisatrice de référence, p47^{phox}.

Le gène codant pour p47^{phox} est situé sur le bras long du chromosome 7. La séquence de la protéine obtenue comporte 390 acides aminés. L'analyse prédictive de séquence détermine 5 domaines importants : 1 domaine PX d'ancrage à la membrane plasmique, 2 domaines SH3 impliqués dans l'interaction avec p22^{phox}, 1 domaine d'auto-inhibition qui modifie la conformation de la protéine selon sa phosphorylation et 1 domaine PRR riche en prolines favorisant l'interaction avec les protéines à domaine SH3 d'après (Groemping and Rittinger, 2005).

2.5. Les sous-unités cytosoliques régulatrices

L'étude de l'oxydase phagocytaire à mis en évidence la nécessité de la protéine p67^{phox}. Cette protéine est codée par le gène *NCF2* (*Neutrophile Cytosolic Factor 2, NOXA2, P67^{phox}*), porté par le chromosome 1 au locus 1q25.3. Elle comporte 526 acides aminés (Nunoi et al., 1988; Volpp et al., 1988). Ses domaines fonctionnels importants pour l'assemblage du complexe ont été mis en évidence. Elle comporte deux domaines SH3 qui permettent la liaison au domaine riche en prolines des sous-unités organisatrices et en miroir un domaine riche en proline qui interagit avec les domaines SH3 des sous-unités organisatrices. Elle dispose en complément d'un domaine PB1 impliqué pour l'interaction avec p40^{phox}. Elle contient aussi un domaine d'activation nécessaire pour l'activité oxydase en système reconstitué (Figure 12) (Han et al., 1998a).

Une protéine homologue à p67^{phox} a ensuite été découverte, NOXA1. Elle est codée par le gène *NOXA1* (*NADPH Oxidase Activator 1, NCF2-like, P67phox like Factor*), en 9q34.3. Cette protéine de 476 acides aminés contient tous les domaines fonctionnels importants de son homologue phagocytaire.

Des expériences de co-purification de p67^{phox} ont mis en évidence une autre sous-unité de la famille des oxydases, p40^{phox} (Tsunawaki et al., 1994; Wientjes et al., 1993). Cette sous-

unité de 336 acides aminés est codée par le gène *NCF4* (*Neutrophile Cytosolic Factor 4, P40*^{phox}) au locus 22q12.3 (Figure 13). Elle comporte des domaines communs aux autres sous-unités cytosoliques de la famille des oxydases. Un domaine PX favorise la liaison aux lipides de la membrane plasmique (Ellson et al., 2001). Un domaine SH3 et un domaine PB1 favorisent eux l'interaction avec p47^{phox} (Grizot et al., 2001; Massenet et al., 2005), p22^{phox} (Tamura et al., 2007) et p67^{phox}.

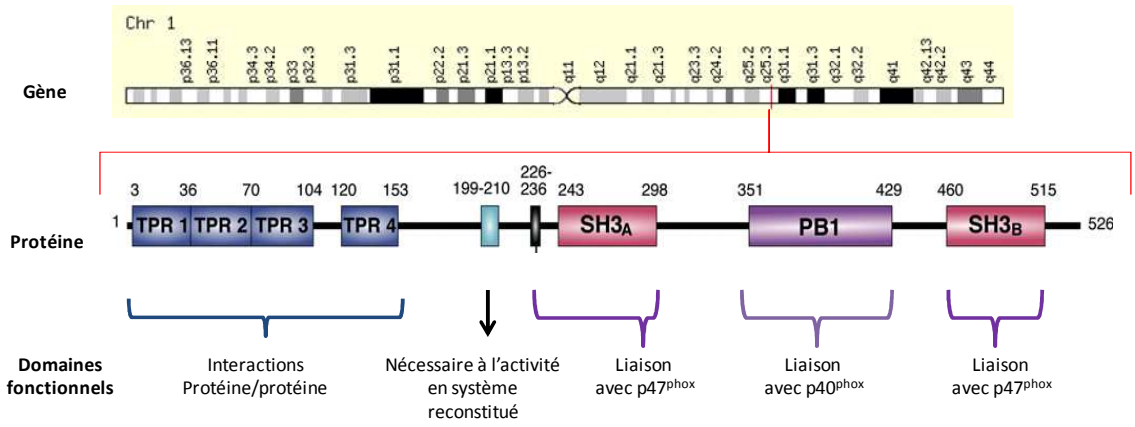


Figure 12 : La sous-unité activatrice de référence, p67^{phox}.

Le gène codant pour p67^{phox} est situé sur le chromosome 1. La séquence de la protéine obtenue comporte 526 acides aminés. L'analyse prédictive de séquence détermine 9 domaines importants : 2 domaines SH3 favorisant l'interaction avec p47^{phox}, 4 domaines TRP d'interaction protéine/protéine, un domaine PB1 d'interaction avec p40^{phox}, 1 domaine nécessaire à l'activation et un domaine riche en prolines. (D'après (Groemping and Rittinger, 2005))

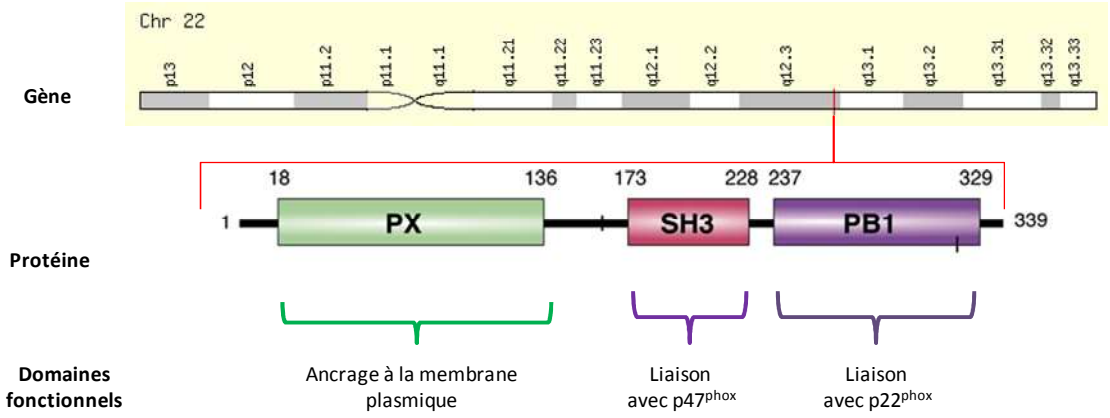


Figure 13 : La sous-unité régulatrice p40^{phox}.

Le gène codant pour la protéine p40^{phox} est porté par le bras long du chromosome 22. L'étude de la séquence prédite en acides aminés montre 3 domaines importants : 1 domaine PX d'ancrage à la membrane plasmique, un domaine SH3 impliqué dans la liaison à p47^{phox} et un domaine PB1 impliqué dans la liaison à p22^{phox}. (D'après (Groemping and Rittinger, 2005))

2.6. Rôle de la protéine Rac

La protéine Rac appartient à la classe des petites protéines GTPases Rho. Sous sa forme liée au GTP elle est essentielle au fonctionnement des oxydases. Au repos, Rac est associé à une protéine inhibitrice de dissociation du GDP qui la conserve dans sa forme inactive (Kwong et al., 1993). Lors de l'activation des complexes NOX1, NOX2 et NOX3 il se produit une dissociation entre Rac et sa protéine inhibitrice suivie d'une translocation de Rac à la membrane. A la membrane, une protéine d'échange (GDP exchange factor, GEF) remplace le GDP lié à Rac par un GTP. Rac se trouve alors dans sa configuration active qui lui permet de se lier à la sous-unité catalytique et à la sous-unité activatrice du complexe oxydase.

Le site de fixation au GDP/GTP se trouve en N-terminal. Rac contient deux régions permettant la modification de sa conformation selon la liaison d'un nucléotide di ou tri-phosphate. Par sa liaison à différentes sous-unités membranaires et cytosoliques, Rac contribue à la stabilisation du complexe. Plus qu'une stabilisation du complexe, elle permet la bonne orientation de chaque composant du complexe pour établir le transfert d'électrons lors de l'activité oxydase.

3. La composition des complexes NADPH oxydase et leur activation

Le complexe NADPH oxydase phagocytaire nécessite l'assemblage à la membrane plasmique des cinq sous-unités de référence pour être actif. De la même façon chaque isoforme nécessite sa propre combinaison de sous-unités régulatrices pour être fonctionnelle. Les expériences en système acellulaire reconstitué ont permis de déterminer les constituants nécessaires *a minima* pour l'activité de chaque type de complexe.

3.1. NOX2, le complexe phagocytaire

La composante membranaire nécessite les deux composants du cytochrome b_{558} : NOX2 associé à $p22^{phox}$. Il a été mis en évidence une co-localisation de NOX2 et $p22^{phox}$ au niveau de sites de stockage intracellulaires dans les phagocytes (Jesaitis et al., 1990) et dans les cellules endothéliales coronaires (Bayraktutan et al., 2000). De plus la nécessité de l'interaction entre ces deux protéines a été démontrée (Figure 14) (DeLeo et al., 2000; Parkos et al., 1988) et la régulation négative de $p22^{phox}$ par des siRNA affecte la fonction des complexes NOX2 (Kawahara et al., 2005a; Martyn et al., 2006). La présence de $p22^{phox}$ joue un rôle dans l'interaction avec la protéine organisatrice du complexe $p47^{phox}$ grâce à leur forte affinité. La région riche en proline en C-terminal de $p22^{phox}$ interagit avec les deux domaines SH3 de $p47^{phox}$ (Figure 14) (Leto et al., 1994; Stanger et al., 2001). Cette interaction n'est possible que lorsque $p47^{phox}$ est phosporylée en raison de la présence d'une région auto-inhibitrice qui régule la conformation de la protéine et donc sa capacité d'interaction. La sous-unité organisatrice $p47^{phox}$ joue un rôle d'adaptateur en interagissant directement avec $p67^{phox}$. Les régions C-terminales de $p47^{phox}$ riches en prolines et les domaines SH3 de $p67^{phox}$ sont impliquées dans cette interaction. L'activité du complexe est régulée en grande partie par l'état de $p47^{phox}$ (Dusi et al., 1996; Heyworth et al., 1991; Uhlinger et al., 1993) mais aussi par l'état de $p67^{phox}$ elle aussi phosphorylable (Benna et al., 1997; Dang et al., 2003a; Dusi et al., 1993; Grandvaux et al., 1999; Nauseef, 2004; Zhao et al., 2005). De plus il existe une interaction directe entre NOX2 et p67phox qui renforce le complexe (Figure 14) (Bánfi et al., 2003; Geiszt and Leto, 2004; Han et al., 1998b; Nisimoto et al., 1999; Takeya et al., 2003). Une dernière sous-unité régulatrice, $p40^{phox}$ participe à ce complexe oxydase phagocytaire (Figure 14). Elle a été retrouvée par co-immuno-précipitation avec $p47^{phox}$ et avec $p67^{phox}$ (Wientjes et al., 1993). Elle n'est pas strictement nécessaire à l'activité du complexe, aucun patient atteint de CGD n'affectant que p40phox n'a été décrit (Massenet et al., 2005). De plus,

lors de l'activation Rac se dissocie de sa protéine inhibitrice et migre vers la membrane où une protéine d'échange substitue son GDP par un GTP. Rac peut alors se lier au complexe par la sous-unité catalytique et la sous-unité activatrice.

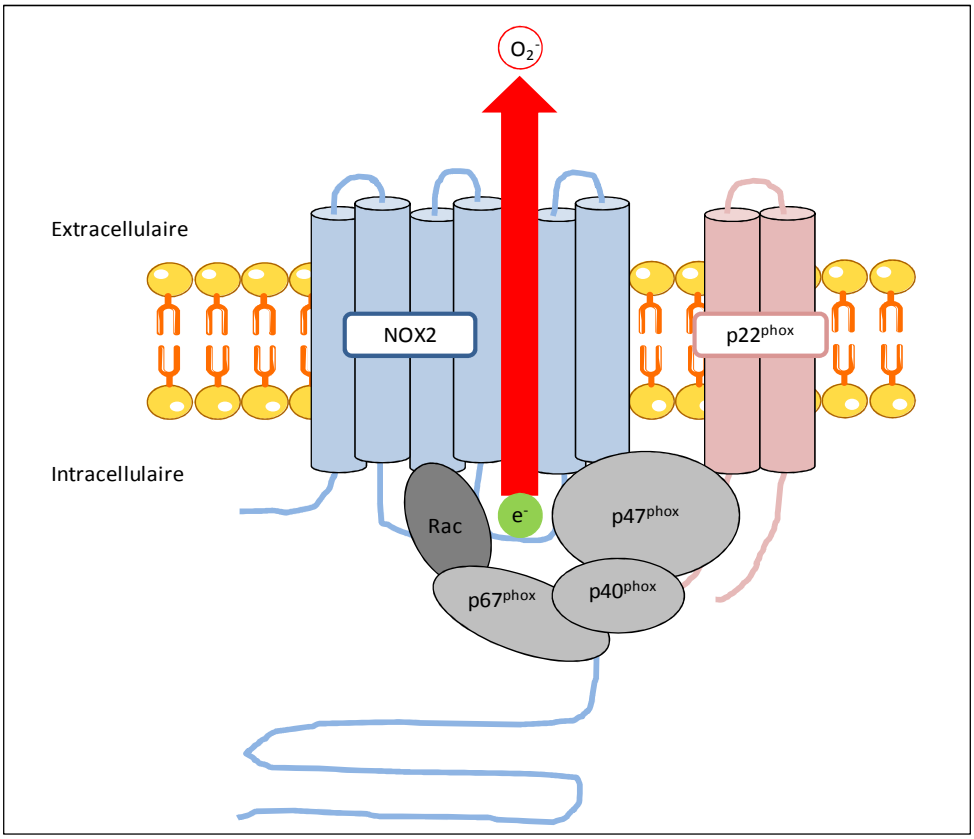


Figure 14 : Le complexe NOX2.

Le complexe NOX2 de la phagocyte oxydase nécessite NOX2 et $p22^{phox}$ à la membrane plasmique pour former le cytochrome b558. Les sous-unités phosphorylées $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et Rac sont nécessaires à son activité. La sous-unité $p40^{phox}$ est un régulateur non strictement nécessaire. (d'après (Bedard and Krause, 2007).

La séquence d'activation du complexe NOX2 débute par la phosphorylation de $p47^{phox}$ par la PKC (El Benna et al., 1996). Différentes sérines sont phosphorylées de façon séquentielle. Cela modifie la conformation de la protéine qui expose alors un domaine SH3 capable d'interagir avec la région riche en prolines de $p22^{phox}$, $p67^{phox}$ et avec les lipides membranaires.

Les phosphorylations des sous-unités de l'oxydase phagocytaire sont très importantes pour son activation (Figure 15). Dans le neutrophile humain, il a été montré qu'une phosphorylation de NOX2 via la PKC au niveau des régions C-terminales (321-405) et (466-

570) contenant trois sites de phosphorylation potentielle (Ser^{333}, Thr^{309} et Ser^{550}) favorise l'interaction avec $p47^{phox}$ et Rac (Raad et al., 2009). Le second composant du cytochrome membranaire, $p22^{phox}$ contient aussi des sites potentiels de phosphorylation ($Thr^{132, 147}$) qui pourraient être impliqué dans la liaison des sous-unités régulatrices. La protéine organisatrice du complexe, $p47^{phox}$ contient de nombreux sites de phosphorylation très importants pour rendre l'assemblage du complexe possible et favoriser son activité. Elles contient de nombreux sites de phosphorylation sur sérine : $Ser^{303, 304, 315, 320, 328, 345, 348, 359, 370, 379}$ (el Benna et al., 1994; Faust et al., 1995; Fontayne et al., 2002). La phosphorylation des $Ser^{303, 304, 315, 320, 328}$ permet le passage de $p47^{phox}$ de sa configuration auto-inhibée à sa configuration non-inhibée (Marcoux et al., 2009; Shiose and Sumimoto, 2000) permettant l'association a $p22^{phox}$ et à la membrane. La phosphorylation de Ser^{345} semble favoriser la phosphorylation des sérines suivantes qui permettent une plus grande efficacité du complexe (Dang et al., 2006; Dewas et al., 2003). Les phosphorylations de $Ser^{359, 370, 379}$ influent sur la disponibilité du domaine PRR impliqué dans l'interaction avec $p67^{phox}$. Il est proposé que la phosphorylation graduelle de $p47^{phox}$ où seules les formes les plus phosphorylées s'associeraient à la membrane permettrait l'association aux sous-unités cytosoliques puis à la membrane. La sous-unité $p67^{phox}$ subit elle aussi des phosphorylation lors de l'activation (Dang et al., 2003b; Dusi et al., 1993) dont le site majeur est Thr^{233} (Forbes et al., 1999), complété par des phosphorylations sur sérines (Dang et al., 2003b). Enfin, $p40^{phox}$ est aussi phosphorylée sur Thr^{154} et Ser^{315} (Bouin et al., 1998). L'état de phosphorylation de $p40^{phox}$ influence la production de superoxydes (Fuchs et al., 1997).

Il a de plus été démontré que l'assemblage du complexe est favorisé par la présence d'acide arachidonique. L'acide arachidonique, libéré de la membrane plasmique par la phospholipase A2 (PLA2) est un stimulateur de la réponse des neutrophiles (Hii and Ferrante, 2007), cet effet a été démontré *in vivo* et *in vitro* (Chakraborti et al., 2012). De plus il est reconnu que les MAPK sont des régulateurs de l'activité de la PLA2 cytoplasmique (PLA2c) (Menzel et al., 2012) et en particulier l'axe PKC/p38MAPK qui est responsable d'une activation des oxydases *via* activation de PLA2c dans les cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire (Chakraborti et al., 2012). Enfin, l'importance de l'AA dans l'assemblage du complexe NOX2 est confirmée par la mise en évidences d'effets inhibiteurs de l'activité oxydase en présence de l'isomère *trans* de l'AA dont il a été démontré qu'il interagit directement avec ses sous-unités (Souabni et al., 2012) et surtout récemment la mise en évidence que la nitration de l'AA diminue l'activité oxydase des macrophages sans qu'une

diminution des phosphorylations de p47^{phox} et p40^{phox} ne soit observée. Il a été montré *in vitro* que cette diminution d'activité résulte au contraire, d'une diminution de la migration de p47^{phox} la protéine organisatrice de l'assemblage du complexe à la membrane (González-Perilli et al., 2013) confirmant le rôle essentiel de l'AA dans l'assemblage du complexe.

Les caractéristiques du complexe NOX2 sont résumées dans le tableau 1.

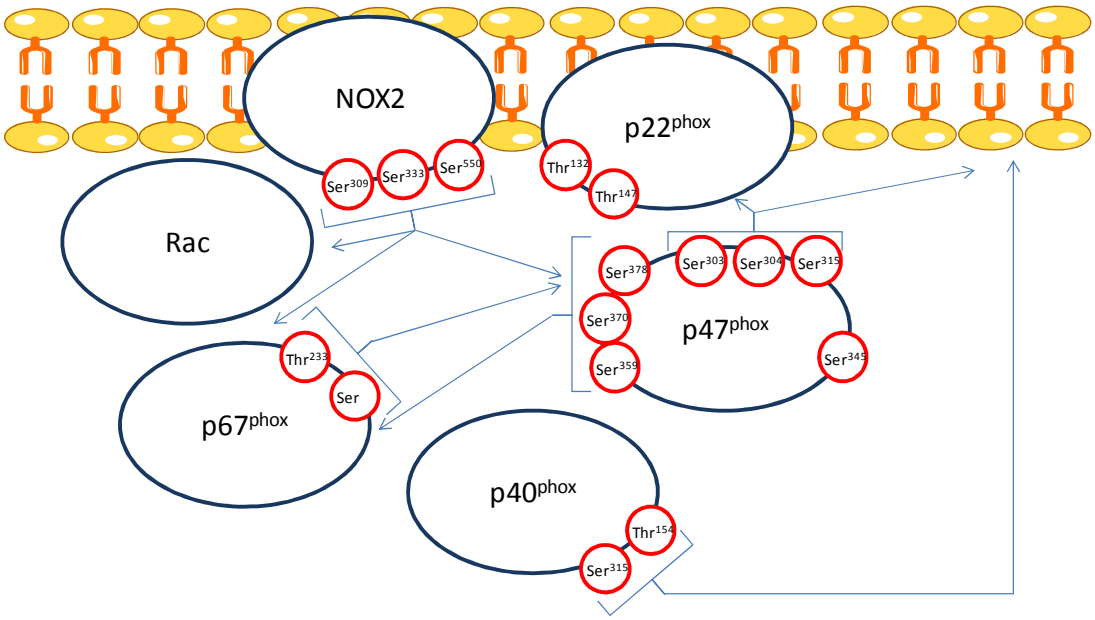


Figure 15 : Evénements de phosphorylation des sous-unités de l'oxydase phagocytaire

Lors de l'activation de l'oxydase phagocytaire, les sous-unités subissent différentes phosphorylations (ronds rouges) qui contribuent à la formation du complexe actif à la membrane en favorisant leurs interactions (flèches bleues).

	gp91^{phox}	p22^{phox}	p47^{phox}	p67^{phox}	p40^{phox}	Rac2
Gene and locus	*CYBB*; Xp21.1	*CYBA*; 16q24	*NCF-1*; 7q11.23	*NCF-2*; 1q25	*NCF-4*; 22q13.1	*Rac2*; 22q13.1
Amino acids	570	195	390	526	339	192
Molecular weight:						
Predicted	65,338 Da	20,959 Da	44,684 Da	59,735 Da	39,039 kDa	21,429 Da
By SDS-PAGE	~90 kDa	22 kDa	47 kDa	67 kDa	40 kDa	22 kDa
Glycosylation	Yes	No	No	No	No	No
p*I*	9.26	10.1	9.58	6.12	7.28	7.87
Phosphorylation	No	Minor	Yes	Minor	Yes	?
Location in PMN						
Resting	Specific granule and plasma membrane		Cytosol	Cytosol	Cytosol	Mainly cytosol
Stimulated	Plasma membrane and phagosome		Membrane	Membrane	Membrane	Membrane
Abundance pmol/10^6 cells (cytosol conc.)	1.0–2.0	1.0–2.0	6.0 (2750 nM)	1.0 (460 nM)	1.0 (460 nM)	2.6 (1200 nM)
Functional domains (see Fig. 2)	C-terminus binds cytosolic components. Haem, FAD and NADPH binding regions	C-terminal proline-rich region	Phosphorylation sites. PX domain, 2 SH3 domains, proline-rich region	Tetratricopeptide repeat, 2 SH3 domains, proline-rich domains	PX and SH3 domains, octicosapeptide repeat	GDP/GTP-binding; invert and effector regions, isoprenylation site

Tableau 1 : Le complexe oxydase phagocytaire.

Ce tableau résume les caractéristiques principales de différentes sous-unités composant le complexe NOX2 (gènes, taille des protéines, importance des phosphorylations, localisation, et domaines fonctionnels). (Cross and Segal, 2004)

3.2. Le complexe NOX1

La composante membranaire nécessite NOX1 et p22^{phox}. La co-localisation des deux composants a été mise en évidence dans le muscle lisse vasculaire (Hanna et al., 2004) et lors d'expériences de transfection (Ambasta et al., 2004). L'interaction entre ces deux composants a été démontrée (Figure 16) (Laude et al., 2005; Takeya et al., 2003). De plus l'utilisation de NOX1 et p22^{phox} taggées a permis de confirmer cette interaction par des méthodes de transfert d'énergie de fluorescence (FRET) et de co-immuno-précipitation (Ambasta et al., 2004). La régulation négative de p22^{phox} par des siRNA affecte la fonction des complexes NOX1 (Kawahara et al., 2005a; Martyn et al., 2006). La présence de p22^{phox} joue un rôle dans l'interaction avec la protéine organisatrice du complexe NOXO1 grâce à leur forte affinité. La région riche en proline en C-terminal de p22^{phox} interagit avec les deux domaines SH3 de NOXO1 (Leto et al., 1994; Stanger et al., 2001). NOXO1 ne possède pas de région auto-inhibitrice régulant l'interaction avec p22^{phox} qui est donc constitutive. Les régions C-terminales de NOXO1 riches en prolines et les domaines SH3 de NOXA1 sont impliqués dans cette interaction (Groemping and Rittinger, 2005; Mendez et al., 1997; Takeya et al., 2003). De plus il existe une interaction directe entre NOX1 et NOXA1 qui renforce le complexe

(Bánfi et al., 2003; Geiszt and Leto, 2004; Han et al., 1998b; Nisimoto et al., 1999; Takeya et al., 2003).

La liaison de NOX1 avec sa protéine organisatrice NOXO1 étant constitutive, le phénomène d'activation est seulement régulé par la liaison de NOXA1 et de Rac.

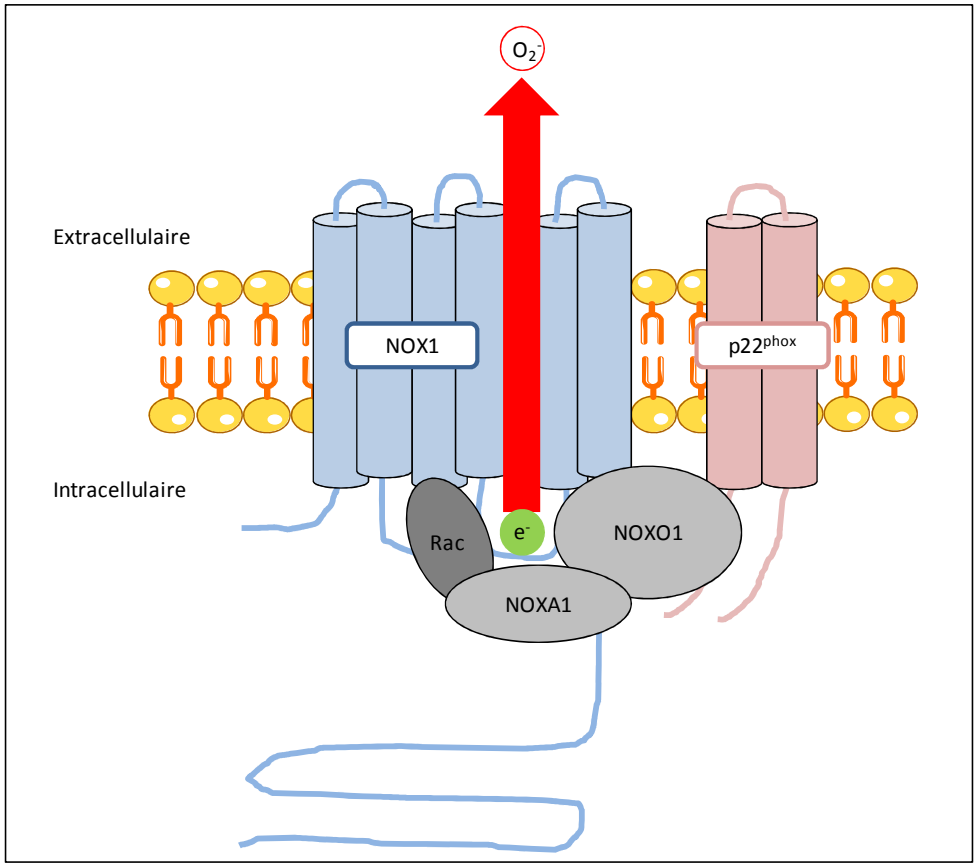


Figure 16 : Le complexe NOX1.

Le complexe NOX1 nécessite pour son activité, les sous-unités NOX1 et p22^{phox} membranaires associée aux sous-unités régulatrices NOXO1, NOXA1 et Rac (d'après (Bedard and Krause, 2007)).

3.3. Le complexe NOX3

La composante membranaire nécessite NOX3 et p22^{phox} (Figure 17). L'interaction entre les deux protéines a été démontrée (Kawahara et al., 2005a; Ueno et al., 2005). La régulation négative de p22^{phox} par des siRNA affecte la fonction des complexes NOX3 (Kawahara et al., 2005a; Martyn et al., 2006). La présence de p22^{phox} joue un rôle dans l'interaction avec la protéine organisatrice du complexe NOXO1 grâce à leur forte affinité. La région riche en proline en C-terminal de p22^{phox} interagit avec les deux domaines SH3 (Geiszt and Leto,

2004) de NOXO1 (Leto et al., 1994; Stanger et al., 2001). NOXO1 ne possède pas de région auto-inhibitrice régulant l'interaction avec $p22^{phox}$ qui est donc constitutive. Les régions C-terminales de NOXO1 riches en prolines et les domaines SH3 de NOXA1 sont impliqués dans cette interaction. De plus il existe une interaction directe entre NOX1 et NOXA1 qui renforce le complexe (Bánfi et al., 2003; Han et al., 1998b; Nisimoto et al., 1999; Takeya et al., 2003).

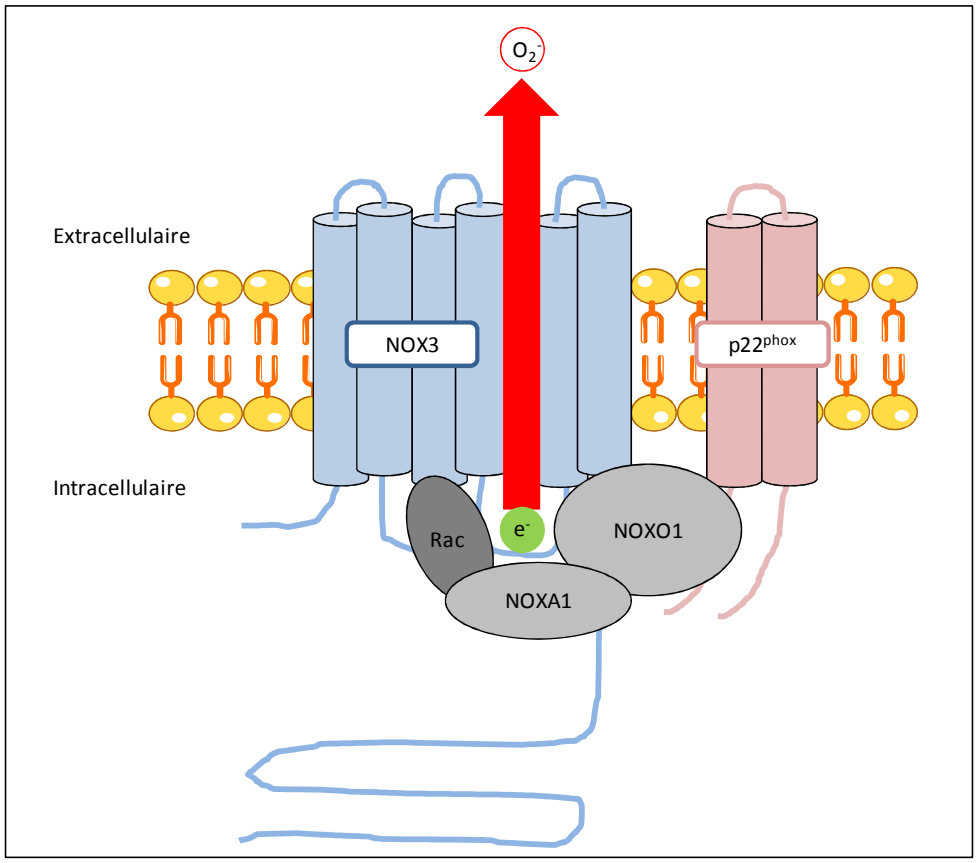


Figure 17 : Le complexe NOX3.

Le complexe NOX3 nécessite pour son activité, les sous-unités NOX3 et $p22^{phox}$ membranaires associées aux sous-unité régulatrice NOXO1, NOXA1 et Rac (d'après (Bedard and Krause, 2007)) .

3.4.Le complexe NOX4

La composante membranaire nécessite NOX4 et $p22^{phox}$. L'interaction entre les deux protéines a été démontrée (Figure 18) (Ambasta et al., 2004; Martyn et al., 2006). De plus l'utilisation de NOX4 et $p22^{phox}$ taggées a permis de confirmer cette interaction par des méthodes de transfert d'énergie de fluorescence (FRET) et de co-immuno-précipitation (Ambasta et al., 2004). La régulation négative de $p22^{phox}$ par des siRNA affecte la fonction des complexes NOX4 (Kawahara et al., 2005b; Martyn et al., 2006). La présence ou l'absence

des sous-unités cytosoliques régulatrices ne modifient pas l'activité du complexe NOX4. De plus, le clivage ou la mutation des domaines de $p22^{phox}$ impliqués dans l'interaction avec les sous-unités régulatrices cytosoliques ne modifie pas l'activité du complexe. NOX4 apparait comme un complexe constitutivement actif dont l'activité n'est régulée que par le niveau d'expression de ses deux composants, du NADPH et de l'oxygène disponible. Il est souvent considéré comme un senseur d'oxygène. Comme son activation ne dépend pas de facteurs cytosoliques (Martyn et al., 2006), son activité est constitutive et régulée par son niveau d'expression (Touyz et al., 2002).

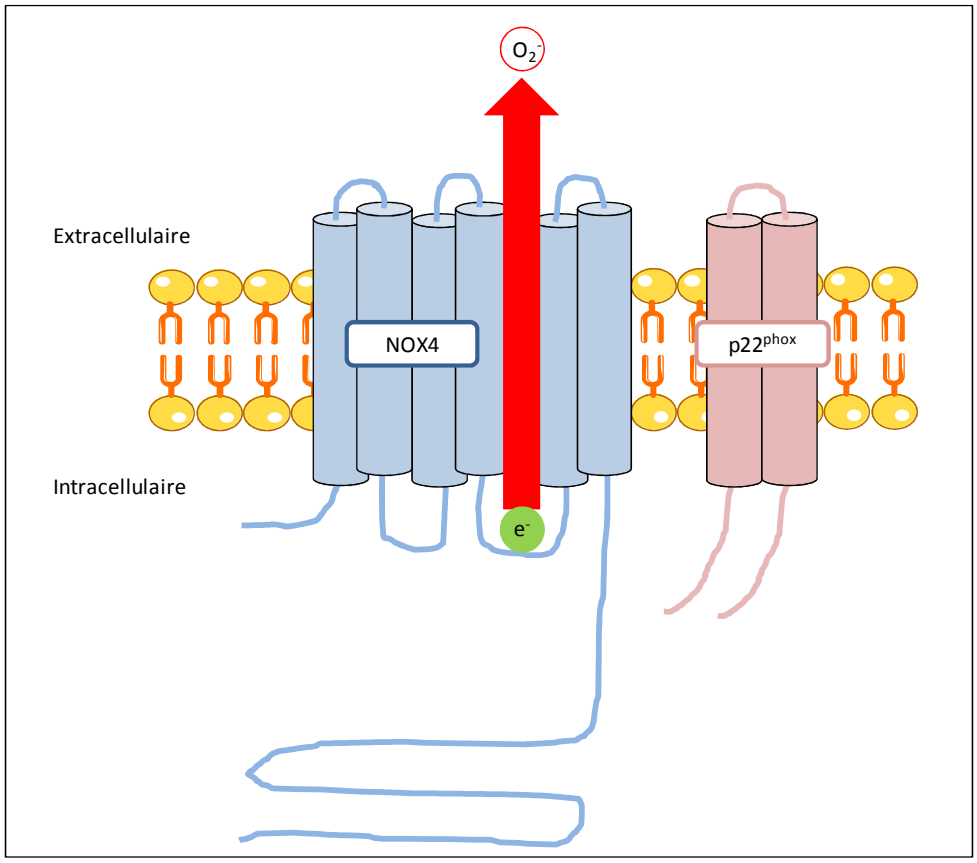


Figure 18 : Le complexe NOX4.

Le complexe NOX4 ne nécessite pour son activité, que les sous-unités NOX4 et $p22^{phox}$ membranaires associées. Son activité semble constitutive (d'après (Bedard and Krause, 2007).

3.5. Le complexe NOX5

La composante membranaire nécessite uniquement NOX5 (Figure 19). Aucune interaction avec p22phox n'a été mise en évidence. De plus, la régulation négative de $p22^{phox}$ par des siRNA n'affecte pas la fonction des complexes NOX5 (Brar et al., 2003; Kawahara et al.,

2005b). La présence ou l'absence des sous-unités cytosoliques régulatrices ne modifient pas l'activité du complexe NOX5. NOX5 possède des domaines de liaison au calcium en N-terminal (Figure 19). La régulation de son activité passe par une modification de sa conformation en fonction de la concentration en calcium intracellulaire et une interaction avec la calmoduline. Une augmentation de la concentration calcique augmente l'activité oxydase. Cependant, le PMA permet une activité du complexe. Il a été montré que cet effet ne correspond pas à une activation au sens strict. Le PMA stimule la phosphorylation de NOX5 sur les résidus Thr^{494} et Ser^{498} augmentant la sensibilité au calcium (Jagnandan et al., 2007). Ce mécanisme abaisse le seuil d'activation du complexe.

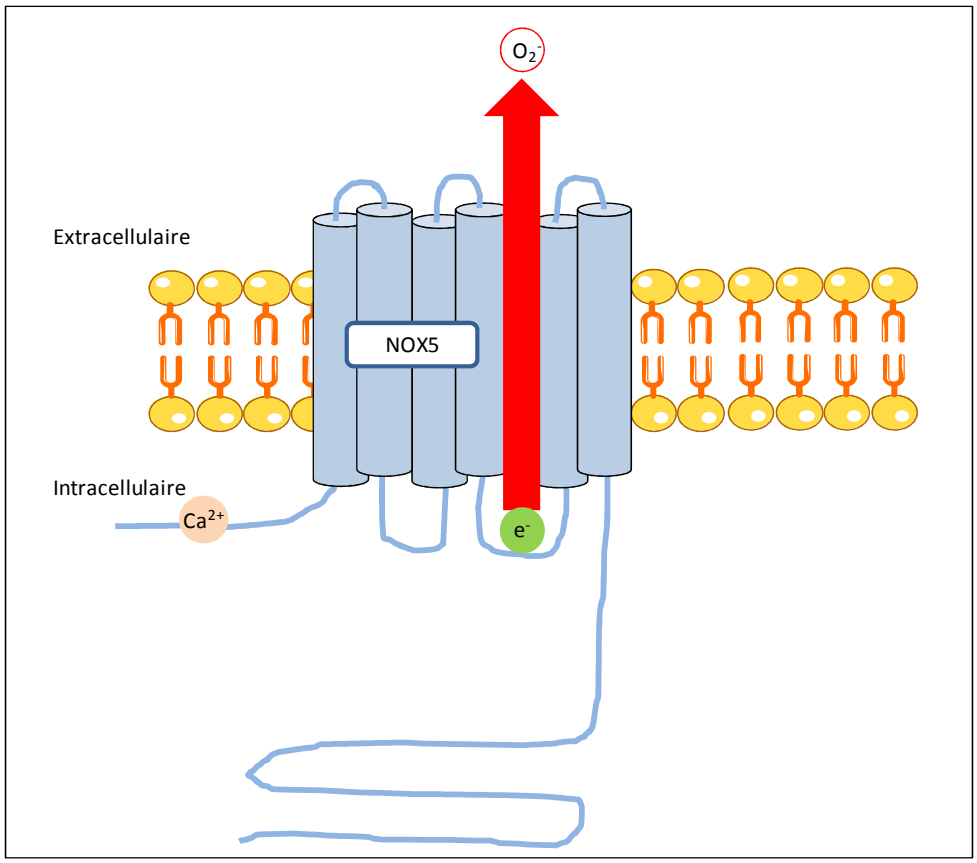


Figure 19 : Le complexe NOX5.

Le complexe NOX5 ne nécessite que sa présence pour être fonctionnel. La présence de domaines EF-Hand lui confère une sensibilité à la calmoduline et à la concentration calcique impliquée dans la régulation de son activité (d'après (Bedard and Krause, 2007)).

3.6. Les complexes DUOX1 et DUOX2

La composante membranaire nécessite uniquement DUOX1 ou DUOX2. Les expériences de co-immuno-précipitation montrent leur interaction avec $p22^{phox}$ (Wang et al., 2005), mais aucunes données ne mettent en évidence son influence sur la fonctionnalité des complexes.

Des sites de fixation au calcium sont présents en intracellulaire, et seraient responsable d'une modulation d'activité par sa concentration intracellulaire (Figure 20).

Cependant il existe des différences dans les processus d'activation de DUOX1 et DUOX2. Dans la thyroïde, DUOX1 est activé via une phosphorylation par la PKA. Pour DUOX2, les esters de phorbole induisent une phosphorylation via la PKC (Rigutto et al., 2009).

De façon moins habituelle, il semblerait que NOXA1 diminue l'activité de DUOX1, probablement en empêchant la liaison du calcium (Pacquelet et al., 2008).

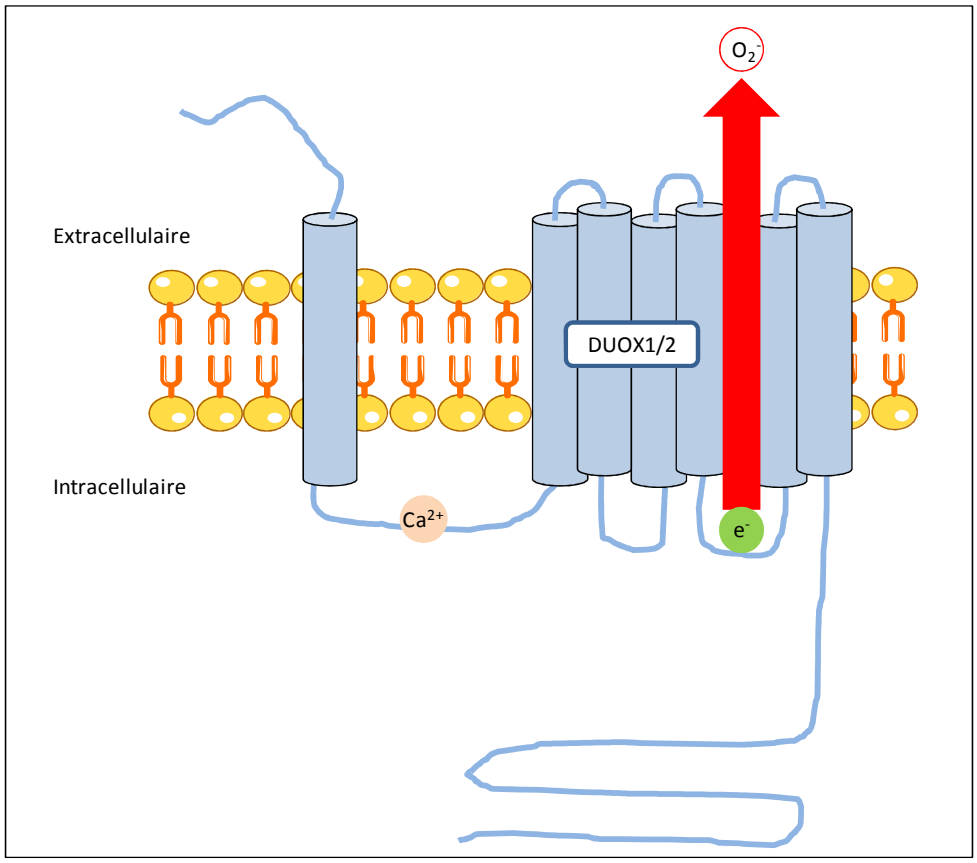


Figure 20 : Les complexes DUOX1/2.

Les DUOX sont actifs sans protéines régulatrices. Ils possèdent un domaine transmembranaire de plus que les oxydases classiques. Ce domaine peroxydase like leur permettrait de produire eux même H_2O_2. Une boucle intracellulaire porte des domaines EF-Hand de sensibilité au calcium impliqué dans la régulation de leur activité (d'après (Bedard and Krause, 2007)).

3.7. Hétérogénéité de formation des complexes oxydases

La composition des complexes oxydases présentés dans les pages précédentes semble ne pas refléter strictement la réalité. Les compositions décrites sont les compositions théoriques idéales qui sont les plus fréquemment observées. Elles confèrent à chaque isoforme son activité maximale. Les sous-unités organisatrices $p47^{phox}$ et NOXO1 ayant une très forte

homologie, il a été mis en évidence qu'elles peuvent s'inter-changer et former des complexes fonctionnels. Ces sous-unités organisatrices sont très importantes dans l'assemblage des complexes NOX1, NOX2 et NOX3 (Figure 21). De la même façon, $p67^{phox}$ et son homologue NOXA1 peuvent aussi être inter-changées (Figure 21). Il a été démontré que l'activité de ces complexes dépend très fortement de la combinaison de sous-unité qui les composent (Bánfi et al., 2003; Bánfi et al., 2004; Cheng and Lambeth, 2005; Takeya et al., 2003).

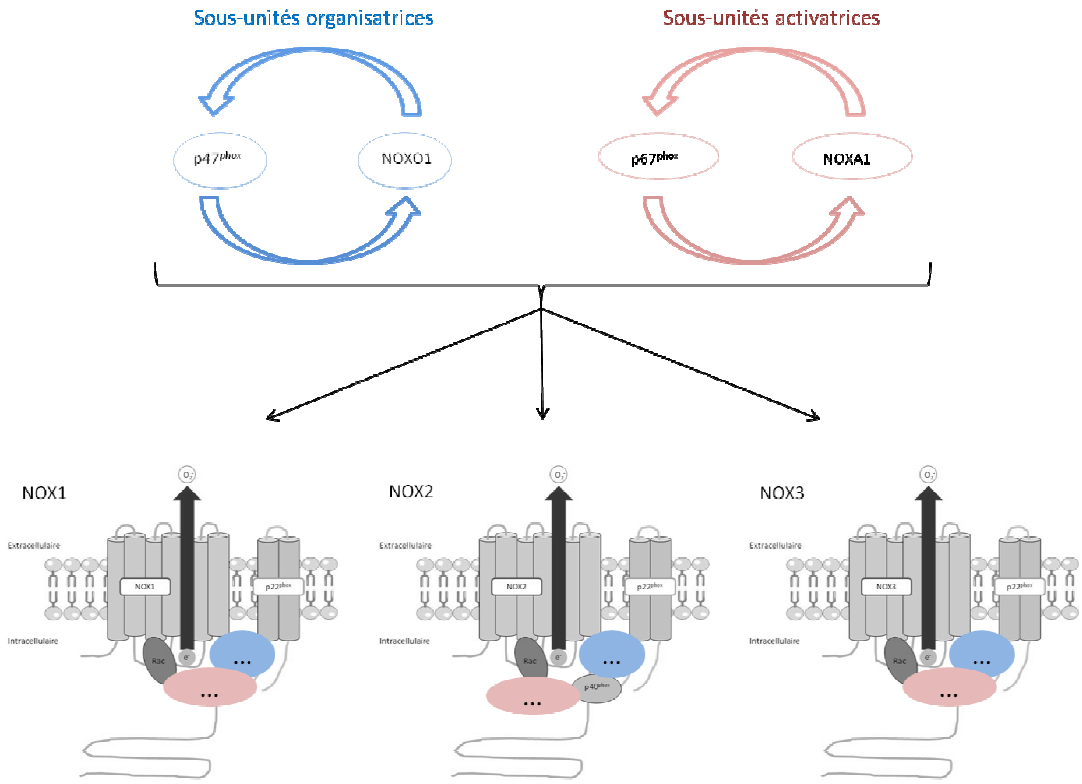


Figure 21 : Hétérogénéité dans la formation des complexes oxydases.

Les isoformes NOX1, NOX2 et NOX3 nécessitent à minima une sous-unité organisatrice et une sous-unité activatrice en plus de Rac pour être actives. La grande homologie observée pour $p47^{phox}$/NOXO1 et $p67^{phox}$/NOXA2 autorise leur permutation au sein de ces complexes. Il existe ainsi une grande hétérogénéité dans la formation de ces complexes cause de variabilité d'activation et de niveau d'activité.

4. Inhibiteurs des oxydases

Les NADPH oxydases composent une famille d'enzymes productrices de ROS. Différentes molécules ont démontré des capacités à inhiber leur activité. Ce sont généralement des inhibiteurs des flavoprotéines qui ont des effets sur toute la famille des

oxydases et d'autres enzymes utilisant le fer pour des transferts d'électrons. Leur spécificité est une problématique importante pour cibler au mieux les oxydases et chercher en complément à des inhibiteurs spécifiques de chaque isoforme.

4.1. Les différents inhibiteurs

4.1.1. Diphenylène iodonium

Le diphenylène iodonium (DPI) est l'inhibiteur des oxydases le plus souvent utilisé. Il agit en court circuitant le transport d'électrons. Cette réaction forme un radical stable qui bloque ensuite le transport d'électrons par liaison covalente au transporteur (O'Donnell et al., 1993). L'action inhibitrice du DPI est observée sur toutes les isoformes d'oxydases. Son mécanisme d'action peut inhiber d'autres transports d'électrons comme ceux réalisés par la nitrique oxyde synthase (Stuehr et al., 1991), la xanthine oxydase (Doussière and Vignais, 1992), le cytochrome P-450 réductase (Prabhakar, 2000) et le complexe I de la mitochondrie (Li and Trush, 1998).

4.1.2. Apocynine

Le 4-hydroxy-3-methoxyacétophénone, appelé apocynine est présenté comme un inhibiteur de faible affinité du burst oxydatif du phagocyte (Simons et al., 1990). Des études de son effet sur l'oxydase phagocytaire ont mis en évidence la nécessité d'une métabolisation par des peroxydases pour obtenir le composé actif. Son action inhibitrice lui serait conférée par sa capacité à inhiber la translocation des sous-unités cytosoliques et donc l'assemblage du complexe. A forte dose, l'apocynine peut inhiber l'activité de NOX4 et NOX5 qui ne sont pourtant pas des isoformes à activité sous-unité dépendantes (Ellmark et al., 2005; Rouhanizadeh et al., 2005). Cependant, son utilisation est complexe car certaines études rapportent qu'elle peut stimuler la production de ROS dans les cellules non phagocytaires (Riganti et al., 2006).

4.1.3. AEBSF

Le 4-(2-aminoéthyl)benzenesulfonylfluoride, ou AEBSF est un inhibiteur de protéases à sérine. Son activité inhibitrice de l'activité NADPH oxydase phagocytaire se fait en empêchant l'activation/translocation de $p47^{phox}$. Son effet inhibiteur n'est pas directement dirigé sur les oxydases, mais est plutôt une conséquence de son activité inhibitrice des

protéases à sérine qui doit lui conférer d'autres multiples effets sur d'autres systèmes (Cifuentes-Pagano et al., 2012).

4.1.4. Néopterine

La néopterine est un produit catabolique du GTP synthétisé par les macrophages. Elle inhibe la NADPH oxydase phagocytaire, mais n'est pas spécifique et peut même augmenter la production d'oxygène singulet, d'oxyde nitrique et de radicaux hydroxyles (Razumovitch et al., 2004).

4.1.5. Les inhibiteurs peptidiques

Le développement d'inhibiteurs peptidiques des oxydases est actuellement en plein essor. Il repose sur le développement de peptides capable d'interagir avec les sous-unités des complexes oxydases pour perturber le bon assemblage nécessaire à leur fonction. Les sous-unités peuvent être précisément ciblées, laissant espérer un gain en spécificité pour ce type d'inhibiteurs. Le problème principal de cette stratégie reste la distribution des peptides inhibiteurs qui doit se faire sans qu'ils ne soient dégradés.

Dans le même esprit, un screening de banques de petites molécules inhibitrices est une autre alternative en plein essor. La petite molécule VAS2870 et son dérivé VAS3947 ont été décrit comme inhibant l'activité oxydase (ten Freyhaus et al., 2006; Wind et al., 2010). Cependant, ils ne semblent pas « isoforme sélectifs ». D'autres molécules en cours de caractérisation semblent avoir des effets inhibiteurs plus spécifiques des oxydases avec des effets isoforme dépendants (Gkt136901, ML171, Celastrol). Ils restent cependant plus à l'étape de caractérisation que reconnus et utilisés de façon courante.

4.2. Aspects critiques de l'inhibition des oxydases

Le problème de la spécificité des inhibiteurs des oxydases est majeur. Il n'existe pas d'inhibiteur ne ciblant que les oxydases, sans effets collatéraux sur d'autres systèmes enzymatiques. De plus les inhibiteurs « isoforme spécifique » qui permettraient une description détaillée de la contribution de chaque type d'oxydase sont encore rares et majoritairement en phase de caractérisation.

L'inhibiteur le plus couramment utilisé encore aujourd'hui reste le DPI, malgré son spectre très large inhibant toutes les oxydases et d'autres flavoprotéines. Il semble que dans la mesure du possible, le meilleur moyen de disséquer l'activité oxydase dans les cellules non phagocytaires reste l'analyse des isoformes exprimées dans le tissu étudié complétée

ponctuellement par l'usage de siARN ou shARN. Cette méthode permet d'observer la contribution de chaque isoforme par l'extinction spécifique de son expression ou de plusieurs isoformes simultanément en cas d'extinction d'une sous-unité régulatrice commune à différentes isoformes.

Chapitre 2 : Les ROS dans l'hématopoïèse normale et leucémique

1. Généralités sur l'hématopoïèse

L'hématopoïèse correspond à la production continue et régulée de la totalité des cellules sanguines (de *haimatos* : sang et *poieim* : créer). Elle assure la présence et l'équilibre de tous les composants du tissu hématopoïétique (érythrocytes, plaquettes, leucocytes) durant toute la vie de l'individu. Les cellules matures ont une durée de vie limitée. Une production continue est donc nécessaire pour compenser leur perte et ainsi assurer l'homéostasie hématopoïétique. Tout dérèglement de cet équilibre impacte l'organisme. Une production trop faible de cellules mature est responsable d'anémie ou leucopénie (globule blancs). A l'inverse un excédent de production peut être responsable de pathologies comme les syndromes myéloproliferatifs. En dehors de cet aspect strictement quantitatif, la bonne qualité des cellules matures produites est également essentielle. Un défaut de différenciation peut être à l'origine de syndromes myélodysplasiques et de leucémies.

Chez le fœtus les lieux principaux de l'hématopoïèse sont le foie et la rate. A l'âge adulte, les foyers d'hématopoïèse sont la moelle osseuse des os plats (sternum, sacrum, côtes, vertèbres) et les épiphyses des os longs. En effet, seule la moelle dite « rouge », riche en cellules myéloïdes et vaisseaux sanguins est active au niveau hématopoïétique. Les moelles dites « jaunes » en raison du remplacement des cellules hématopoïétiques par des adipocytes et « grises » où les adipocytes ont disparu au profit d'un tissu conjonctif fibreux perdent ainsi leur capacité de production de cellules hématologiques. L'os est constitué d'un tissu osseux compact et d'un tissu osseux spongieux. Le tissu compact forme la structure solide de l'os. Le tissu spongieux est retrouvé dans les os courts, les os plats et les épiphyses des os longs. Il occupe en partie la cavité médullaire des ces os. Sa structure constitue un réseau tridimensionnel de cavités communicantes où se trouve la moelle osseuse siège de l'hématopoïèse dans les niches hématopoïétiques.

De façon classique, l'hématopoïèse se présente comme un *continuum* de 4 compartiments : les cellules souches, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures (Figure 22) (Metcalf, 2007; Osawa et al., 1996a; Szeto, 2006). L'hématopoïèse trouve son

origine dans des cellules primitives dites cellules « souches ». Ces cellules souches hématopoïétiques (CSH) ont trois caractéristiques remarquables : la capacité d'auto-renouvellement, la capacité de différenciation et la capacité à régénérer *in vivo* tous les lignages hématopoïétiques. Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine de toutes les cellules sanguines circulantes. Lorsqu'une CSH s'engage en différenciation, ce processus génère des progéniteurs pluripotents, qui vont continuer leur différenciation au cours de divisions successives jusqu'à devenir monopotents, puis devenir des précurseurs hématopoïétiques qui terminent leur maturation avec l'acquisition des molécules spécifiques nécessaires à leur fonction de cellules matures circulantes.

Le système hématopoïétique regroupe ainsi une population de cellules hétérogènes mais hiérarchisées selon leurs capacités de différentiation et d'auto-renouvellement.

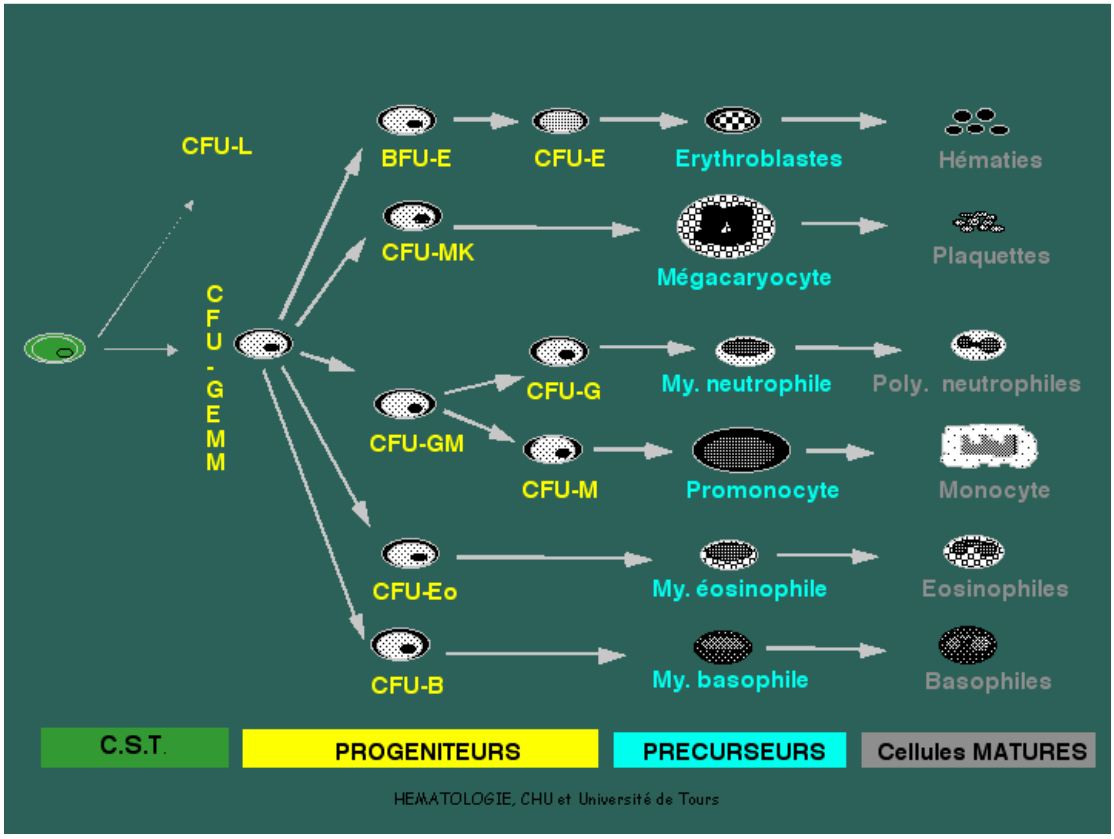


Figure 22 : Hématopoïèse.

Récapitulatif des étapes de l'hématopoïèse qui se déroulent à partir de la cellule souche hématopoïétique jusqu'à l'obtention des cellules matures des différents lignages. (http://fmc.med.univ-tours.fr)

1.1.Les CSH

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ne sont pas identifiables par de simples critères morphologiques. Elles répondent aux 3 critères d'auto-renouvellement, de potentialité de différentiation en cellules myéloïdes et lymphoïdes (multipotence) et de reconstitution à long terme de l'hématopoïèse chez un animal aplasié par irradiation ou chimiothérapie (Robert-Richard et al., 2006).

La CSH est à l'origine de tous les lignages hématopoïétiques (Figure 22). Le maintien d'un stock constant de CSH est donc strictement nécessaire au déroulement de l'hématopoïèse durant toute la vie de l'individu. La conservation de ce pool résulte ainsi en un mécanisme complexe reposant sur les équilibres entre survie/apoptose, prolifération/quiescence, auto-renouvellement/différenciation.

La majorité des CSH sont quiescentes. Cet état les protège des agressions extérieures comme les radiations (Mauch et al., 1995) et les chimiothérapies. De la même façon, cet état préserve l'intégrité de leur génome en limitant les risques d'altérations liés aux réplications. Pour ces raisons, il existe plusieurs modèles complémentaires de division des CSH : la division symétrique, où la cellule mère donne deux CSH identiques et la division asymétrique où la CSH produit, une CSH conservant ses propriétés d'auto-renouvellement et une cellule fille qui s'engage en différenciation (progéniteur) (Kiel et al., 2005; Morrison and Kimble, 2006). Deux hypothèses non exclusives sont proposées pour expliquer l'asymétrie lors de cette division. Un premier modèle dit déterministe ou extrinsèque propose que la différenciation des CSH est orientée par des signaux extérieurs (cytokines, molécules d'adhésion) (Muller-Sieburg et al., 2002). C'est donc un modèle qui repose sur l'exposition des deux cellules filles à des environnements différents (Wilson and Trumpp, 2006) impliquant donc le micro-environnement. A l'inverse le modèle stochastique ou intrinsèque serait en faveur d'une différenciation des CSH régulée par l'expression aléatoire d'un programme génétique spécifique de chaque lignage (Ogawa, 1993). Il est donc basé sur un mécanisme pré-divisionnel responsable d'une distribution inégale des constituants cellulaires aux cellules filles.

Grâce à cette capacité essentielle d'auto-renouvellement les CSH sont les seules cellules capables de restaurer et maintenir l'hématopoïèse durant toute la vie (Long Term-CSH, LT-CSH) (Guenechea et al., 2001). Cependant, le terme CSH est aussi souvent utilisé pour décrire des cellules capables de restaurer l'hématopoïèse à court terme, durant quelques semaines (Short Term-CSH, Short Term CSH) (Guenechea et al., 2001). Les ST-CSH, moins

primitives, présentent une capacité d'auto-renouvellement limitée ne permettant pas de rétablir l'hématopoïèse définitivement, mais seulement jusqu'à leur disparition. Elles sont un intermédiaire entre la CSH au sens propre et le progéniteur pluripotent. Leur existence montre bien la continuité du processus de différenciation des cellules hématopoïétiques et illustre la difficulté à définir de façon nette les bornes de chaque compartiment.

1.2. Les progéniteurs hématopoïétiques

Lors de la division asymétrique d'une CSH, la cellule fille qui s'engage en différenciation est un progéniteur multipotent lymphoïde (Common Lymphoid Progenitor, CLP) ou myéloïde (Common Myeloid Progenitor, CMP ou CFU-Granuleuse/ Erythrocytaire/ Macrophagique/ Mégacaryocytaire, CFU-GEMM ou Colony Forming Unit-Mixte CFU-Mixte).

Les progéniteurs ont perdu la capacité d'auto-renouvellement. Au contraire, ils possèdent une grande capacité de prolifération. Ils réalisent leur différenciation progressive au cours de leur divisions jusqu'à devenir des progéniteurs bi-potents puis uni-potents. Les progéniteurs érythroïdes et mégacaryocitaires sont issus d'un progéniteur bi-potent commun qui évolue soit en progéniteur érythroïde (Burst Forming Unit-Erythroid, BFU-E) puis CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) soit en progéniteur mégacaryocytaire BFU-MK puis CFU-MK. Les progéniteurs des neutrophiles et des monocytes et macrophages suivent le même procédé. Ils sont eux issus du progéniteur bi-potent CFU-GM (CFU-Granulo-Macrophagique) qui se différencie en progéniteur CFU-G (CFU-Granulocytaire) vers le lignage neutrophile et progéniteur CFU-M (CFU-Macrophagique) vers les monocytes. De la même façon on distingue des progéniteurs éosinophiles (CFU-Eosinophile) et basophiles (CFU-Basophile). Concernant le lignage lymphoïde la cellule lymphoïde bi-potente (CLP) est à l'origine des pro-B et pro-T puis des différents lymphocytes (Figure 22).

1.3. Les précurseurs hématopoïétiques

Les précurseurs hématopoïétiques sont assez différenciés pour être morphologiquement identifiables et sont caractérisables par myélogramme (frottis de moelle). Ils représentent la plus grande part de la population médullaire. Ils n'ont plus aucune capacité d'auto-renouvellement et leur prolifération est considérablement réduite (environ 5 mitoses avant d'atteindre le stade de la cellule mature). Ils sont définitivement engagés dans une seule et unique lignée sanguine. Ils possèdent déjà le phénotype et les capacités fonctionnelles correspondant à leur lignage. Leur différentiation finale fournit l'ensemble des cellules

myéloïdes sanguines : basophiles, éosinophiles, érythrocytes, plaquettes, granulocytes, monocytes et macrophages (Figure 22).

1.4. Les cellules matures

Les cellules matures passent de la moelle vers le sang. Elles sont incapables de se diviser, sauf les lymphocytes lors de leur activation. Elles ont une durée de vie limitée de quelques jours à semaines et exceptionnellement quelques années pour certains lymphocytes.

Les érythrocytes assurent le transport d'O_2 et CO_2 entre les organes et leur échange au niveau des poumons. Les plaquettes régulent l'hémostase. Les granulocytes atteignent les tissus où ils sont responsables de la défense immunitaire innée : les neutrophiles phagocytes certains pathogènes, les basophiles sécrètent des substances médiant la réaction d'hypersensibilité puis les éosinophiles phagocytent les complexes antigène/anticorps dans ce contexte d'hypersensibilité. Les monocytes migrent vers les tissus conjonctifs où ils deviennent des macrophages. Lors d'agressions pathogènes, ils sécrètent des cytokines de l'inflammation et phagocytent les agents pathogènes afin de les digérer et présenter leurs antigènes aux lymphocytes spécialisés dans la réponse immunitaire adaptative. Les lymphocytes T, B, NK assurent la défense spécifique, acquise et à long terme.

1.5. Caractérisation des cellules hématopoïétiques

A partir du stade précurseur, les cellules hématopoïétiques sont morphologiquement identifiables lors d'un myélogramme. La principale difficulté réside donc dans l'identification et la caractérisation des cellules hématopoïétiques primitives afin de définir leur degré de multipotence et leur capacité d'auto-renouvellement.

Pour se faire, la caractérisation de marqueurs antigéniques associés à la primitivité des cellules hématopoïétiques permet d'identifier des populations phénotypiques minoritaires dans lesquelles sont présents des CSH et des progéniteurs multipotents très primitifs. Malheureusement à ce jour, aucun de ces profils phénotypiques ne permet d'isoler de façon distincte toute les sous-populations. On parlera donc de populations enrichies en CSH par exemple.

Afin de révéler et quantifier la présence de chaque population hématopoïétique, il est nécessaire de passer par des tests de culture (*in vitro*) ou de greffe (*in vivo*). Cependant, là encore, une même cellule peut être révélée par différents tests de la même façon que deux cellules peuvent présenter les mêmes capacités pour un test donné et posséder des capacités différentes pour un autre test.

Cependant l'utilisation de ces méthodes a permis de schématiser l'hématopoïèse comme une hiérarchie de sous-compartiments : continus et non exclusifs, des la CSH pluripotente à la cellule mature.

1.5.1. Tests *in vivo*

Les tests *in vivo* reposent sur l'injection des cellules à analyser dans un modèle animal préalablement aplasié pour faciliter la prise de greffe.

Les CFU-S (Colony Forming Unit in the spleen) mettent en évidence dans des souris injectées avec des cellules médullaires murines syngéniques, des progéniteurs à forte capacité prolifération générant en une à deux semaines des colonies macroscopique sur et dans la rate (Till et al., 1964a). Chaque colonie ne dérive que d'une unique cellule, mais peut être composée de plusieurs types cellulaires. Le temps mis par la colonie à apparaitre renseigne sur la primitivité de la cellule (Till and Mc, 1961). Les CFU-S apparaissant au 8ème jour ne contiennent qu'un seul type de cellules, elles sont issues de progéniteurs tardifs. Les colonies visibles au 14ème jour contiennent souvent plusieurs lignages, elles sont issues de progéniteurs plus précoces (Magli et al., 1982). Les cellules indentifiées par le test de CFU-S contiennent une minorité de cellules capable de reconstituer l'hématopoïèse à long terme témoignant d'un caractère souche (Siminovitch et al., 1963; Till et al., 1964b).
Les CFU-S correspondent ainsi à une population hétérogène contenant majoritairement des progéniteurs à différents degrés d'engagement et une minorité de CSH.

Les cellules avec un potentiel MRA (Marrow Repopulating Ability) et LTRA (Long Term Repopulating Ability) sont des CSH murines. Les cellules MRA reconstituent rapidement l'hématopoïèse chez un premier receveur. Les cellules LTRA sont capables de reconstituer l'hématopoïèse chez une deuxième génération de receveurs (Morrison and Weissman, 1994). Ces cellules peuvent restaurer une hématopoïèse physiologique chez le receveur car elles sont capables de s'auto-renouveler. Les cellules LTRA sont beaucoup plus rares que les cellules MRA. Elles diffèrent donc par leur capacité d'auto-renouvellement limité (MRA) ou prolongé (LTRA).

Enfin, l'utilisation de lignées de souris à système immunitaire affaibli (NOG) a permis des études de prise de greffe après plusieurs mois. De cette façon, des CSH humaines, primitives, multipotantes et douées d'auto-renouvellement appelées SRC (Dick, 1996a). Deux sous-populations en ont été isolées. Une sous-population dite ST-SRC (Short Term-SRC) permet de reconstituer l'hématopoïèse pour une durée maximale de deux mois tandis qu'une sous-population dite LT-SRC (Long Term SRC) reconstitue définitivement l'hématopoïèse. On les

distingue par leur incapacité (ST-SRC) ou leur capacité (LT-SRC) à reconstituer l'hématopoïèse de receveurs successifs.

1.5.2. Tests *in vitro*

Les tests *in vitro* consistent à provoquer la prolifération et la différenciation des cellules à analyser. Le temps mis par les cellules à atteindre un stade morphologiquement caractérisable permet de déterminer leur primitivité.

Les CFC (Colony Forming Cell), qui ont la capacité de former des colonies sont mises en culture en milieu semi-solide, elles correspondent à des progéniteurs (Bradley and Metcalf, 1966). L'aspect de la colonie est utilisé pour définir la lignée dans laquelle la cellule à son origine est engagée. Ce type de test permet de révéler des progéniteurs : CFU-Mk, CFU-E ou BFU-E, CFU-GM, CFU-G, CFU-M. Il permet aussi de révéler des colonies composées de plusieurs types cellulaires qui sont donc issues de progéniteurs plus immatures : CFU-Mix ou CFU-GEMM.

Le nombre de cellules de la colonie, leur type et le temps de culture nécessaire à l'obtention de cellules matures dans la colonie sont le reflet du niveau de primitivité du progéniteur à son origine. Le développement des divers types de colonies est dépendant du contenu en cytokines du milieu de culture. Il est possible d'identifier la population en amont des CFC par une phase de culture liquide permettant au pré-CFC d'atteindre le stade CFC avant leur dépose en milieu semi-solide.

Les LTC-IC (Long Term Culture Initiating Cell) sont des cellules plus immatures que les pré-CFC. Leur mise en évidence repose sur une période de 5 semaines de culture liquide, durant lesquels les progéniteurs les moins primitifs disparaissent, mais sur une couche de cellules nourricières. Cette couche nourricière est issue de moelle osseuse fraiche (Dexter et al., 1977; Gartner and Kaplan, 1980) ou de lignées stromales du type MS-5. Ces cellules permettent de fournir des facteurs de croissance, des cytokines et de présenter des molécules d'adhésion nécessaires à la prolifération de la population hématopoïétique. A la fin des 5 semaines de culture liquide, la fréquence des CFC est évaluée par implantation en milieu semi-solide.

Les CAFC (Cobbelstone Area Forming Cell) sont les cellules capables après une longue co-culture en dilution limite de développer des colonies sous la couche de cellules stromales qui les soutiennent.

1.5.3. Utilisation des marqueurs de surface

Il n'existe pas de marqueurs phénotypiques permettant d'isoler spécifiquement les CSH ou les progéniteurs. Par contre, la combinaison associant la présence et/ou l'absence de plusieurs marqueurs permet d'obtenir des populations enrichies en cellules à ces stades (Figure 23).

Le CD34 (Cluster of Differentiation 34) est le marqueur le plus connu (Andrews et al., 1986). C'est une glycoprotéine de la famille des sialomucines. Il pourrait être impliqué dans l'adhérence (Drew et al., 2005) ou dans la régulation de la différenciation (Nakamura et al., 1993). La population $CD34^+$, positive pour ce marqueur est très hétérogène. Elle est composée de CFC, LTC-IC et de cellules capables de reconstituer un système hématopoïétique (Chabannon, 2005). Malheureusement, toutes les CSH ne sont pas $CD34^+$. Il existe en effet parmis la population $CD34^-$ une population capable de greffe (Lagadinou et al., 2013). Cette population SRC-CD34- est plus importante chez la souris, ou le CD34 est donc un marqueur de CSH moins utilisé (Okuno et al., 2002).

Le CD38 est un marqueur souvent utilisé en complément du CD34. Son expression est réversible selon l'état d'activation des CSH (Tajima et al., 2001). A l'inverse du CD34, une déplétion du CD38 est utilisée pour enrichir une fraction en CSH car il ne serait pas présent à la membrane des cellules les plus primitives (Novelli et al., 1998). La combinaison $CD34^+$ $CD38^-$ est donc souvent utilisée pour sélectionner une fraction enrichie en CSH.

La combinaison des marqueurs c-kit (CD117), Lin^- (lineage minus), Sca-1 (Stem Cell Antigen 1) est aussi fréquemment utilisée pour obtenir une fraction enrichie en CSH et progéniteurs précoces dite KLS. Le c-kit est le récepteur au SCF (Stem Cell Factor) dont l'expression diminue au cours de la différenciation (Sharma et al., 2006). La sélection Lin^- permet d'éliminer les cellules engagées qui expriment des marqueurs spécifiques de leur différenciation. L'antigène Sca-1 est présent sur les CSH et les progéniteurs précoces, et disparait très rapidement lors de l'engagement. La combinaison de ces trois marqueurs pour sélectionner une population Lin^- $Sca\text{-}1^+$ $c\text{-}kit^+$ permet d'obtenir les cellules dites KLS (Osawa et al., 1996b).

Le CD90 ou Thy1 est un marqueur faiblement exprimé par les cellules capables de reconstitution. Il contribue aux mécanismes d'adhésion et de migration (271) est est plus exprimé par les cellules engagées. Pour enrichir une fraction en CSH, il est souvent couplé à la sélection Lin^- $Sca\text{-}1^+$ pour définir la population Lin^- $Sca\text{-}1^+$ Thy^{low}(Spangrude and Brooks, 1992).

Le CD133 est aussi un marqueur fortement exprimé par les cellules hématopoïétiques primitives qui disparait lors de la différenciation (Muller-Sieburg et al., 1986). Il peut donc aussi être utilisé en combinaison avec d'autres marqueurs.

Enfin, le CD34 étant peut utilisé chez la souris, il a été mis en évidence une famille de marqueurs Slam incluant entre autre le CD150, le CD48 et le CD244. La population $CD150^{+}$ $CD48^{-}$ $CD244^{-}$ est la plus enrichie en CSH et progéniteurs primitifs. Le couplage de marqueurs Slam permet donc lui aussi de déterminée une fraction enrichie en CSH (Kiel et al., 2005).

Les principaux marqueurs exprimés au cours de l'hématopoïèse sont résumés dans la figure 23.

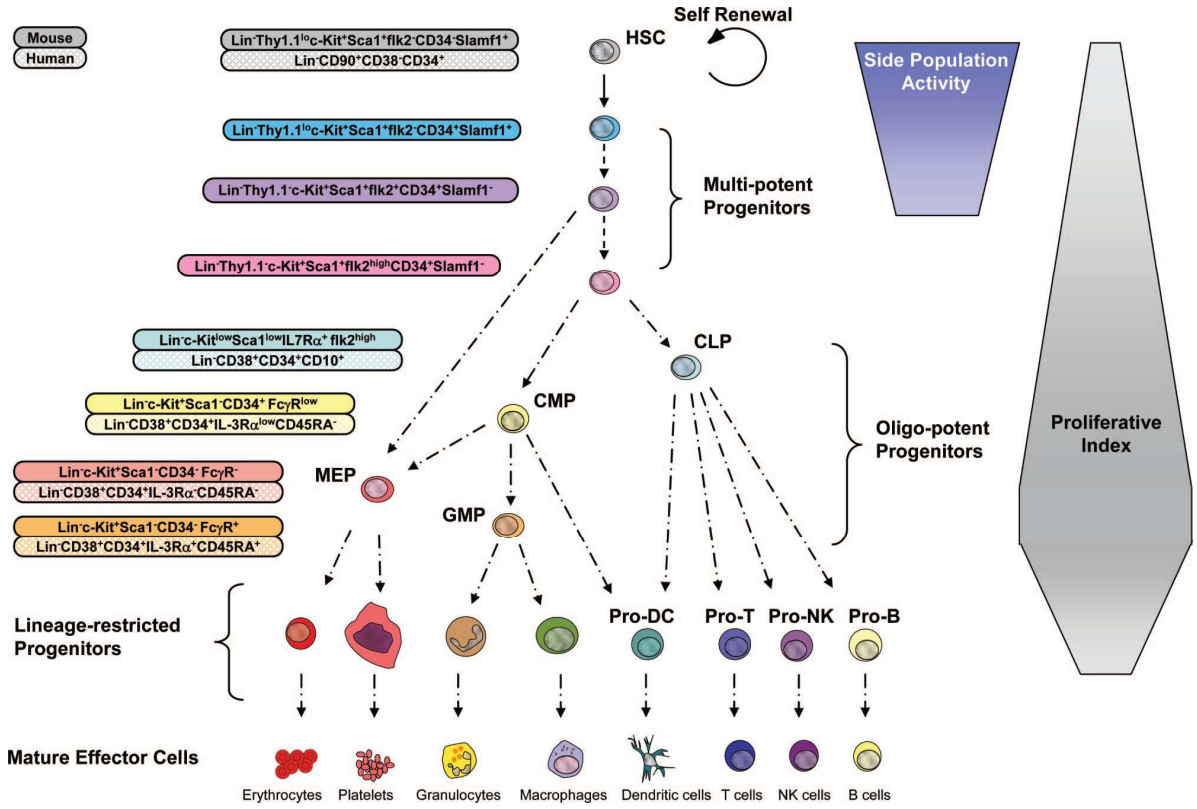


Figure 23 : Evolution de l'expression des marqueurs de surfaces au cours de l'hématopoïèse. (Bryder et al., 2006)

2. Microenvironnement et concept de niche hématopoïétique

L'homéostasie du système hématopoïétique est régulée par deux relations fondamentales « auto-renouvellement et différenciation » et « quiescence et prolifération » des CSH. Les

paramètres de cet équilibre sont finement régulés par les interactions existant entre les CSH et leur microenvironnement médullaire au sein de structures appelées niches hématopoïétiques (Schofield, 1978). En ce sens, le terme de niche regroupe les constituants non hématopoïétiques de la moelle osseuse, incluant une composante cellulaire et une composante moléculaire.

2.1. Composante cellulaire du microenvironnement

La composante cellulaire du microenvironnement comporte différents types cellulaires. La présence de cellules d'apparence fibroblastique formant des colonies sur support plastique a été décrite après culture de cellules issues de moelle osseuse (Friedenstein et al., 1974). La transplantation de ces cellules permet de régénérer le microenvironnement hématopoïétique. Elles sont multipotentes et peuvent se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes(Bianco et al., 2008; Pittenger et al., 1999). Ces cellules sont appelées CSM, pour Cellules Souches Mésenchymateuses ou plus récemment Cellules Stromales Multipotentes (Caplan, 1991; Horwitz et al., 2005).

Les autres types cellulaires appartenant au microenvironnement sont les ostéoblastes et ostéoclastes, les adipocytes, les cellules vasculaires musculaires lisses et les cellules endothéliales. Les ostéoblastes sont étroitement liés aux CSH les plus primitives en particulier par leur synthèse d'une protéine matricielle, l'ostéopontine(Nilsson et al., 2005). De plus, les ostéoblastes sécrètent de nombreuses cytokines régulatrices de l'hématopoïèse. Certaines en sont activatrices : le Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (G-CSF), le Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), les interleukines 1B et 6, le Leukemia Inhibitory Factor (LIF) et le Tumor Necrosis Factor α (TNFα). D'autres en sont inhibitrices comme le Tumor Growth Factor β (TGFβ)(Taichman and Emerson, 1998). Les ostéoclastes ont aussi un rôle dans l'hématopoïèse puisqu'un inhibiteur de leur fonction de résorption osseuse réduirait le nombre de CSH *in vivo*(Lymperi et al., 2011).

Les adipocytes, caractérisés par leur contenu riche en vacuoles lipidiques cytoplasmiques sont des régulateurs négatifs de l'hématopoïèse. Il a été mis en évidence que les adipocytes bloquent la granulopoïèse en inhibant la production de G-CSF (Belaid-Choucair et al., 2008). En complément il a été démontré que chez des souris irradiées, l'inhibition de l'adipogénèse accélérait significativement la reconstitution hématopoïétique.

Après culture *in vitro* des cellules du stroma, la majorité des cellules a une apparence fibroblastique et présente des marqueurs d'engagement dans la voie de différenciation vasculaire musculaire lisse (Friedenstein et al., 1974). Ces cellules expriment différentes molécules d'adhérence dont les intégrines B1 et le récepteur à l'acide hyaluronique (CD44). Elles contribuent à la synthèse de nombreuses protéines de matrice (fibronectine, vitronectine, laminines B1 et B2, collagènes I, II, IV et acide hyaluronique) et produisent des cytokines soutenant l'hématopoïèse (Li et al., 2000).

Enfin les cellules endothéliales médullaires interviennent dans les mécanismes de prolifération et différenciation des cellules hématopoïétiques (Jazwiec et al., 1998; Rafii et al., 1995) et contribueraient à la régulation de l'hématopoïèse. Ces cellules sécrètent des cytokines (IL-6, GM-CSF, SCF) régulant les CSH (Li et al., 2000). Ces cellules endothéliales ont aussi une fonction importante en fin d'hématopoïèse lors du passage entre compartiment hématopoïétique et circulation sanguine. Les vaisseaux médullaires sont des sinus de petite taille, bordés de cellules endothéliales et cellules vasculaires musculaires lisses. Leur lame basale est discontinue. La migration des cellules matures aurait lieu à travers des pores ouverts par les cellules endothéliales. Ce processus de migration trans-endothéliale aurait lieu également lors de la mobilisation de CSH dans le sang périphérique et inversement lors de leur retour (domiciliation) dans la moelle osseuse.

2.2. Composante moléculaire du microenvironnement

Le microenvironnement comprend aussi une importante composante acellulaire dite moléculaire. Elle est composée des molécules insolubles (protéines matricielles, molécules d'adhérence, et enzymes matricielles) et de molécules solubles (cytokines, chimiokines). Les glycoprotéines de la matrice extra-cellulaire (MEC), collagènes, fibronectines, laminines favorisent l'adhérence des CSH et ont une fonction complémentaire de fixation et présentation des facteurs solubles aux CSH (Long et al., 1992; Prockop, 1997).

Les molécules d'adhérence intercellulaires favorisent les interactions entre CSH et autres types cellulaires du microenvironnement (Papayannopoulou et al., 1995; Scott et al., 2003; Zohren et al., 2008). Les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire sont en majorité des métalloprotéases (MMP) (Visse and Nagase, 2003) et des sérines protéases (Delgado et al., 2001; Lévesque et al., 2001) qui interviennent dans le remodelage de la MEC et lui confèrent un aspect dynamique dans sa composition.

Certaines chimiokines interviennent dans la régulation de l'hématopoïèse (Broxmeyer et al., 1990; Nagasawa et al., 1994; Tashiro et al., 1993). Le couple CXCL12/CXCR4 en particulier à un rôle dans la migration et la mobilisation des CSH. Les CSM, les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques expriment CXCL12. Son récepteur, CXCR4 (CD184) est exprimé par les cellules hématopoïétiques, favorise leur ancrage et leur maintien en quiescence (Nie et al., 2008). CXCL12 est un chimioattractant très efficace sur les cellules hématopoïétiques qui expriment son récepteur (Aiuti et al., 1997). Ce couple chimiokine/récepteur a un rôle clé dans la migration (Möhle et al., 1998; Wright et al., 2002). Certaines cytokines augmentant l'expression de CXCR4 dans les cellules $CD34^+$ feraient augmenter significativement la migration induite par CXCL12 *in vitro* et la domiciliation (homing) dans des modèles animaux. A l'inverse dans les modèles *in vivo*, le blocage de CXCR4 diminue significativement la domiciliation et la reconstitution à partir de population $CD34^+$ (Kollet et al., 2001; Peled et al., 1999). De plus l'influence de l'interaction de ces protéines a été mise en évidence dans le traffic des progéniteurs hématopoïétiques (Zhang et al., 2003) et la migration trans-endothéliale des CSH (Peled et al., 2000).

Les cytokines sont des glycoprotéines synthétisées par les cellules hématopoïétiques et stromales. Elles peuvent agir présentées à la membrane cellulaire et sécrétées libres dans le milieu bordant les cellules ou sécrétées puis liées à la MEC. Les cytokines sont impliquées dans la régulation de la prolifération, de la survie et de la différenciation des cellules hématopoïétiques. Certaines sont des régulateurs positifs, qui favorisent l'hématopoïèse en favorisant la survie, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques. On compte parmi eux la famille des Colony Stimuling Factor (CSF) qui sont capables de former des colonies de cellules hématopoïétiques et servent à réguler la production des différents types de cellules matures selon les besoins de l'organisme. On compte aussi les interleukines (IL) qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire et immunitaire, et stimulent l'hématopoïèse. On différencie des molécules qui agissent sur les progéniteurs moins différenciés et n'ont donc pas une action limitée à un lignage donné (GM-CSF, IL3), et les molécules qui ont une action restreinte à un lignage spécifique (EPO, IL5). On associe aussi aux cytokines, les facteurs synergiques qui seraient indispensables à l'entrée en cycle des CSH comme le Stem Cell Factor (SCF). Il existe enfin certaines cytokines à action inhibitrice de l'hématopoïèse comme le TNFα, l'INFγ et le TGFβ. L'équilibre entre cytokines activatrices et inhibitrices offre une large potentialité de régulation des étapes de l'hématopoïèse qui permet une régulation adaptée durant toute la vie d'un individu aux besoins de son organisme.

2.3. Le concept de niche hématopoïétique

La description de tous ces composants introduit le concept de niche hématopoïétique siège géographique d'interactions entre cellules hématopoïétiques et microenvironnement (Figure 24). Au sein de cette structure, les cellules hématopoïétiques souches, et en maturation établissent un contact étroit avec les cellules stromales et le microenvironnement qu'elles construisent. Les cellules stromales, par leurs sécrétions et grâce aux fonctions du réseau matriciel qu'elles ont constitué influencent le devenir des CSH entre auto-renouvellement et engagement en différenciation. Elles constituent un environnement favorable à la survie, la prolifération et la différenciation des CSH. Ces actions sont médiées par leur molécules d'adhérence (Papayannopoulou et al., 1995), leurs récepteurs aux cytokines (Coulombel et al., 1983; Rafii et al., 1997), leurs sécrétions de cytokines (Li et al., 2000; Möhle et al., 1998) et chimiokines (Lataillade et al., 2002) et la construction de la MEC (Lerat et al., 1993) (Figure 25).

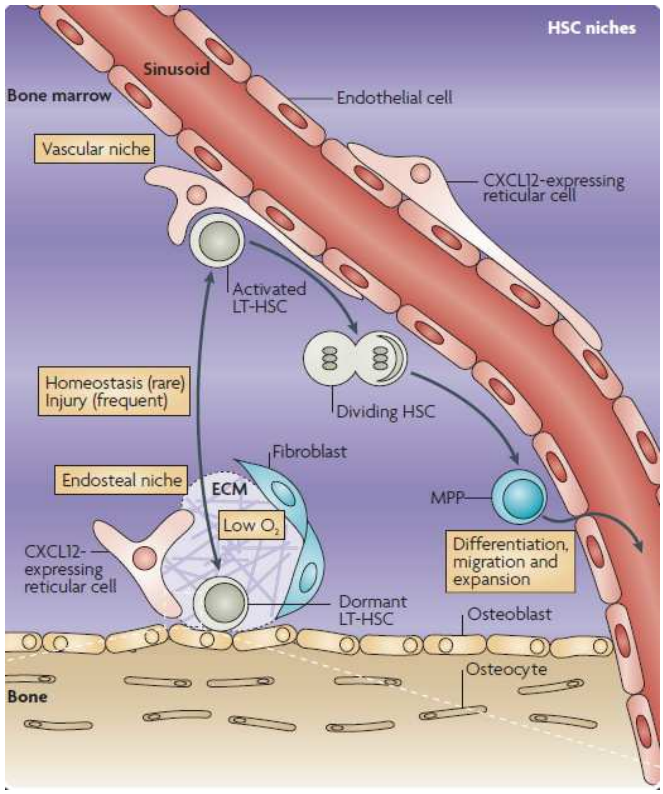


Figure 24 : La niche hématopoïétique (Graf and Trumpp 2007)

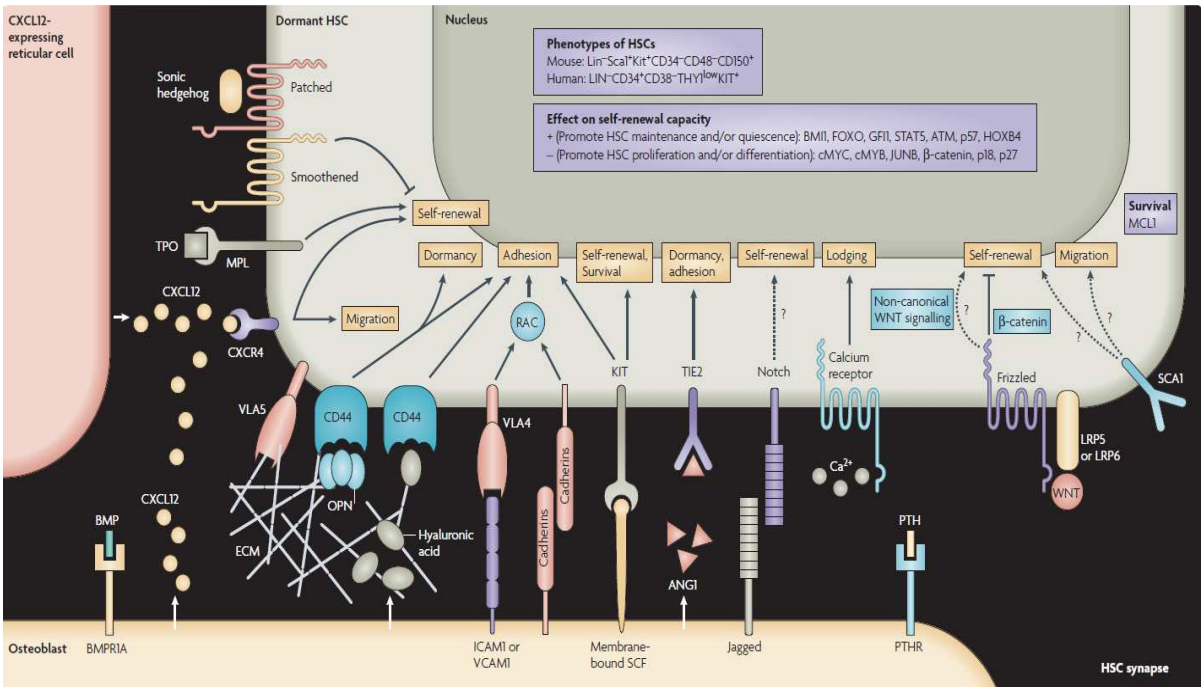


Figure 25 : Interactions au sein de la niche hématopoïétique (Graf and Trumpp 2007)

La mise en évidence de ce concept a été complétée par des observations anatomiques en particulier de biopsies osseuses. Ces études ont mis en évidence une localisation des cellules hématopoïétiques dans des logettes situées entre les trabécules osseux. Dans ces logettes on observe les cellules hématopoïétiques accompagnées d'adipocytes, de cellules endostéales et de structures vasculaires. Ces vaisseaux permettent l'échange entre le compartiment médullaire et la circulation sanguine. Les cellules endothéliales régulent cet échange, aussi bien dans le cas de la sortie des cellules matures, que de la domiciliation des CSH (Tavassoli and Hardy, 1990). Nilsson a mis en évidence chez des souris irradiées une différence de localisation spaciale entre CSH et progéniteurs lors de la réinstallation. Les CSH sont localisées préférentiellement dans la région endostéale, contrairement à leurs descendantes qui migrent vers le centre de la cavité osseuse pendant leur maturation (Nilsson et al., 1997; Nilsson et al., 2001). Ces observations suggèrent l'existence de deux niches au sein de la moelle osseuse, la niche endostéale et la niche vasculaire qui semblent différer dans leur rôle et leur composition.

La niche endostéale ou niche ostéoblastique est le domaine des CSH. Elle est riche en ostéoblastes et ostéoclastes qui permettent un remodelage constant du tissu osseux. Il est montré *in vitro* que des ostéoblastes ou des lignées cellulaires ostéoblastiques soutiennent l'hématopoïèse en culture (Taichman and Emerson, 1996, 1998; Taichman et al., 2000). Il a

été montré que les CSH restent quiescentes dans la niche ostéoblastique. Des molécules de surface des ostéoblastes (N-cadhérine, angiopoïétine-1, thrombopoïétine) interagissent avec leurs récepteurs respectifs (N-cadhérine, tyrosine kinase Tie-2, Mpl) présents à la membrane des CSH. Ces interactions contribuent à réguler l'état quiescent des CSH (Arai et al., 2004; Wilson et al., 2007; Zhang et al., 2003). En complément un rôle important des ostéoblastes et ostéoclastes sur le maintien des CSH *in vivo*. La surexpression du récepteur (PPR) à l'hormone para-thyroïdienne (PTH) dans les ostéoblastes est responsable d'une augmentation de la fréquence en CSH dans la moelle osseuse (Calvi et al., 2003). De même il a été montré que l'inactivation du récepteur à la Bone Morphogenic Protein (BMP) augmente le nombre d'ostéoblastes présents dans la moelle osseuse en corrélation avec une augmentation du nombre de LT-HSC (Zhang et al., 2003). La dynamique du modèle osseux repose sur l'équilibre de l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes. Un rôle des ostéoclastes a également été mis en évidence dans la régulation de la quiescence des CSH. En effet un inhibiteur de la résorption osseuse, bisposphate alendronate, utilisé *in vivo* est responsable d'une diminution du stock de CSH.

En ce sens, la niche ostéoblastique est considérée comme un système protecteur des CSH, permettant la régulation de leur auto-renouvellement pour répondre aux besoins de l'organisme et favorable à leur état de quiescence permettant de conserver le stock nécessaire de CSH. A l'inverse, la niche vasculaire, directement en continuité spatiale de la niche ostéoblastique, favoriserait la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques ainsi que leur passage vers la circulation sanguine (Abkowitz et al., 2003; Kopp et al., 2005). Différentes molécules dont CXCL12 et les facteurs de croissance de la famille des Fibroblast Growth Factor (FGF) sont impliquées dans la régulation de la niche vasculaire. Les CSH possèdent les récepteurs à différents FGF qui stimulent *in vitro* leur auto-renouvellement et leur prolifération. Un gradient décroissant de FGF-4 entre la niche vasculaire et la niche endostéale serait responsable de l'engagement des progéniteurs (Kopp et al., 2005). Enfin les cellules endothéliales qui bordent les vaisseaux sont l'interface entre niche et circulation sanguines. Elles seraient responsables du passage des cellules matures vers la circulation par diffusion trans-endothéliale (Figure 26). Il a été montré que FGF-4 serait par exemple responsable d'une augmentation d'expression de VLA-4 chez les progéniteurs mégacaryocytaires permettant une meilleure adhésion aux cellules endothéliales (Avecilla et al., 2004). A la différence de la niche endostéale, la niche vasculaire apparait comme le lieu

où viennent les CSH entrées en cycle, et où se déroule leur différentiation jusqu'au passage des cellules matures dans la circulation.

3. Influence de l'oxygène et des ROS sur l'hématopoïèse normale

3.1. Influence des basses concentrations en O_2 sur les cellules hématopoïétiques

Les niches leucémiques sont situées dans le tissu osseux, faiblement vascularisé. L'importance de la concentration en oxygène (O_2) a été étudié vis-à-vis de l'hématopoïèse et il a rapidement été mis en évidence que la concentration en O_2 joue un rôle majeur dans la prolifération et la différenciation des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques lorsqu'ils sont cultivés *in vitro* (McAdams et al., 1996). La prolifération des CFC (Colony Forming Cells) (Broxmeyer et al., 1990; Rich and Kubanek, 1982), des CSH et progéniteurs (Koller et al., 1992), et des granulocytes matures (Hevehan et al., 2000) est favorisée par une culture à faible pression partielle en O_2 (5%). Ces observations ont été renforcées par une étude de la saturation en O_2 dans la moelle osseuse, rapportée autour de 5% (Harrison et al., 2002). L'observation de l'hématopoïèse en culture *in vitro* a démontré une meilleure efficacité à des concentrations en O_2 comprises entre 1% et 3% (Danet et al., 2003; Ivanović et al., 2000). Ces observations paraissent en cohérence avec les résultats prédictifs obtenus par modélisation mathématique qui suggèrent une concentration en O_2 entre 5% et moins de 0,1% dans la moelle osseuse (Chow et al., 2001). De façon intéressante il est maintenant montré qu'une concentration en O_2 de 0,1% est responsable d'un retour en phase G0 chez des cellules $CD34^+$ en cycle (Hermitte et al., 2006). Associées, ces données suggèrent l'existence d'un gradient d'O_2 au sein de niches globalement hypoxiques (Parmar et al., 2007). Des cellules de moelle osseuse de souris ont été marquées *in vivo* selon leur niveau d'O_2. Différentes populations ont ainsi été isolées selon ce critère, puis transplantées chez des souris irradiées. Ces greffes ont montré que les cellules qui possèdent les plus faibles concentrations en O_2 sont des CSH capables de reconstituer une hématopoïèse fonctionnelle. En complément, cette population cellulaire présente des résultats supérieurs lors du marquage au pimonidazole, marqueur de l'hypoxie. Le travail sur des coupes de fémur de souris montre une localisation préférentielle des CSH à proximité de la surface endostéale corrélée a un marquage au pimonidazole plus fort (Kubota et al., 2008). Ces données suggèrent bien la présence d'un gradient d'O_2 dans la moelle osseuse avec de plus faibles concentrations au niveau de la niche endostéale. Ces

résultats ont conduit à l'étude de l'influence de la pression partielle en O_2 (pO_2) sur le niveau de ROS des cellules hématopoïétiques. Une première étude a comparé le niveau d'H_2O_2 sur des cellules murines KLS en culture hypoxique (1% O_2) et normoxique (21% O_2) sur une durée d'une nuit. Les cellules en condition hypoxique présentent un niveau d'H_2O_2 plus faible que les cellules conservées en normoxie (Skinner et al., 2008). Cette expérience a été reproduite sur des $CD34^+$ humains issus de sang de cordon, en culture pendant plusieurs jours à différentes pO_2. L'étude du niveau de H_2O_2 a là encore montré une corrélation avec la pO_2 imposée durant la culture (Fan et al., 2008).

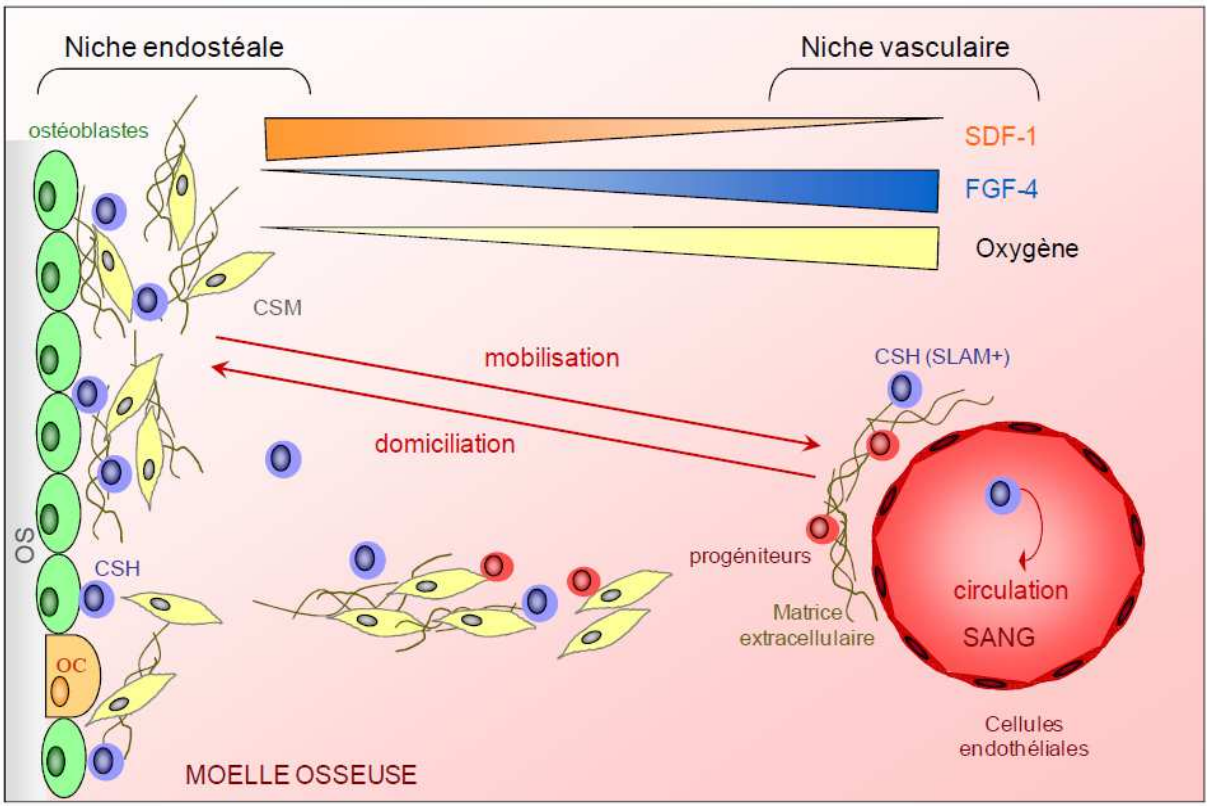


Figure 26 : Les niches hématopoïétiques de la moelle osseuse.

3.2. Influence des ROS sur l'auto-renouvellement des CSH

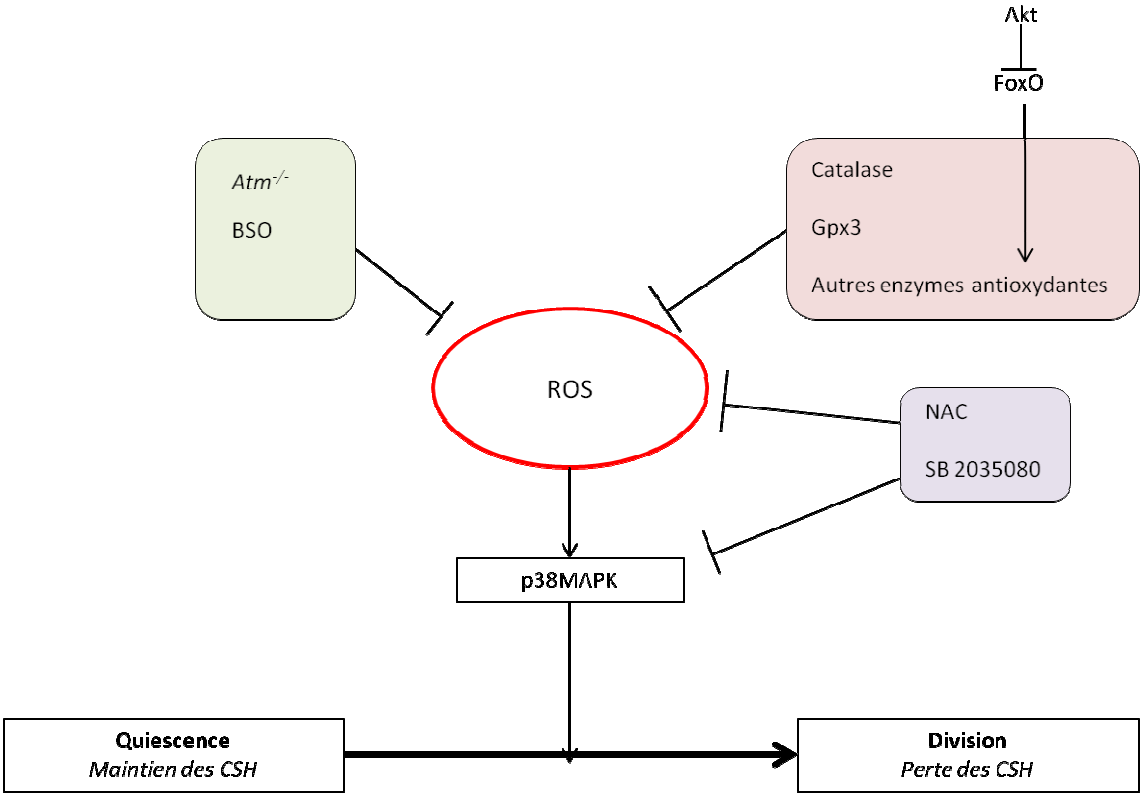
Les CSH sont douées d'auto-renouvellement. Ce mécanisme permet de maintenir durant toute la vie de l'individu un pool de CSH constant tout en répondant aux besoins quotidiens en cellules hématopoïétiques matures. Nous avons vu que ces CSH se situent préférentiellement au sein de la niche endostéale qui régule leur équilibre entre quiescence et entrée en cycle. Les données relatives à l'existence d'un gradient d'O_2 au sein de la niche ont

conduit à l'étude de l'influence des ROS sur le potentiel d'auto-renouvellement des CSH. Les études du groupe d'Ito ont été très instructives à ce sujet. Elles reposent sur l'utilisation de souris KO pour le gène *Ataxia telangiectasia mutated* (*Atm*) qui a pour fonction de préserver la stabilité génomique en stoppant le cycle cellulaire en cas de dommage à l'ADN ou de stress oxydatif (Barzilai et al., 2002). Il a observé une différence de niveau de ROS entre les cellules KLS de souris $Atm^{-/-}$ et $Atm^{+/+}$: les cellules $Atm^{-/-}$ ont un niveau de ROS supérieur (Figure 27). Cette augmentation du niveau de ROS s'amplifie avec les transplantations successives et se trouve corrélée à une diminution du nombre de cellules descendantes du greffon dans le sang périphérique du receveur. Cela correspond à une diminution de capacité à reconstituer une hématopoïèse à long terme. Le stress oxydatif des CSL $Atm^{-/-}$ est responsable d'un épuisement du pool de CSH qui sont engagées en mitoses, cet effet est concomitant d'une activation de p38MAPK. De plus l'utilisation de N-acétylcystéine (NAC), un antioxydant fournisseur de glutathion s'oppose à cet effet, de même que l'utilisation de SB203580, un inhibiteur de p38MAPK (Ito et al., 2004; Ito et al., 2006). Les travaux de Jang et Sharkis en 2007 vont dans le même sens. Ils ont trié des cellules de moelle osseuse murine en fonction de leur niveau de ROS, séparant une fraction ROS^{high} et une fraction ROS^{low}. Ils ont mis en évidence que les cellules $CD45^{+}$ Lin^{-} ROS^{low} sont capables de reconstituer l'hématopoïèse en transplantations successives à l'inverse de leur équivalent ROS^{high}. Cette fraction ROS^{low} présente des caractéristiques de CSH, exprimant plus de marqueurs d'immaturité et présentant une activation de p38MAPK diminuée (Jang and Sharkis, 2007).

Les mécanismes antioxydants sont un des leviers qui permettent de réguler le niveau de ROS cellulaires. L'effet de la catalase, qui dégrade H_2O_2 a été le premier étudié. Lors de cultures à long terme de progéniteurs murins sur stroma médullaire reconstitué, la supplémentation en catalase amplifie le pool de CSH (Gupta et al., 2006) (Figure 27). La catalase favorise le maintien de cellules KLS lors des trois premières semaines de culture. En complément, après transplantations successives, la reconstitution de l'hématopoïèse est meilleure en utilisant les cellules exposées au préalable à la catalase. Une autre enzyme antioxydante semble avoir un rôle clé pour le potentiel d'auto-renouvellement des CSH, la gluthation peroxydase 3 (Gpx3). La transduction de cDNA et shRNA de *Gpx3* dans des CSH murines rend compte de ce rôle. La surexpression de *Gpx3* favorise la reconstitution à long terme de l'hématopoïèse et au contraire son inhibition diminue sa reconstitution dès la quatrième semaine (Herault et al., 2012). De plus il a été récemment rapporté que les cellules

$CD34^+$ $CD38^-$ médullaires et de sang de cordon présentent un très faible niveau d'H_2O_2 et une expression de GPx3 supérieur à la fraction $CD34^+$ $CD38^+$ (Vignon et al., 2012).

L'importance des enzymes antioxydantes pour le maintien du potentiel d'auto-renouvellement a été confirmé par différentes études qui mettent en évidence le rôle des protéines Forkhead O (FoxO) dans le soutien des CSH (Macleod, 2008). Ces protéines sont des facteurs de transcription qui régulent la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, la résistance au stress et l'élimination des ROS (Coffer and Burgering, 2007; Greer and Brunet, 2005). La première mise en évidence des FoxO a été mise en évidence dans des CSH murines. Dans les CSH quiescentes, les FoxO sont observés dans le noyau. A l'inverse, l'exportation des FoxO vers le cytoplasme est corrélée à une perte de capacité de restauration de l'hématopoïèse (Yamazaki et al., 2006) (Figure 27). Ces résultats suggèrent que les FoxO présents majoritairement dans le noyau des CSH quiescentes favoriseraient la transcription de gènes antioxydants contribuant à leur faible niveau de ROS. Les moelles murines *FoxO1/3/4*$^{-/-}$ sont moins riches en CSH que des moelles témoin, ces moelles ayant un niveau de ROS comparativement plus élevé (Tothova et al., 2007) (Figure 27). FoxO3 est le plus exprimé dans la moelle osseuse (Marinkovic et al., 2007) et le plus actif dans le noyau des CSH (Yalcin et al., 2008; Yamazaki et al., 2006) et semble prépondérant dans la réponse antioxydante des CSH (Miyamoto, 2008). Il est établi que FoxO3 contribue à la régulation du stock de CSH *via* son contrôle d'expression d'enzymes antioxydantes (SOD2, catalase) (Kops et al., 2002; Miyamoto et al., 2007; Yalcin et al., 2008). De plus dans les LAM une corrélation entre phosphorylation activatrice de FOXO3 et pronostic défavorable est suggérée (Kornblau et al., 2010).



Ito *et al.* 2004
Ito *et al.* 2006
Gupta *et al.* 2006
Tothova *et al.* 2007
Herault *et al.* 2012

Figure 27 : Influence des ROS sur l'auto-renouvellement des CSH.

Synthèse des travaux de Gupta, Ito, Yamasaki et Tothova et Herault sur les mécanismes du maintien d'un faible niveau de ROS nécessaire au maintien des CSH.

3.3. Influence des ROS sur la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques

Nous avons vu précédemment que la CSH présente un faible niveau de ROS nécessaire au maintien de ses caractéristiques fondamentales de quiescence et de potentialité d'auto-renouvellement. La problématique est différente lorsque la CSH s'engage en différenciation pour produire des cellules matures circulantes nécessaires à la vie d'un individu. La cellule a besoin de capacités de différentiation pour s'engager vers l'un des différents lignages et de capacités de prolifération pour répondre aux besoins importants en cellules matures. Les ROS et particulièrement H_2O_2 ont longtemps été considérés comme des agents lésionnels et mutagènes, responsables d'un stress oxydatif provoquant l'apoptose. Il est aujourd'hui admis

qu'en faible quantité et finement régulé par la balance pro/antioxydants, H_2O_2 est une molécule impliquée comme second messager dans différentes voies de signalisations régissant la physiologie cellulaire et notamment la prolifération et la différenciation cellulaire. H2O2 agit surtout en inhibant des phosphatases (PTEN, PTP1B, CDC25)(Meng et al., 2004; Meng et al., 2002; Savitsky and Finkel, 2002; Seo et al., 2005). Une augmentation transitoire de la production d'H_2O_2 est observée lors de la stimulation des récepteurs aux cytokines (Thannickal and Fanburg, 2000). Il est montré dans la lignée mégacaryocytaire humaine MO7e et la lignée myéloïde murine 32Dc13 que la stimulation par l'IL-3, le GM-CSF, la TPO et le SCF provoque une élévation de leur niveau de ROS. Cette augmentation du niveau de ROS coïncide avec l'activation de protéines de signalisation cellulaire (récepteur au GM-CSF, STAT5) et surtout une transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire (Sattler et al., 1999). Sur cette même lignée murine, une augmentation rapide et transitoire d'H_2O_2 a aussi été observée après stimulation à l'EPO. Ce phénomène s'accompagne d'une activation de plusieurs voies de signalisation (JAK2, STAT5, PI3K/Akt, Ras/MEK, ERK) qui est inhibée par l'ajout de NAC antioxydante. De même, la NAC prévient le passage G1/S (Iiyama et al., 2006). Une augmentation de ROS est également montrée chez la souris dans des cellules granuleuses neutrophiles de la moelle osseuse après stimulation au G-CSF. Elle s'accompagne de l'activation de la voie PI3K/Akt et d'une phosphorylation de la sous-unité $p47^{phox}$ des oxydases (Zhu et al., 2006). Ces données montrent l'importance des ROS dans la prolifération cellulaire et sa signalisation. Dans différentes lignées de cellules hématopoïétiques il a été mis en évidence que les ROS influencent aussi les mécanismes de différenciation. Dans la lignée monocytaire U937 par exemple, il a été mis en évidence que la différentiation des monocytes en macrophages par le 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acétate (TPA) s'accompagne d'une augmentation du niveau de ROS. Cette augmentation participe à la différentiation dans la mesure où la NAC permet de bloquer cette différentiation. En complément, le TPA provoque une augmentation d'expression du gène prooxydant *SOD2*, et une diminution transcriptionnelle du gène antioxydant codant pour la catalase. L'ensemble de ces résultats ont été renforcés par une étude sur la drosophile qui montre une accumulation de ROS au cours de la différenciation hématopoïétique. Ces élévations du niveau de ROS serviraient de déclencheurs pour la différenciation des progéniteurs myéloïdes. Ainsi, la surexpression de gènes antioxydants (*Gpx1, Cat*) retarde significativement la différenciation des progéniteurs myéloïdes multipotents. A l'inverse, une surexpression de *SOD2* augmente

le nombre de cellules différentiées tout en diminuant le nombre de progéniteurs (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009; Vincent and Crozatier, 2010).

3.4. Influence des ROS sur la mort cellulaire

A forte dose, les ROS sont des vecteurs de lésions cellulaires et de mutations. Une forte élévation du niveau de ROS est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose. Ce mécanisme est utilisé par certains agents anti-cancéreux. Il est admis que le niveau de ROS des cellules détermine la sensibilité à différents stimuli apoptotiques (Cadenas and Davies, 2000), dont le TNFα (Schulze-Osthoff et al., 1993), Fas (Banki et al., 1999), le TGFβ (Herrera et al., 2001), les radiations (Mirkovic et al., 1997), les agents thérapeutiques (doxorubicine) (Friesen et al., 1999) et peut être responsable de l'apoptose des lymphocytes T (Hildeman et al., 1999).

4. Influence des ROS sur l'hématopoïèse leucémique

Il existe 4 catégories de leucémies : les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), les leucémies myéloïdes chroniques (LMC), les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC). A cours de cette thèse nous nous sommes intéressé en particulier aux LAM qui sont le sujet de cette étude.

4.1. Les leucémies aigües myéloïdes (LAM)

Les LAM sont des affections prolifératives des lignages myéloïdes. Elles se caractérisent par une prolifération clonale de cellules malignes issues des CSL, mais bloquées à divers stades de maturation, les blastes. Cette population tumorale hétérogène est responsable d'un envahissement médullaire qui altère et dépasse l'hématopoïèse normale. Cette situation conduit à une insuffisance médullaire et cet envahissement médullaire peut être suivi d'une dissémination sanguine puis infiltrations d'autres organes hématopoïétiques (rate, ganglions, foie) ou non (peau, système nerveux central, testicules).

Plusieurs classifications existent, dont les plus récentes basées sur les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires des LAM. Une des plus utilisée est la classification French-American-British (FAB) basée sur le stade de maturation du clone leucémique. A chaque classe FAB correspond un stade de maturation, LAM0 immature, LAM1 et 2 myéloblastique, LAM3 promyélocytaire, LAM4 myélomonocytaire, LAM5 monoblastique, LAM6 érythroleucémique et LAM7 mégacaryocytaire (Bennett et al., 1976). C'est cette classification qui sera utilisée pour la partie expérimentale de cette thèse. L'âge médian de survenue des

LAM est d'environ 65 ans. Le pronostic est généralement mauvais avec un taux de survie à 5 ans de l'ordre de 15% à 20%. En cas de rechute après chimiothérapie, la survie médiane est de 3 à 12 mois (Keating 1989).

4.2. L'hématopoïèse leucémique

Les CSL ont été mises en évidence chez la souris (Lapidot et al., 1994) puis chez l'homme (Bonnet and Dick, 1997) et à partir de leur découverte, il a été suggéré que l'hématopoïèse leucémique mime l'hématopoïèse normale. Les CSL ont une capacité à s'auto-renouveler et à s'engager en différenciation (Clarke et al., 2006; Jordan et al., 2006; Wicha et al., 2006). Les CSL se situent au sein de la moelle osseuse, où elles établissent des interactions avec le microenvironnement au sein de "niches leucémiques". Protégées par leur niche, et par leur état de quiescence, les CSL sont peu sensibles aux chimiothérapies conventionnelles et sont à l'origine du taux élevé de rechute observé dans le cas des leucémies (Ishikawa et al., 2007). A l'inverse, la CSL est aussi capable d'entrer en différentiation et de proliférer avec un blocage à différents stades de maturation aboutissant à un envahissement médullaire par des leucoblastes.

La découverte du concept de CSL est maintenant étendue aux tumeurs solides. Des cellules souches cancéreuses (CSC) ont été mises en évidence dans un très grand nombre de cancers dont les cancers du sein (Al-Hajj et al., 2003), du cerveau (Singh et al., 2004), du colon (Ricci-Vitiani et al., 2007) et le mélanome (Schatton et al., 2008).

4.2.1. Les cellules souches leucémiques

Les CSL ont été identifiées grâce à l'utilisation du modèle murin NOD/SCID (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Il est observé de façon intéressante que les capacités de transplantations de leucémies de patients dans ces souris sont corrélées à leur pronostic chez le patient (Pearce et al., 2006). Cette observation reflète l'existence de différents types de cellules leucémiques immatures. Dans les LAM M0, M1, M2, M3, M5, les CSL leucémiques sont phénotypiquement définies par la combinaison de marqueurs suivants : $CD34^{+}$ $CD38^{-}$ $CD71^{-}$ $CD90^{-}$ HLA-DR^{-} $CD117^{-}$ $CD123^{+}$ (Bonnet and Dick, 1997; Jordan et al., 2006). La plupart de ces caractéristiques sont communes au CSH.

Cependant, l'utilisation de souris NOD/SCID modifiées afin d'éliminer l'activité NK résiduelle (souris NSG) a montré de meilleurs résultats de prise de greffe de cellules humaines (Ishikawa et al., 2005; Shultz et al., 2005), en particulier lors de greffe de LAM (Ishikawa et al., 2007; Sanchez et al., 2009). Ces observations ont mis en lumière que les caractéristiques

propres au modèle receveur peuvent influencer l'évaluation du caractère souche des cellules leucémiques (Sarry et al., 2011).

Dans le cas des CSH on considère que la population $CD34^+$ Lin^- $CD38^+$ est très enrichie en cellules souches. Dans le cas des CSL différentes observations remettent en cause ce modèle (Hosen et al., 2007; Jin et al., 2009a; Jin et al., 2006; Taussig et al., 2008). Ces résultats mettent en évidence que les populations positives pour le CD38, CD44, CD47 et CD123 peuvent contenir des CSL. De la même façon il a été montré que les fractions $CD34^+$ et $CD34^-$ des LAM mutées pour NPM1 contiennent des CSL (Taussig et al., 2010).

La caractérisation des CSL de plusieurs LAM primaires par des greffes en souris NSG a présenté des résultats interessants. Les prélévement de LAM ont été triés selon l'expression des marqueurs classiques Lin, CD34, CD38 et CD45RA afin d'obtenir des sous-populations dont la capacité de reconstitution a été testée. Toutes les fractions possèdent la capacité de reconstituer la leucémie en souris NSG. Cependant il existe des variations LAM dépendantes. La quantification des CSL par greffe en dilution limite a montré que la plus forte fréquence en CSL est effectivement retrouvée dans la sous-population Lin^- $CD38^-$. Cependant, cette fraction enrichie ne contient qu'une minorité des CSL totales. De façon surprenante, la majorité des CSL se trouve dans les fractions de phénotype plus matures $CD38^+$, Lin^+. De plus, les sous-populations $CD38^-$ et positives pour Lin sont capables de reconstituer intégralement l'hétérogénéité phénotypique de la LAM d'origine. Cela suppose que les CSL à phénotype plus mature sont capables de se dédifférencier et de redevenir lignage négatives (Sarry et al., 2011).

4.2.2. Les CSH et les progéniteurs : cibles de la transformation leucémique

L'étude des CSL par greffe en souris NOD/SCID a montré que seules les cellules de LAM présentant un phénotype immature $CD34^+$ $CD38^-$ sont capables d'initier les LAM chez le receveur (Bonnet and Dick, 1997). La population $CD34^+$ $CD38^+$ ne permettait pas la reprise de la leucémie *in vivo* malgré leur apparence de blaste leucémique. Ces résultats ont suggérés que les CSH sont les cibles de la transformation leucémique plutôt que les progéniteurs engagés en différenciation. La transformation leucémique proviendrait d'altérations génétiques des CSH et/ou d'altérations du microenvironnement à l'intérieur de la niche hématopoïétique.

La leucémogénèse est un processus multi-factoriel qui implique les mutations successives d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (Warner et al., 2005) jusqu'au point où les

mécanismes de défenses ne soient plus assez efficaces. L'analyse caryotypique des anomalies de structures chromosomiques a mis en évidences des gènes potentiellement impliqués dans la genèse des LAM. Les translocations t(15;17), t(8;21) et t(9;11) sont à l'origine de gènes et protéines de fusion (PML-RARalpha, AML1-ETO, MLL-AF9) impliquées dans le blocage de différenciation (Allford et al., 1999; Bierl et al., 2004; Sambani et al., 2004; Tonks et al., 2004).

Cependant, bien que les mutations génétiques des CSH soient des événements nécessaires ou suffisants à la transformation leucémique, dans certains cas les progéniteurs primitifs pourraient être la cible de cette transformation. L'expression de transgènes sous contrôle d'un promoteur spécifique dans les progéniteurs myéloïdes primitifs permet de créer un modèle murin dans lequel une LAM survient à partir de ces progéniteurs. Des transgènes induisant l'activation de Bcl2 (Bcl2 constitutivement actif ou extinction de Fas) sont responsables de leucémies proches des leucémies humaines (Traver et al., 1998). De plus il a été montré que des cellules leucémiques engagées, sont capable de dédifférenciation et de reconstituer la leucémie originelle *ad integrum*, renforçant ainsi la potentialité de transformation de progéniteurs primitifs (Sarry et al., 2011).

4.3. Les ROS dans les leucémies aiguës myéloïdes

4.3.1. Production de ROS dans les LAM

L'étude du niveau de ROS dans les LAM a été souvent réalisée sur la population leucémique globale hétérogène et à très forte majorité blastique. Ils sont donc le reflet des blastes engagés en différenciation et ne discriminent pas la sous-population de CSL minoritaire. La production excessive de ROS apparait caractéristique des cellules tumorales, dont les leucémies (Dolado et al., 2007; Pelicano et al., 2004). Cette production excessive de ROS est associée par exemple à l'activation des oncogènes Ras (Dolado et al., 2007), FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3) (Sallmyr et al., 2008) et BCR-ABL (Kim et al., 2005). Dans un modèle murin de LAM induite par surexpression de *NRAS* et *BCL2* une augmentation des ROS ainsi que des dommages oxydatifs à l'ADN ont été rapportés (Rassool et al., 2007). Il a été mis en évidence que les leucocytes de patients stimulés au PMA et fMLP augmentent leur production de ROS comparé aux leucocytes de sujets témoins (Er et al., 2007; Kato et al., 2003). De plus il a été montré que l'expression induite de RAS dans les progéniteurs $CD34^+$ humains augmente la production de ROS par activation d'une oxydase. De façon indépendante des facteurs de croissance, l'augmentation des ROS contribue à une

augmentation de la prolifération des cellules $CD34^+$ associée à l'augmentation de l'expression des cyclines D1 et D3 (Hole et al., 2010). En complément, l'étude du versant antioxydant montre une diminution des gènes *GPX1*, *SOD2* et *CAT* chez les patients atteints de LAM (Bowen et al., 2003). Une étude montre également une augmentation de différents marqueurs de stress chez des patients en rechute de LAM comparativement au diagnostic (Zhou et al., 2010). En outre, il est établi que des perturbations du métabolisme peuvent induire une production de ROS dans les cellules leucémiques. Par exemple, des mutations des gènes *isocitrate dehydrogenase 1* et *2* (*IDH1 et 2*) fréquentes dans les LAM (Dang et al., 2010) modifierait le produit de leur activité (Ward et al., 2010) produisant un substrat responsable d'une augmentation de ROS intra-cellulaires (Latini et al., 2003).

Certaines études s'attachent à décrire l'influence des ROS sur la sous-population de CSL. Dans le cadre d'une étude sur des leucémies murines induites par les oncogènes *Hoxa9* et *Meis1* à partir de cellules KLS de foie foetal, deux leucémies dont l'une est constituée presque exclusivement de CSL ont été générées, les leucémies primaires FLA2, presque exclusivement constituées de CSL (>70%) et FLB1, comprenant moins de 1% de CSL. En comparant les leucémies, le gène *Gpx3* codant pour la glutathione peroxydase 3 a été identifié comme un gène essentiel pour le potentiel souche des leucémies (Herault et al., 2012). Il est intéressant de noter que dans cette même étude, il a été observé que les LAM humaines de mauvais pronostic (riches en CSL) présentent une expression plus élevée de *Gpx3* que les LAM de bon pronostic et de pronostic intermédiaire. Les leucémies FLA2 sont caractérisées par un niveau élevé de GPX3 associé à une inactivation de p38MAPK et à une fréquence élevée en CSL (Herault et al., 2012; Trost et al., 2012). Très récement, il a été rapporté que le contact *in vitro* avec des cellules souches mésenchymateuses (CSM) médullaires primaires induit dans des cellules leucémiques humaines (KG1a) une surexpression de GPX3, une diminution du niveau de H_2O_2 et une inactivation de p38MAPK, très en faveur d'un rôle majeur de la niche leucémique dans le contrôle des ROS dans les cellules leucémiques (Vignon et al., 2010).

A l'image de l'hématopoïèse normale, ces résultats mettent en lumière une différence de comportement vis à vis des ROS selon que l'on considère la sous-population de CSL ou la sous-population blastique. Les CSL mettent en place une stratégie antioxydante favorable à leur auto-renouvellement favorisé par un faible niveau de ROS à l'inverse des blastes qui présentent une augmentation de leur production de ROS dont ils tirent un avantage prolifératif.

4.3.2. Effets de l'augmentation du niveau de ROS dans les LAM

Les effets d'un excès de ROS dans les LAM peuvent être classés dans deux catégories, les dommages oxydatifs non spécifiques et les effets spécifiques sur les voies de signalisation. Lorsqu'un niveau de ROS élevé persiste au niveau cellulaire, par excès de production et/ou altération des mécanismes antioxydants, des dommages oxydatifs apparaissent. On peut observer une peroxydation des lipides, une augmentation du pH intracellulaire, et des cassures simple ou double brin de l'ADN. Ces effets peuvent conduire à la progression leucémique. Il a été suggéré que chez les patients porteurs d'une duplication interne en tandem FLT3 (FLT3-ITD) une augmentation du niveau de ROS associée à une augmentation des cassures double brin de l'ADN pourrait être responsable du pronostic très défavorable (Sallmyr et al., 2008). En situation physiologique, les cellules répondent à un stress génotoxique par arrêt du cycle cellulaire ou apoptose, *via* les voies JNK et p38MAPK (Bulavin and Fornace, 2004). Le rôle important de p38MAPK dans la réponse au stress oxydant dans les CSH a été confirmé par les expériences d'Ito (Ito et al., 2006).

Certaines voies de signalisation sont régulées par les ROS. Un excès de ROS peut donc potentiellement être responsable d'une altération du signal transmis par ces voies, en particulier les voies pro-prolifératives et de survie cellulaire. Chez la drosophile il a été montré que l'augmentation de ROS générée par la protéine de fusion AML1-ETO favorise la prolifération des précurseurs hématopoïétiques (Sinenko et al., 2010). Il a aussi été montré que les effets de l'IL3 favorisant la survie cellulaire impliquent des ROS produits par NOX2 et sont reversés par l'utilisation d'inhibiteurs des oxydases (Maraldi et al., 2010). De même dans les cellules myéloïdes transformées par les tyrosines kinases oncogéniques, des ROS issus de NADPH oxydases participeraient à leur prolifération et leur migration (Reddy et al., 2011).

Enfin une étude récente a mis en évidence un rôle des ROS dans une stratégie d'échappement au système immunitaire pour les LAM myélomonocytaires et monocytaires. Elle a montré que ces leucémies expriment plus NOX2 que les leucémies moins différenciées et sont capables d'une plus grande production de ROS. Cette caractéristique leur permet de déclencher l'apoptose des cellules NK, T $CD4^+$ et T $CD8^+$ environnantes *via* la voie PARP-1/PARP (Aurelius et al., 2012).

Chapitre 3 : De la CSH à la cellule mature, métabolismes énergétique et oxydatif

L'influence des ROS sur le maintien des populations souches, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques normales et leucémiques au cours des hématopoïèses normales et leucémiques a été développée dans le chapitre précédent. Outre les NADPH oxydases, la chaîne respiratoire mitochondriale est un second fournisseur majeur de ROS. La production mitochondriale de ROS intervient lors de la phosphorylation oxydative. L'étude du statut métabolique des cellules hématopoïétiques et leucémiques semble donc être un complément important à l'étude du métabolisme oxydatif.

1. Influence du métabolisme sur le devenir de la CSH

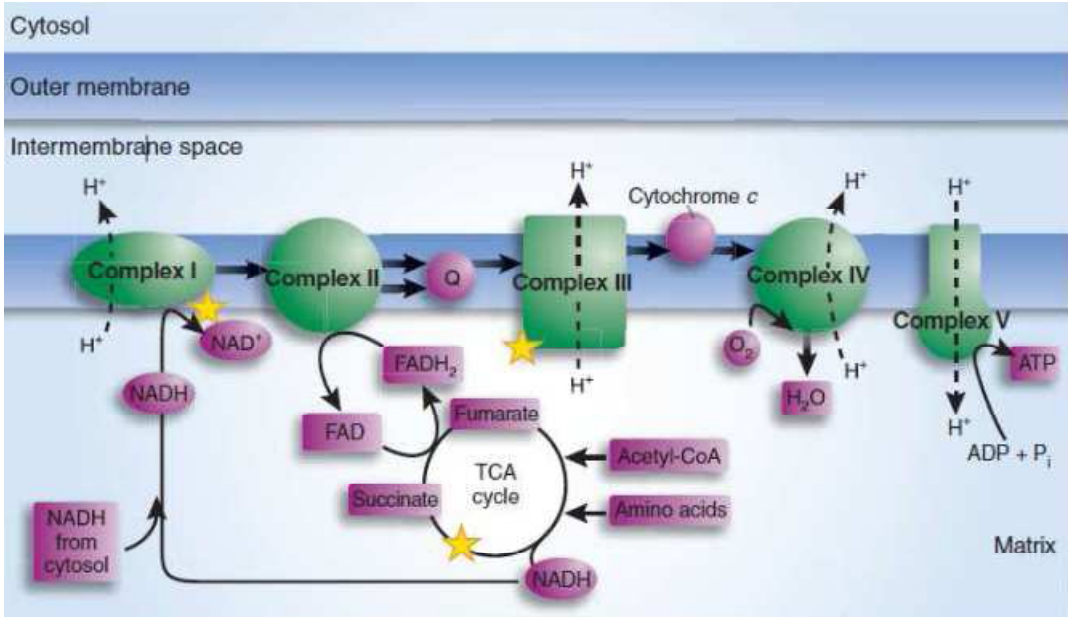


Figure 28 : La phosphorylation oxydative dans la mitochondrie.

L'étude de la population leucémique hétérogène a mis en évidence la nécessité de certaines propriétés métaboliques pour maintenir l'auto-renouvellement et les capacités de différentiation multipotentes des CSH (Folmes et al., 2012; Suda et al., 2011). La production d'énergie par les CSH est supportée par des mécanismes de glycolyse anaérobie (Simsek et al., 2010; Takubo et al., 2013). Cela repose sur une hypothèse établie en raison de la

localisation des CSH dans le microenvironnement dont les calculs prédisent une situation fortement hypoxique. Ensuite lors de l'engagement en différenciation la phosphorylation oxydative mitochondriale prendrait le relai dans cette fonction d'approvisionnement énergétique (Eliasson and Jönsson, 2010). La phosphorylation oxydative est réalisée par la chaîne respiratoire mitochondriale par transfert de charges successifs à travers quatre complexes jusqu'à l'oxygène (Figure 28). Ce transfert est responsable d'un gradient de protons au sein de la mitochondrie utilisé pour la synthèse d'ATP (Papa et al., 2012). Le cytochrome c est responsable du dernier transfert de protons à l'oxygène formant de l'eau. La constante d'affinité du cytochrome c pour l'oxygène est inférieure à la concentration en oxygène évaluée dans la moelle osseuse. Une utilisation du processus respiratoire est donc possible dans les CSH.

En effet la mesure de la respiration mitochondriale dans des $CD34^+$ humains a mis en évidence une fraction inhibable par le cyanure. Cette part d'oxygène est donc consommée par la mitochondrie (Piccoli et al., 2005). De plus, cette respiration est diminuée par un inhibiteur de l'ATP synthase (oligomycine) tandis qu'elle est très légèrement augmentée en présence d'un découplant mitochondrial. Ces résultats suggèrent que bien que la respiration mitochondriale des $CD34^+$ est faible, leurs mitochondries atteignent déjà leurs capacités maximales de fonctionnement. Ces résultats sont soutenus par l'existence d'une corrélation inverse entre niveau d'expression du CD34 (Piccoli et al., 2005) (Figure 29), du CD133 (Handgretinger et al., 2003; Piccoli et al., 2007b), de Sca1 (Piro et al., 2012) et le nombre de mitochondries dans les cellules. De façon fonctionnelle, il a été montré en utilisant un marquage des mitochondries actives à la rhodamine 123, que parmi les $CD34^+CD38^-Lin^-$ les cellules hématopoïétiques possédant la capacité de restauration de l'hématopoïèse à long terme ont une moins grande capacité de fixation du colorant (Kim et al., 1998; McKenzie et al., 2007) (Figure 30). De la même façon il a été montré que dans les $CD34^+$ de sang de cordon, la fraction $mitochondrie^{low}$ est enrichie en cellules capable de restaurer l'hématopoïèse (Romero-Moya et al., 2013). Une autre approche a établi que la quantité d'ATP intracellulaire augmente de l'ordre de quatre à cinq fois lorsque les cellules souches s'engagent en différenciation (Cho et al., 2006; Lonergan et al., 2006).

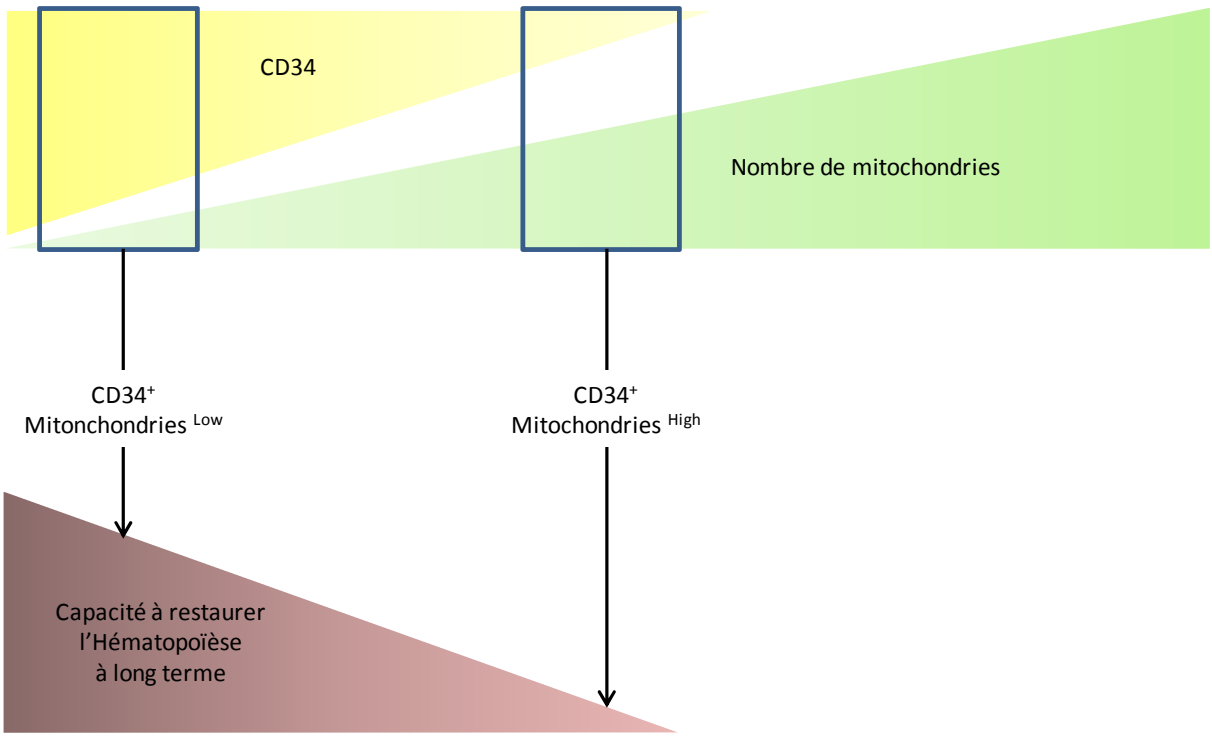


Figure 29 : Corrélation entre l'expression du CD34, le nombre de mitochondries et la capacité à restaurer l'hématopoïèse à long terme.

Les cellules $CD34^+$ sont capables de reconstituer l'hématopoïèse à long terme chez des souris létalement irradiées. Il a été montré une corrélation inverse entre niveau d'expression du CD34 et nombre de mitochondries dans les CSH. La sélection de la sous-population ROS mitochondrie ^{low} permet une meilleure capacité de restauration à long terme. (Kim et al., 1998; McKenzie et al., 2007)

Il est aujourd'hui reconnu que le réseau mitochondrial est un réseau dynamique en perpétuel remodelage par des mécanismes de fusion et de fission régulant la quantité de mitochondries (Ferree and Shirihai, 2012; Westermann, 2010). L'autophagie, mitophagie dans ce cas contribue aussi à cette régulation (Novak, 2012). Les résultats précédents ont posé la question de l'origine de la régulation du contenu mitochondrial des cellules hématopoïétiques lors de l'hématopoïèse. L'utilisation de souris déficientes pour la protéine Atg7 impliquée dans l'autophagie a permis une avancée importante. Les CSH de ces souris présentent une accumulation de mitochondries et de ROS accompagnée d'une augmentation de leur prolifération et de dommages ADN. Ces observations vont donc dans le sens d'une perte de leur caractère souche qui se confirme par leur incapacité à reconstituer l'hématopoïèse lors de greffes chez des souris irradiées létalement (Mortensen et al., 2011a) (Figure 30). Cela suggère qu'une faible quantité de mitochondrie est une condition nécessaire pour la conservation du caractère souche des CSH, tout en renforçant l'hypothèse d'une transition du

métabolisme glycolytique dans les cellules quiescentes vers la phosphorylation oxydative mitochondriale dans les cellules s'engageant en différentiation (Simsek et al., 2010; Suda et al., 2011; Takubo et al., 2013). Les facteurs déclenchant de cette transition sont actuellement à l'étude. Il semble que certaines voies de signalisation peuvent relier le métabolisme énergétique cellulaire et les capacités d'auto-renouvellement, prolifération et différenciation des cellules hématopoïétiques.

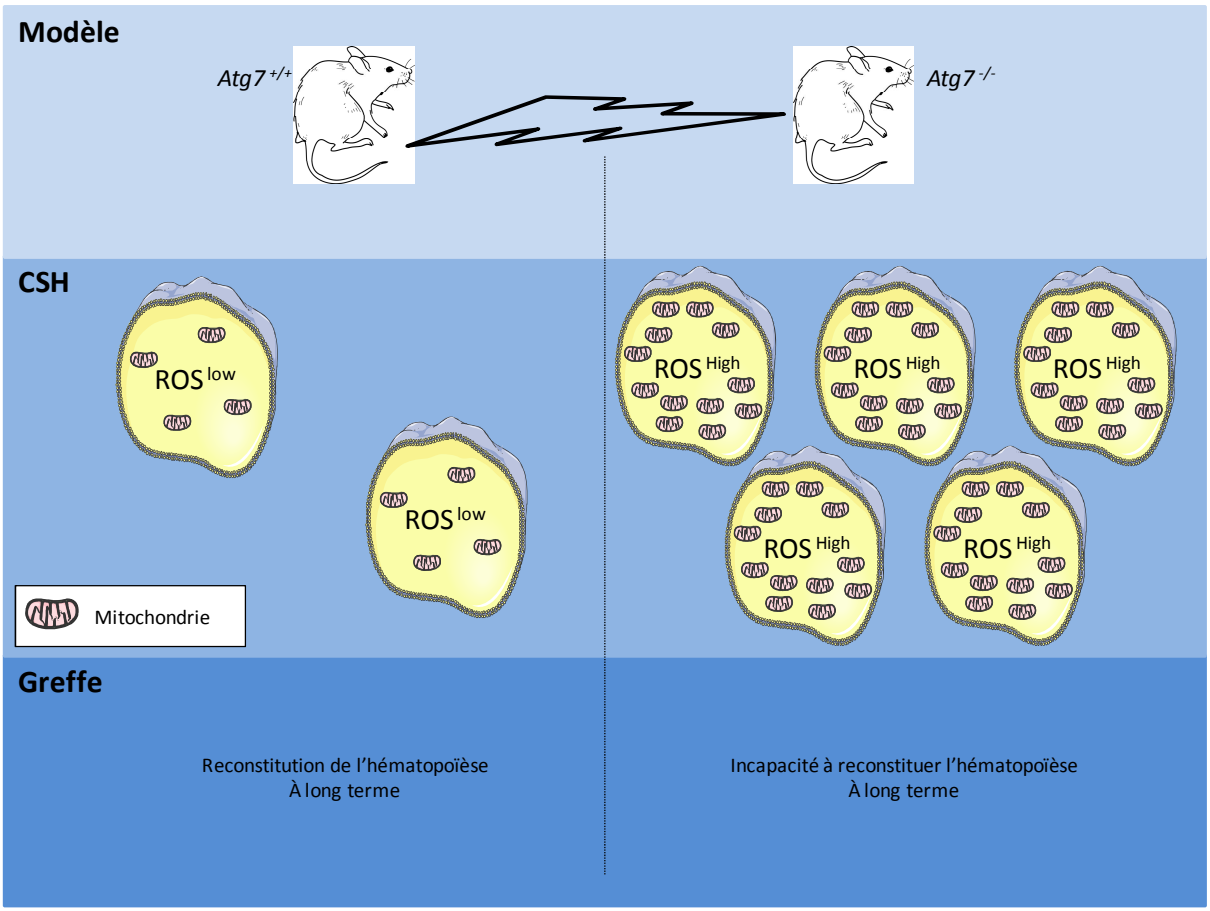


Figure 30 : Rôle des mitochondries dans le maintien du caractère souche.

La protéine At7 est un régulateur positif de la mitophagie. Chez la souris, un défaut d'expression de cette protéine est responsable d'un enrichissement des CSH en mitochondries concomitant d'une élévation de leur niveau de ROS et de leur mise en prolifération. La greffe de ces CSH ne reconstitue pas l'hématopoïèse à long terme chez des souris létalement irradiées. (Mortensen et al., 2011a; Mortensen et al., 2011b)

Dans une première étude ciblant mTOR, connu comme régulateur du métabolisme cellulaire (Wullschleger et al., 2006), et en particulier de la fonction oxydative mitochondriale (Cunningham et al., 2007) des résultats importants ont été publiés. Il

est rapporté que la délétion conditionnelle d'un régulateur négatif de mTOR dans les CSH a des répercutions drastiques sur leur fonctionnalités. Cette délétion sort les CSH de leur quiescence pour les engager rapidement en cycle et s'accompagne d'une multiplication des mitochondries concomitante d'une augmentation de la respiration cellulaire et d'une élévation du niveau de ROS. *In vivo* cela s'accompagne d'une diminution de l'hématopoïèse et de l'auto-renouvellement des CSH. Cependant, l'utilisation de rapamycine (inhibiteur de mTOR) ou l'utilisation d'un antioxydant restaurent les capacités fonctionnelles des CSH (Chen et al., 2008). Dans une seconde étude, il a été mis en évidence que la voie PI3K/Akt/mTOR est activée lorsque les cellules souches prolifèrent en réponse aux facteurs de croissance (Yuan and Cantley, 2008) et qu'une activation constitutive d'Akt accélère la perte des CSH (Kharas et al., 2010). Dans le même temps des modèles murins KO pour Akt1 et Akt2, les CSH perdent leur capacité à se différentier et restent quiescentes (Juntilla et al., 2010).

L'implication d'une seconde voie de signalisation impliquant Akt/mTOR dans le statut métabolique a été mise en évidence. La tumor suppressor liver kinase 1 (Lkb1) régule positivement l'AMP-activated protein kinase (AMPK) qui est un senseur du ratio AMP/ATP (Hsu and Sabatini, 2008). La phosphorylation d'AMPK a un effet inhibiteur de mTOR qui diminue la prolifération et régule le métabolisme cellulaire en fonction de la disponibilité en ATP. Des souris KO pour Lkb1 montrent une hématopoïèse altérée avec augmentation du nombre de progéniteurs et perte de la capacité de reconstitution après transplantation. De plus ces souris présentent des altérations fonctionnelles mitochondriales touchant le métabolisme des acides gras (AG) (Gurumurthy et al., 2010).

La relation entre maintien des capacités des CSH et métabolisme des acides gras (AG) par la mitochondrie a été renforcée dans d'autres études. Le *promyelocytic leukemia tumor suppressor gene* et la protéine PML qu'il code intervient dans le contrôle de l'homéostasie des CSH (Ito et al., 2008) et est impliqué dans une voie de signalisation impliquant le PPARδ et l'oxydation des AG. Le PPARδ est un membre de la famille des récepteurs nucléaires aux facteurs de transcription impliqué dans la régulation transcriptionelle des voies métaboliques dont le transport des AG et leur oxydation (Ito et al., 2012). Sa délétion conditionnelle ou l'inhibition de l'oxydation des AG provoque une perte des CSH tandis qu'un agoniste de PPARδ renforce leur maintenance. Chez les souris n'exprimant pas PML (*Pml*$^{-/-}$) il est possible de maintenir les CSH en activant PPARδ ce qui permet de restaurer une hématopoïèse après transplantation (Ito et al., 2012). Ces résultats intéressants sont renforcés par l'observation *in vitro* du devenir des CSH *Ppard*$^{-/-}$, *Pml* $^{-/-}$ ou en présence d'inhibiteur

d’oxydation des AG. Dans ces conditions leurs descendantes sont deux cellules filles qui s’engagent en division. A l’inverse, l’activation du PPARδ favorise une division asymétrique conservant une CSH et engageant une cellule fille en différenciation. Il existe donc un lien entre le métabolisme mitochondrial des AG et la régulation des CSH (Ito et al., 2012).

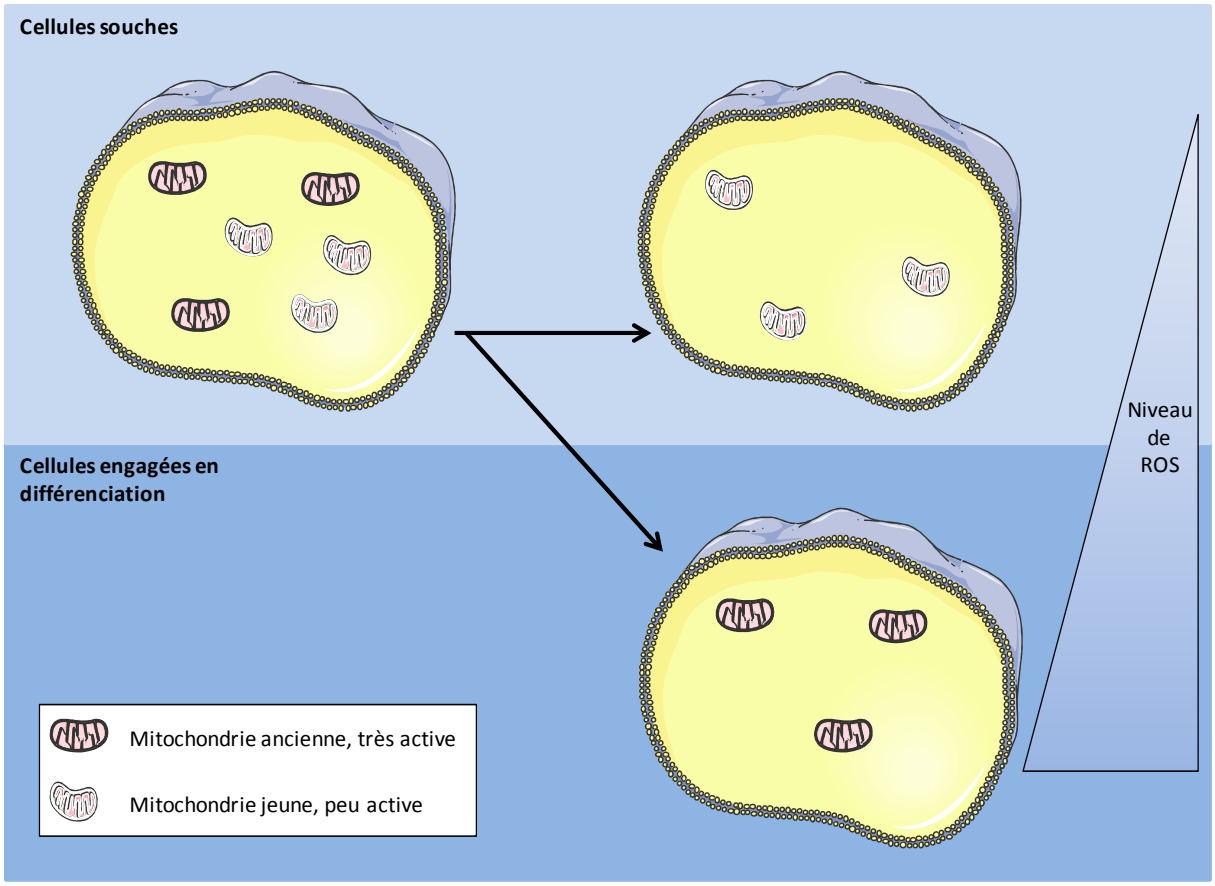


Figure 31 : Hypothèse sur la ségrégation asymétrique des mitochondries lors de la division asymétrique des CSH.

Mantel et Broxmeyer ont émis l’hypothèse d’une ségrégation asymétrique des mitochondries lors de la division asymétrique des CSH. La cellule destinée à entrer en différenciation recevrait des mitochondries anciennes au maximum de leur capacité oxydative. Dans le même temps la cellule destinée à rester quiescente recevrait des mitochondries néo-formées au faible potentiel oxydatif. (Mantel and Broxmeyer, 2008)

L’implication des mitochondries dans la régulation des CSH est un point clé. L’influence de leur quantité et fonctions sur la régulation du devenir des CSH est une observation importante qui renforce l’hypothèse de Mantel et Broxmeyer (Mantel and Broxmeyer, 2008) sur une ségrégation asymétrique des mitochondries lors de la division

asymétrique des CSH (Figure 31). Ces derniers proposent que lors de cette division, la cellule destinée à rester souche recevrait majoritairement de jeunes mitochondries tandis que la cellule destinée à s'engager en différenciation recevrait des mitochondries plus anciennes et déjà très actives. Ce procédé permettrait de diminuer le risque de dommage oxydatif et de préserver le génome de la réserve de CSH (Mantel and Broxmeyer, 2008).

Assemblés, ces résultats mettent en évidence la complexité de la régulation du métabolisme dans les CSH. Il se dégage que le maintien de leur quiescence semble liée à un métabolisme majoritairement glycolytique. A l'inverse, la mise en place d'un métabolisme reposant sur la phosphorylation oxydative mitochondriale semble elle liée à la prolifération des CSH engagées en différenciation. A cela s'ajoute un niveau de complexification supplémentaire puisque les mitochondries sont impliquées également dans la détermination du devenir de la CSH en régulant la balance entre auto-renouvellement et division cellulaire.

2. Influence du statut oxydatif sur le devenir de la CSH

2.1. Généralités

Les ROS ne sont plus seulement considérés comme des agents lésionnels, mais sont également reconnus comme des seconds messagers impliqués dans les signalisations régulant différents processus physiologiques (Finkel, 2011). Une forte concentration en ROS est une source de dégâts au niveau moléculaire et génomique. A l'inverse, des accumulations de ROS ponctuelles, localisées et en concentration régulée permettent la régulation de voies de signalisations nécessaires à la cellule en condition normale. Le niveau de ROS intracellulaire est une balance constante entre les mécanismes pro et antioxydants régulant entre autres la prolifération, la différenciation, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose (Dröge, 2002; Finkel, 2003; Sauer et al., 2001). A faible niveau, et par production ponctuelle, les ROS sont souvent associés aux mécanismes de prolifération et différenciation. A l'inverse en plus grande quantité, ils sont souvent associés à un arrêt du cycle cellulaire voir à la mort cellulaire (Boonstra and Post, 2004; Burhans and Heintz, 2009; Chiu and Dawes, 2012).

L'influence des ROS sur l'hématopoïèse normale et leucémique a été détaillée dans une partie précédente du manuscrit. Lors des étapes de différentiation successives, des accumulations ponctuelles du niveau de ROS ont été observées en réponse à différents facteurs de croissance et cytokines et sont nécessaires à la survie, prolifération et maturation des cellules engagées en différenciation. A l'inverse il est admis que la CSH présente un faible niveau de ROS, nécessaire au maintien de sa quiescence. Dans ce contexte, les

mécanismes antioxydants jouent un rôle clé pour la physiologie de la CSH. Cependant le versant pro-oxydant influence aussi le niveau de ROS cellulaire et doit être étudié.

2.2. Influence des oxydases dans la physiologie des CSH

Les oxydases sont présentes dans de nombreux tissus, et impliquées dans la régulation de voies de signalisations (Bokoch and Knaus, 2003; Dröge, 2003; Finkel, 2003; Sauer et al., 2000).Leur unique fonction étant la production de ROS, leur expression et activité ont été observées dans le cadre de l'hématopoïèse où la régulation du niveau de ROS est un déterminant clé.

L'étude de $CD34^+$ humains a mis en évidence une consommation d'oxygène inhibée par le diphénylène iodonium (DPI) et donc liée à une activité oxydase (Piccoli et al., 2005). Cela a été confirmé par l'observation des transcrits de *NOX1*, *NOX2* et *NOX4* dans ces cellules (Piccoli et al., 2007b). Les NOX sont localisées à la membrane cellulaire aux niveaux de radeaux lipidiques, ce qui suppose leur intégration à des plateformes membranaires de signalisation (Frassanito et al., 2008). L'activité NOX de ces cellules est peu stimulée par le PMA ou le G-CSF. Il en ressort qu'elles présentent une activité oxydase constitutive qui est démasquée lors des traitements au DPI (Piccoli et al., 2005). Les effets de cette activité ont été observés sous l'angle de la production de ROS. Une activité oxydase est génératrice d'anions superoxydes, qui peuvent spontanément réagir pour former H_2O_2. Cette réaction peut également être catalysée par des superoxyde dismutases (SOD) dont l'expression de la forme extracellulaire SOD3 a été observée dans les $CD34^+$. Les molécules d'H_2O_2 étant très diffusibles à travers la membrane plasmique, l'effet de l'activité NADPH oxydase sur le niveau de ROS a été mesuré par marquage au DCFDA. Une diminution du niveau de ROS des $CD34^+$ a été montrée lors de l'inhibition des oxydases par le DPI et lors de la supplémentation du milieu en catalase (Piccoli et al., 2007c).

La constante d'affinité des NOX pour l'oxygène est d'environ 10/15 µM (Chen et al., 2005; Gabig and Babior, 1979). Cela implique que leur activité chute dans les conditions très hypoxiques au fond de la niche hématopoïétique. Ces prédictions sont à l'origine d'un modèle selon lequel les oxydases à activité constitutive auraient un rôle de senseur du niveau d'oxygène (Piccoli et al., 2007a). Ainsi la quantité de ROS produite serait directement corrélée à la pression partielle en oxygène autour des cellules. Lors d'une augmentation de la pression en oxygène environnante ces ROS seraient les activateurs des autres NOX par stimulation et recrutement de leurs sous unités régulatrices, en particulier NOX1 et NOX2

dont l'activation est en partie sous l'influence d'une signalisation par les ROS (Pendyala and Natarajan, 2010). Ce modèle permet d'expliquer par une boucle de régulation positive l'augmentation du niveau de ROS des cellules hématopoïétiques lors de leur maturation concomitante de leur évolution de la niche endostéale vers la circulation (Figure 32).

Différentes observations soutiennent ce modèle. La première reste l'hypoxie de la niche hématopoïétique dans la mesure où cette condition est strictement nécessaire au maintien des CSH de moelle et de sang de cordon *in vitro* (Cipolleschi et al., 1993; Danet et al., 2003; Hermitte et al., 2006; Ivanovic et al., 2004; Shima et al., 2010), et le fait qu'au cours de l'hématopoïèse la cellule en différenciation progresse vers des conditions de moins en moins hypoxiques.

Ensuite il a été mis en évidence que des ROS issus des oxydases sont responsables d'une augmentation de la cycline D dans les cellules $CD34^+$ qui présentent une activation constitutive de RAS. Ce phénomène est responsable de la survie et d'une prolifération non dépendante de facteurs de croissance qui renforce l'hypothèse d'une boucle de régulation positive des oxydases lors de l'hématopoïèse (Hole et al., 2010).

De plus il est montré que les oxydases répondent à différentes cytokines en produisant des ROS impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Iiyama et al., 2006; Woolley et al., 2012). Cela suppose une implication majeure des oxydases dans la différenciation hématopoïétique.

Enfin de façon plus générale la signalisation *via* les ROS produits par les oxydases a été mise en évidence dans la physiologie des cellules souches d'autres tissus. Dans les cellules souches mésenchymateuses par exemple celle-ci a été reliée à la différenciation en ostéoclastes (Lee et al., 2005), en neurones (Wang et al., 2007) et en adipocytes (Kanda et al., 2011) chez l'homme et en cellules endothéliales (Schmelter et al., 2006), en cellules musculaires lisses (Xiao et al., 2009), en phagocytes (Hannig et al., 2010), et en cardiomyocytes (Buggisch et al., 2007) chez la souris. Des études montrent que la signalisation liée aux NOX serait activée durant les étapes précoces de différenciation des cellules souches embryonnaires avant de diminuer dans les étapes plus tardives. Il semblerait que les gènes antioxydants soient régulés négativement lors de la différentiation (Saretzki et al., 2004) tandis que les oxydases (1,2 et 4) seraient régulées positivement (Buggisch et al., 2007).

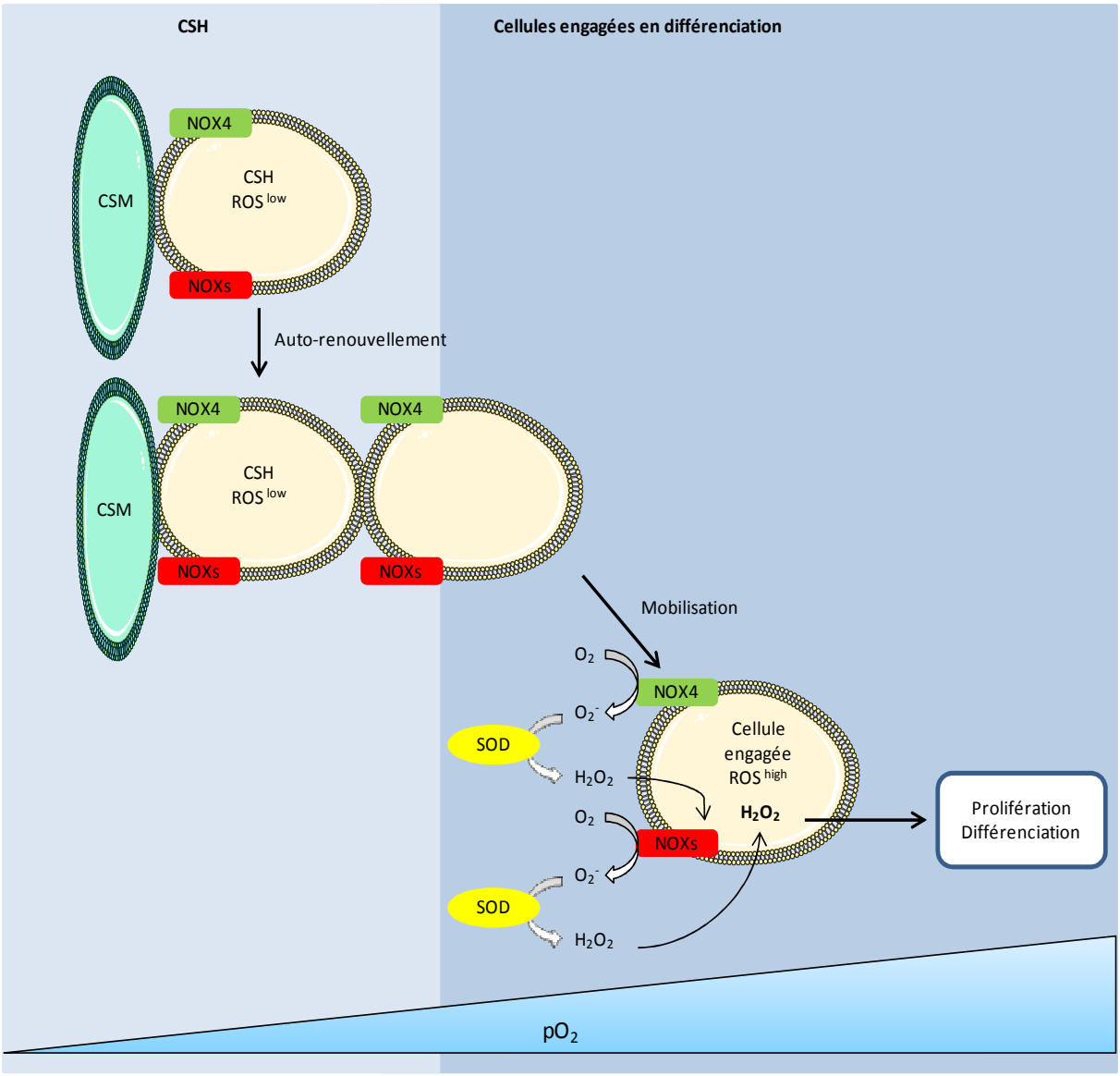


Figure 32 : Hypothèse du rôle des NOX dans le devenir de la CSH

Une hypothèse attribue un rôle de senseur du niveau d'oxygène aux oxydases à activité constitutive. Lorsqu'une CSH s'engage en différenciation et rencontre une pO_2 croissante, ces oxydases seraient responsables d'une production de ROS permettant l'activation d'autres oxydases à activité régulée. L'activité oxydase ainsi amplifiée contribuerait à l'élévation du niveau de ROS durant l'hématopoïèse. (d'après (Piccoli et al., 2005)

3. Croisement des aspects métaboliques et oxydatifs déterminants pour le devenir de la CSH

Deux oppositions majeures entre CSH quiescentes et cellules hématopoïétique engagées en différenciation ont été mises en évidence au niveau métabolique et au niveau oxydatif. Il est possible de façon synthétique de distinguer les CSH ROS^{low} $mitochondrie^{low}$ à

métabolisme majoritairement glycolytique et les cellules plus matures engagées en différenciation ROS^{high} mitochondrie^{high} utilisant principalement la phosphorylation oxydative comme source énergétique.

Il est intéressant de se demander s'il n'existe pas des interactions entre ces aspects métaboliques et oxydatifs. Les ROS peuvent être considérés comme un point commun aux deux systèmes mis en jeu, dans la mesure où la chaîne respiratoire mitochondriale et les oxydases sont les deux principaux fournisseurs de ROS cellulaires.

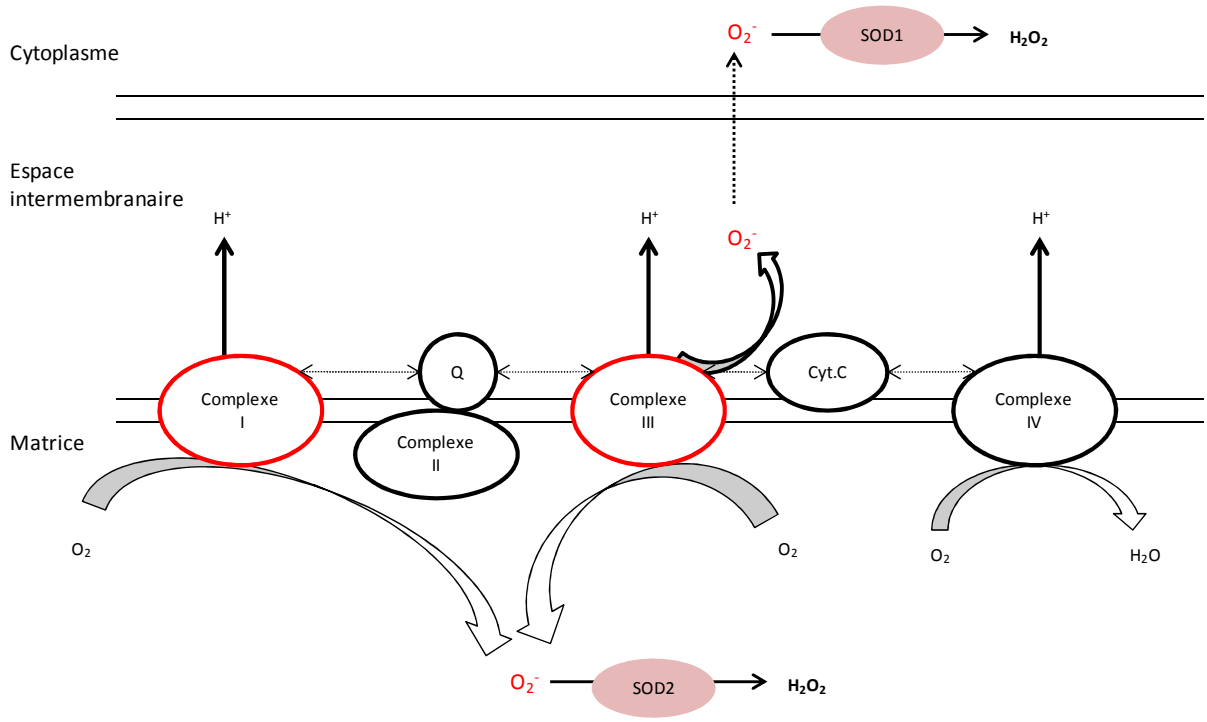


Figure 33 : Production de ROS mitochondriale.

Lors de la phosphorylation oxydative, il existe différents points de fuite responsables d'une production de ROS. Ces fuites d'anions superoxydes ont lieu au niveau du complexe I et III. Ces superoxydes pris en charge par les superoxydes dismutases 1 et 2 (SOD1, SOD2) sont à l'origine de formation de H_2O_2 potentiellement impliqué dans la régulation de voies de signalisation.

En dehors de l'aspect énergétique fondamental de la mitochondrie, il est nécessaire de la considérer également sous l'angle oxydatif (Figure 33). En particulier, dans le cadre de la phosphorylation oxydative qui a pour effet secondaire une production d'anion superoxydes (Dröse and Brandt, 2012; Murphy, 2009; Papa et al., 2012). Le transport d'électrons par la chaîne respiratoire débute par l'oxydation du NADH par le complexe I et du $FADH_2$ par le complexe II. Ces électrons sont transférés au complexe III *via* l'ubiquinone puis au complexe

IV. Il a été mis en évidence que ces transferts ne sont pas parfaits. Il existe à différentes étapes, des fuites qui aboutissent à une production d'anions superoxydes (Figure 34). Cela correspond à une réduction incomplète de l'oxygène. L'inhibition des complexes I ou III ou l'établissement d'un fort gradient électrochimique au sein de la mitochondrie tend à augmenter cette fuite par un mécanisme appelé flux inverse d'électrons. Les fuites du complexe I et III ont tendance à passer respectivement vers la matrice mitochondriale et vers la matrice et l'espace inter-membranaire. Cela explique que ces superoxydes puissent être pris en charge par la SOD1 associée à la membrane mitochondriale ou la SOD2 de l'espace inter-membranaire pour former H_2O_2. La forte perméabilité membranaire de cette espèce lui permet ensuite potentiellement de passer vers le cytoplasme et de contribuer au niveau de ROS.

Par le biais de la production de ROS, un mécanisme liant mitochondrie et oxydases a fait son apparition dans différents type cellulaires, le « cross talk » entre ROS issus des mitochondries et des oxydases (Daiber, 2010; Dikalov, 2011) (Figure 34). Ce mécanisme propose que les H_2O_2 produits par les mitochondries contribueraient à la régulation d'activité des oxydases et inversement. Cela aurait pour effet de renforcer la production de ROS. On peut donc imaginer un mécanisme global couplant aspects métaboliques et oxydatifs qui contribueraient à la différence de niveau de ROS entre CSH et cellule hématopoïétique engagée en différenciation. Dans ce mécanisme, la transition vers la phosphorylation oxydative conjuguée à une plus grande activité oxydase augmenterait le niveau de ROS dans la cellule qui s'engage en différenciation. Ces ROS, contribueraient indépendamment de leur origine à amplifier l'activation et donc la production de ROS de chaque système. Un tel système peut expliquer l'amplification du niveau de ROS en complément des effets pro-oxydants des cytokines rencontrées lors de l'hématopoïèse (Figure 35).

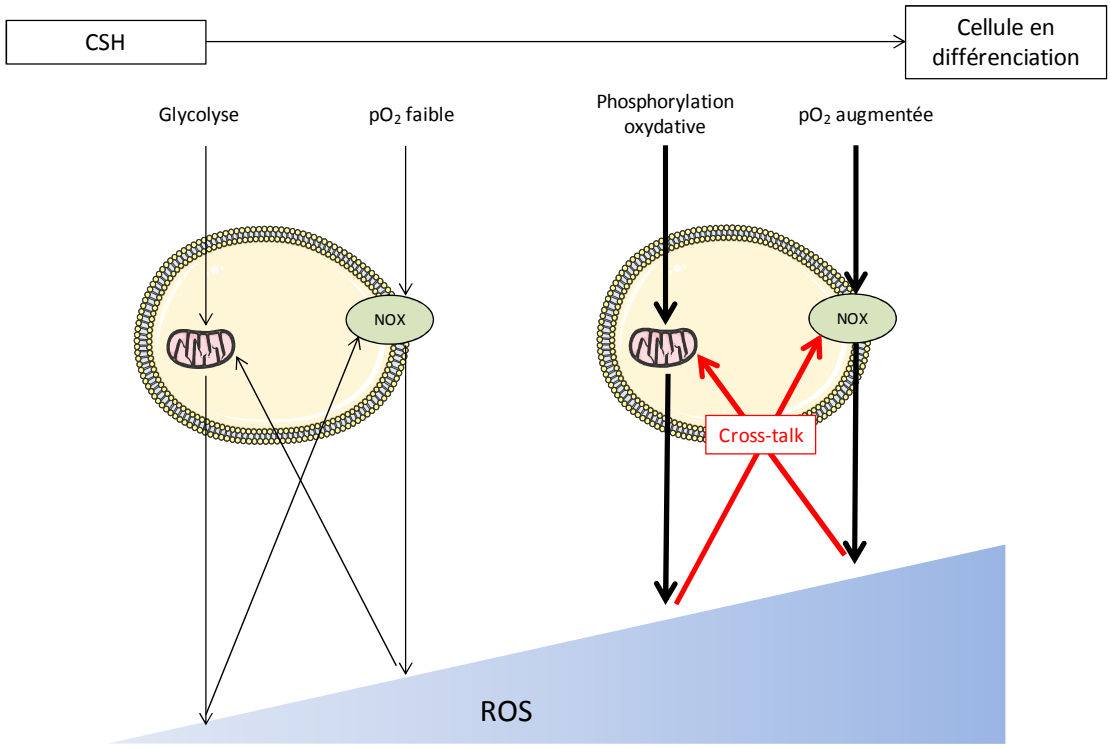


Figure 34 : Cross-talk entre ROS issus des mitochondries et des NOX.

L'idée d'effets croisés des ROS produits par les oxydases et par les mitochondries sur eux même a été énoncée, on parle de cross-talk. Les ROS d'origine mitochondriale pourraient entrer dans le processus d'activation des oxydases et inversement. Dans la cellule hématopoïétique qui entre en différenciation, ce processus pourrait amplifier la production de ROS par ces deux entités et contribuer à l'élévation de leur niveau de ROS durant l'hématopoïèse. (Daiber, 2010; Dikalov, 2011)

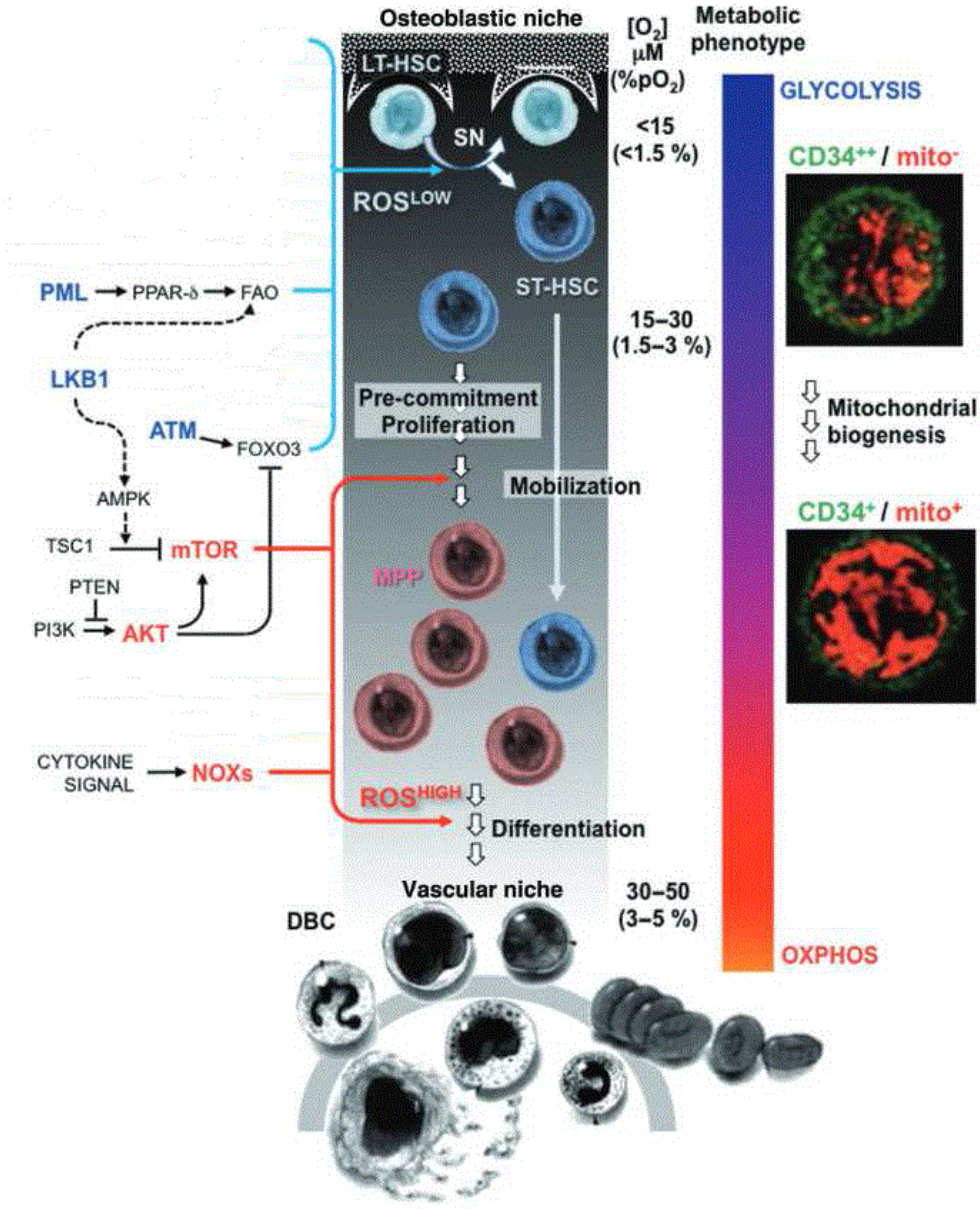


Figure 35 : Cross-talk des aspects métaboliques et oxydatifs.

D’après (Piccoli et al., 2013)

4. La CSL, une cellule souche différente de la CSH

L’existence de CSL qui miment l’hématopoïèse normale pour former des progéniteurs leucémiques, des précurseurs leucémiques et des blastes est une donnée clairement acquise. La CSL est une cellule souche, qui par définition possède une capacité d’auto-renouvellement qui lui permet par division asymétrique de maintenir un stock constant tout en générant des blastes qui envahissent la moelle osseuse.

Dans ce cadre pathologique, les résultats d'études récentes montrent qu'il est cependant nécessaire d'envisager des différences notables entre les CSH et les CSL.

Lors des premières descriptions des CSL il a été observé que seule la sous-population CD34+ CD38- était capable de reconstituer les LAM lors de greffes dans des souris NOD/SCID. Il a donc été suggéré que les CSL sont capable d'une différenciation partielle et se limitent au même phénotype immature que les CSH normales. Cependant, l'utilisation de souris NOD/SCID modifiées afin d'éliminer l'activité NK résiduelle (souris NSG) a montré de meilleurs résultats de prise de greffe de cellules humaines (Ishikawa et al., 2005; Shultz et al., 2005), en particulier lors de greffe de LAM (Ishikawa et al., 2007; Sanchez et al., 2009). Ces observations ont mis en lumière que les caractéristiques propres au modèle receveur peuvent influencer l'évaluation du caractère souche des cellules leucémiques (Sarry et al., 2011).

Dans le cas des CSH on considère que la population $CD34^+$ Lin^- $CD38^+$ est très enrichie en cellules souches. Dans le cas des CSL différentes observations remettent en cause ce modèle. Il a été montré que l'utilisation d'anticorps contre les CD38, CD44, CD47 et CD123 peut empêcher la repopulation de la moelle en CSL et/ou la prise de la greffe dans des souris NOD/SCID (Hosen et al., 2007; Jin et al., 2009a; Jin et al., 2006; Taussig et al., 2008). Il n'est cependant pas clairement défini si cet effet provient de perturbations lors de la domiciliation des CSL, de perturbations de signalisations et/ou d'une élimination due à la présence des anticorps fixés aux cellules (Jin et al., 2009b). Mais ces résultats mettent en évidence que les populations positives pour le CD38, CD44, CD47 et CD123 peuvent contenir des CSL. De la même façon il a été montré que les fractions $CD34^+$ et $CD34^-$ des LAM mutées pour *NPM1* contiennent des CSL (Taussig et al., 2010).

Ces observations ont conduit l'équipe de Sarry *et al*, à caractériser les CSL de plusieurs LAM primaires par des greffes en souris NSG. Les prélévement de LAM ont été triés selon l'expression des marqueurs classiques Lin, CD34, CD38 et CD45RA afin d'obtenir différentes sous-population dont la capacité de reconstitution de la leucémie a été testée. Chaque fraction obtenue possède la capacité de reconstituer la leucémie en souris NSG, avec des variations LAM-dépendante. La quantification des CSL par greffe en dilution limite a approfondi ces résultats. La plus forte fréquence en CSL est effectivement retrouvée dans la sous-population Lin^- $CD38^-$. Cependant, cette fraction enrichie ne contient qu'une minorité des CSL totales. De façon surprenante, la majorité des CSL présentes dans les LAM se trouve dans les fractions de phénotype plus matures $CD38^+$, Lin^+. De plus, il est intéressant de

souligner que les sous-populations $CD38^-$ et exprimant le marqueur de lignage sont capable de reconstituer intégralement l'hétérogénéité phénotypique de la LAM d'origine. Cela suppose que les CSL à phénotype plus mature sont capables de se dédifférencier et de redevenir lignage négatives (Sarry et al., 2011).

Partant de ce nouveau postulat qu'il peut exister des différences entre CSH et CSL et qu'il existerait en plus une hétérogénéité des CSL dans les LAM, l'équipe de Jordan a cherché à cibler un processus physiologique qui serait moins succeptible de variations inter-patients et intra-patient. Ils ont choisi d'étudier le métabolisme énergétique des CSL. En effet, il est établi que les cellules cancéreuses présentent des aberrations métaboliques et oxydatives. Par exemple, elles favoriseraient la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Des expériences de greffe de LAM en souris ont permis d'étudier l'état oxydatif et métabolique des CSL. Ils ont montré que les cellules à capacité d'auto-renouvellement et résistantes aux thérapeutiques ont effectivement un faible niveau de ROS et un faible métabolisme énergétique. De façon surprenante, lors de l'inhibition de la phosphorylation oxydative, ces cellules sont incapables d'utiliser la filière glycolytique pour fournir leur énergie. Ces résultats sont à l'opposé de ceux observés dans les CSH où la glycolyse est la voie métabolique majoritaire. Ils ont ainsi montré que la fonction mitochondriale est un déterminant essentiel de la survie des CSL qui est favorisé par BCL2 (Lagadinou et al., 2013).

Seconde partie : Résultats

Article 1 : L’activité NADPH oxydase favorise la prolifération des cellules de leucémies aiguës myéloïdes humaines.

« NADPH Oxidase activity promotes the proliferation

of human acute myeloid leukemic cells. »

Leclerc J.[1], Debeissat C.[2], Georges Khamis G.[1], Socco-Luca M.[2], Ducrocq[1] E., Gouilleux F.[2], Stasia M.J. [3], Herault O. [1,2]

[1] Université François Rabelais, CNRS UMR 7292, LNOx team, Tours, France

[2] CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, Tours, France

[3] CHU de Grenoble, Centre Diagnostic et Recherche CGD, Grenoble, France

1. Introduction

Cette étude a été réalisée sur huit lignées leucémiques myéloïdes humaines couvrant les principaux types FAB : KG1a (M0/M1), KG1 (M1), HL60 (M2), NB4 (M3), ML2 (M4), THP1 (M5), U937 (M5) et MV4-11 (M5), avec pour objectif de caractériser l'activité NADPH oxydase de chacune de ces lignées, et notamment des lignées à différenciation non monoblastiques. Ces lignées leucémiques sont très largement utilisées au niveau international comme modèles de LAM bloqués à différents stades de différenciation. Le choix d'utiliser des lignées plutôt que des blastes primaires de patients a été basé sur la possibilité de disposer de quantités importantes de matériel homogène pour l'étude, sans requérir à des tri-cellulaires inducteurs de stress oxydatif, ni à des conditions de culture fortement supplémentées en facteurs de croissance hématopoïétiques indispensables pour maintenir *in vitro* des leucoblastes mais fortement inducteurs de signalisations impliquant les ROS.

Cette partie de l'étude repose donc sur la description moléculaire et protéique des oxydases et sur la quantification de leur activité et de leur impact sur le cycle cellulaire et l'apoptose. L'analyse de l'expression des isoformes des différentes isoformes oxydases présentes dans les cellules leucémiques a été réalisée par qRT-PCR. Elle a été complétée par l'analyse de l'expression protéique par western blot et par des tests fonctionnels quantifiant la production de ROS des oxydases. L'impact sur le cycle cellulaire et l'apoptose a été évalué par l'utilisation du DPI et analyse cytométrique.

NADPH oxidase activity promotes the proliferation of human acute myeloid leukemic cells

Joan Leclerc[1], Christelle Debeissat[2], Georges Khamis[1], Marion Socco-Luca[2], Elfi Ducrocq[1], Fabrice Gouilleux[2], Marie-José Stasia[3] and Olivier Herault[1,2]

[1] Université François Rabelais, CNRS UMR 7292, LNOx team, Tours, France

[2] CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, Tours, France

[3] CHU de Grenoble, Centre Diagnostic et Recherche CGD, Grenoble, France

Short title: NADPHoxidase promotes leukemic profiferation

Corresponding author:

Olivier Hérault, MD-PhD

CHRU de Tours - Service d'Hématologie Biologique

2 boulevard Tonnellé, 37044 Tours Cedex 9, France

e-mail: olivier.herault@univ-tours.fr

fax: +33 (2) 4747 6934

Abstract

The level of reactive oxygen species (ROS) in acute myeloid leukemia is the result of their production and elimination. The family of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases is a major source of ROS that can significantly affect the biology of leukemic cells. This study investigated NADPH oxidase expression and activity in various human myeloid leukemic cell lines and it's influence on leukemic cells proliferation. We analyzed 8 cell lines of various FAB subtypes (KG1a, KG1, HL60, NB4, ML2, THP1, U937 and MV4-11) and we observed an expression of NADPH oxidases in all leukemic cell, particularly NOX2 and its regulatory subunits even if the NOX2 expression was higher in the more differentiated cell lines. A constitutive ROS production by oxidase activity has been observed in all cell lines by using diphenyleneiodonium (DPI), an NADPH oxidase inhibitor. It was possible to increase this production in the HL60, NB4 and THP1 cells lines by using phorbol 12-myristate-13-acetate, an NADPH oxidase activator. Moreover we showed that the ROS derived from NADPH oxidase activity importantly contribute to the ROS level in leukemic cells and participate in cell cycle regulation as the exposure to DPI decreased their proliferation without inducing apoptosis. Together, these results suggest that NADPH oxidase activity of leukemic cells is a major ROS producer whatever their level of differentiation and contribute to their proliferation.

Introduction

Hematopoiesis is the process differentiating all the mature blood cells from immature precursors. The same process has been found in leukemogenesis called leukemic hematopoiesis. Oxidative metabolism has been shown as an important component regulating differentiation and proliferation of hematopoietic cells. When ROS functions have been investigated in normal hematopoïesis it has been shown that hematopoietic stem cells (HSC) exhibited lower reactive oxygen species (ROS) level than more mature myeloid cells. This low ROS level appeared necessary to maintain HSCs quiescence and self-renewal capacity [1, 2]. It has been demonstrated that a FoxO defect altering antioxidant defenses was implicated in ROS level increase concomitant with a loss of self-renewal capacity and a rapid bone marrow failure *in vivo* [2]. Low ROS level in HSC contrasts clearly with the higher ROS level in more differentiated cells [3] and ROS have been described as necessary for hematopoiesis. During maturation stages, several growth factors as granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-3 (IL-3) stem cell factor (SCF) and thrombopoietin (TPO) induce ROS production. Moreover their effects were mediated by this enhanced ROS production [4]. H_2O_2 have been clearly involved as mediator in growth factors effects. It has first been demonstrated that H_2O_2 could imitate growth factors activity [5]. Now it is accepted that growth factor effects act through an H_2O_2 production increase [6-8].

Take together these observations in normal hematopoiesis led to investigate the influence of ROS level in myeloid disease including acute myeloid leukemia (AML). The same contrast have been found with lower ROS level in leukemic stem cells (LSC) than in leukoblasts [9]. The evidence of an anti-oxidant strategy including glutathion peroxidase 3 overexpression in LSCs has recently been reported [10]. On the contrary leukocytes from AML patients produce more ROS than leukocytes from healthy population [11]. High ROS level have been described in hematopoietic syndromes [12-14] and it as been reported that this high ROS level promotes leukemic cells through proliferation [15, 16] or cell survival [17, 18] mechanisms.

Since few years ROS have been described as important second messengers. Because intracellular ROS level resulted from a balance between ROS production and ROS elimination, this two complementary activities have been described. The

family of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases belongs to the category of ROS producers. NADPH oxidases are membrane associated multi-protein enzymes. They carry electrons from intracellular NADPH to extracellular oxygen. This process produces superoxides by oxygen reduction. The family of oxidases is composed with Nox2 and six homologues called Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 and Duox2. The phagocyte oxidase Nox2 was first described. It was tightly bound in plasma membrane with $p22^{phox}$. This unit was called cytochrome b_{558} and needed $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ and $p67^{phox}$ regulatory subunits to produce superoxides. The other oxidases are either associated with $p22^{phox}$ (Nox1, Nox3, Nox4) or $p22^{phox}$ independent (Nox5, Duox1, Duox2 which are regulated by calcium). Moreover, their regulatory subunit were different: Nox1 and Nox3 needed NOXO1 and NOXA2 whereas Nox4, Nox5, Duox1 and Duox2 don't have regulatory subunit [19]. Together, the oxidases were the main non mitochondrial ROS producers in cells [20]. Interestingly superoxides generated by oxidases could be eliminated by superoxide dismutases (SOD) [11, 21, 22] and generated H_2O_2 could be implicated in cells differentiation and proliferation. Moreover, the nuclear translocation of NF-E2–related factor 2 (Nrf2), a transcription factor involved in the chemo-resistance of AML cells [23] is a marker of high level of intracellular ROS as an increase in ROS level induces its activation and translocation to the nucleus [24].

The aim of this study was to determine the role of NADPH oxidases in AML cell proliferation. To answer this question, we analyzed 8 human AML cell lines according to the French American British (FAB) classification from M0/M1 to M5. We described in this paper the expression of the oxidases, their enzymatic activity, their influence on intracellular level of ROS and the NF-E2-related factor 2 (Nrf2) nuclear translocation. As a constitutive NADPH oxidase dependent H_2O_2 production has been observed whatever the differentiation stage of AML cells, we investigated its influence on the cell proliferation.

Material and Methods

Leukemic cells and exposure to regulators of NADPH oxidases activity

Human leukemic cells lines were obtained from European Collection of Cell Cultures (ECACC). KG1a [29], KG1 [30], HL60 [31], NB4 [32], ML2, THP1, U937 and MV4-11 cell lines have been chosen according to their FAB classification, respectively FAB M0/M1, M1, M2, M3, M4, M5, M5 and M5. Cells were cultured (2.10^5 cells/mL, 37°C in 95% humidified air and 5% CO_2) in RPMI 1640 with 2 mM L-glutamine supplemented with 10% FCS, 100 units/mL penicillin G, and 100 mg/mL streptomycin. Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion and was typically between 85-100% before the experiments. Diphenyleneidonium (DPI) has been used as inhibitor of NADPH oxidases. It was used at 20 µM during ROS production assays and 0.5, 1 and 2µM to avoid toxicity during culture assays. Phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) has been used at 80 ng/mL as an activator of NADPH oxidases. Extracellular catalase supplementation (300 µg/mL), which degrades extracellular H_2O_2, mimicked the NADPH oxidase inhibition without the direct impact of inhibitors on the enzyme and without gene knockdown, two potential inducers of oxidative stress.

RT-qPCR

Cells were washed in phosphate buffer saline (PBS) and total cellular RNA was isolated by Trizol reagent according to manufacturer instructions. Corresponding cDNA were synthesized using SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) according to manufacturer instructions. RT-qPCR reaction followed Roche Universal Probe Library (UPL) strategy based on specific primers (Invitrogen) and labeled probes (UPL) chosen with UPL Assay Design Center (available on request). A Light Cycler 480 II (Roche) was used for amplification cycles and fluorescence read. Reaction mix included 20 ng cDNA, 5 µL 2X TaqMan mix “Light Cycler 480 Probes Master” (Roche), 0.25 µL of each primer and 1 µL of probes. Initial denaturation (95°C, 10 min) was followed by 45 cycles of amplification (95 °C, 1 s/60°C, 30 s/72°C, 1 s). Relative quantification (ΔCt) has been calculated using glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) housekeeping gene expression.

Western blot analysis

Cells were washed 3 times in PBS and pelleted. For total proteins, pellet was treated with diisopropyl fluorophosphate 3 mM, 15 min on ice before extraction using Cytobuster Protein Extraction Reagent (EMD Biosciences) cell lysis buffer. Protease inhibitor cocktail 0.7 % (Sigma), phosphatase inhibitor cocktail 0.3 % (Sigma) and leupeptin 20 mg/L were added to prevent protein degradation. For fractionation experiments, the buffers were supplemented with PMSF 2 mM, DTT 1 mM, $NaVO_4$ 100 mM and protease inhibitor cocktail. Cytosolic extraction was realized with a Hepes 20 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, NP40 0.2 %, glycerol 10 % buffer. Then nuclear extraction followed with a Hepes 20mM, KCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 0.4 M, glycerol 20 %.

The proteins were quantified using bicinchoninic acid method. Twenty micrograms of proteins were resolved by 10 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane using electrophoretic transfer cell (Bio-Rad), 350 mA, 90 min. Proteins were detected using specifics primary antibodies against Nox2 (Upstate 07-024), $p22^{phox}$ (Abcam ab75941), $p40^{phox}$ (Upstate 07-503), $p47^{phox}$ (Upstate 07-001), $p67^{phox}$ (07-002), Rac1 (BD Biosciences R56220) and HRP conjugated secondary antibodies (Biorad) according to the Biorad standard western blotting procedure. Hsc70 (SantaCruz Biotechnology) was used as loading control.

Total ROS production assay

The cells were washed twice in PBS without calcium and magnesium and distributed at 10^6 cells per well in 96 wells plates to measure total (intra and extracellular) ROS production. Cells were then incubated in 200 µL reaction volume of PBS supplemented with 0.5 M $MgCl_2$, 0.9 M $CaCl_2$, 20 mM glucose with or without 20 µM DPI and with or without PMA 80 ng/mL for 1 h, 37 °C. To monitor H_2O_2 production kinetic, 10 µM 5-(and-6)-2'-7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate acetyl ester (H_2DCFDA) (Molecular Probes) were added. Emitted DCF fluorescent signal acquisition has been followed every 2 min during 2 h with Mithras LB940 (Berthold Technologies) fluorimeter and analyzed with MikroWin 2000 software. A cumulative H_2O_2 production curve was obtained. The production rate (RLU/min/10^6 cells) was defined using the curve slope at steady state. This method allowed us to compare ROS production in different cell lines, with or without NADPH oxidases activator and inhibitor.

Intracellular ROS level assay

Cells were washed twice in PBS without calcium and magnesium and then incubated in PBS supplemented with 0.5M $MgCl_2$, 0.9M $CaCl_2$, 20 mM glucose, 37 °C, 1 h with or without DPI 20 µM and catalase 0.3 mg/mL to measure intracellular H_2O_2 level. Finally cells were incubated with 10 µM CM-H_2DCFDA for 10 min, 37°C, washed in PBS, 37°C and analyzed by BD FACS Canto II flow cytometer. Emitted DCF fluorescent signal has been analyzed with Flowjo 7.6.3 (Tree Star) software.

Cell proliferation analyses

The cell viability was analyzed with MTT colorimetric assay (Sigma M5655). The cells have been seeded 5.10^4 in 200 µL medium wells, with or without DPI (0.5-1-2 µM) and catalase (250-500 µg/mL). MTT reduction assay have been compared at 0 h, 24 h and 48 h. At these times, cells were incubated 4 h in 3 mg/mL MTT supplemented media before an overnight cell lysis in 10% sodium dodecyl sulfate. Absorbance at 590nm was used to determine the amount of formazan produced reflecting viable cells quantity.

The cell cycle (G0/G1, S and G2/M phases) and apoptosis (hypoploid sub-G1 peak) were analyzed by flow cytometry. Cells (10^6) were PBS washed and ethanol fixed during 30 min on ice. They were then washed in PFT (PBS, 1% FCS, 0.25% Triton-X-100). Cells were finally incubed in 100 µL PFT with 1 µg 7AAD (Sigma) and Ki67-Alexa Fluor 488 (BD Biosciences) during 30 min at room temperature before a PBS wash followed by FACS Canto II analyses.

The number of mitosis was quantified using the Cell Proliferation Dye eFluor450 (eBiosciences). The cells have been washed two times in PBS 37 °C, and incubated 10 min at room temperature in 10 µM dye supplemented PBS. Then 5 volumes of cold culture media have been added for 5 min incubation on ice before 3 washes in cold culture media. Then, the cells have been cultured during 24 h before initial measurement (t0) and exposure to DPI for 84 h (t84). The fluorescence levels were compared by flow cytometry (t84 *vs.* t0) allowing the determination of DPI effects on the number of mitoses.

Results

AML cell lines express NADPH oxidases whatever their differentiation stage

NADPH oxidases belong to a family including seven isoforms that have been screened in each leukemic cell line. All the regulatory subunits that are necessary to establish or regulates these oxidases complex were analyzed, too. RNAs of several catalytic subunits have been detected (Figure 1). *NOX1* was only expressed in two monocytic differentiated cell lines, THP1 and U937. NOX2 transcript was found in all the AML cell lines with an expression increased according to cell differentiation level. It was least expressed in most undifferentiated cells lines (KG1a and KG1) and its expression was increased in granulocytic and myelomonocytic leukemic cells (HL60, NB4, ML2) as well as in monocytic leukemic cells (THP1, U937, MV4-11). The higher level of *NOX3* transcript expression was observed in undifferentiated cells and was very weakly or unexpressed in differentiated cells. *NOX4* and *NOX5* transcripts were undetected in all AML cell lines. *DUOX1* transcript was highly expressed in KG1 cells and little or no in all other AML cell lines. On the contrary *DUOX2* transcript was highly and homogeneously expressed in all cell lines. $p22^{PHOX}$, a necessary companion for Nox1, Nox2 and Nox3 function, was highly expressed in all the AML cell lines and its expression increased with the differentiation level. $p40^{PHOX}$, $p47^{PHOX}$ and $p67^{PHOX}$ are necessary to compose and regulates Nox2 complex. *P40PHOX*, *P47PHOX* and *P67PHOX* transcripts were detected in all AML cell lines, even if the expression of *P40PHOX* was very low in KG1 cells. Apart from this, there was no major difference in the expression profile of these genes between undifferentiated and differentiated AML cell lines. In line with these data, the expression of *NOXO1* and *NOXA1*, necessary to establish the Nox1 and Nox3 functional complexes, was homogeneously in all AML cell lines.

The proteins involved in NOX2 complex assembly and function have been investigated because of their expression (RNAs) in all the cell lines (Figure 1). As shown in Figure 2, the catalytic subunits Nox2 and $p22^{PHOX}$ have been found in all the AML cell lines. They were weakly detected in undifferentiated cells and more expressed in granulocytic, myelomonocytic and especially monocytic AML cells. The Nox2 regulatory subunit pool presented an interesting profile. Subunit $p40^{PHOX}$ was

not detected in KG1a and NB4 cells but was expressed in all other AML cell lines. Subunit $p47^{PHOX}$ was weakly expressed in undifferentiated cells and highly expressed in differentiated cells, particularly HL60 and ML2. Finally, $p67^{PHOX}$ was very weakly expressed in KG1a and NB4 cells, but highly expressed in differentiated cells especially monocytic differentiated. Altogether, these results observed in protein expression levels were in accordance with the profiles of RNAs expression and suggest an NADPH oxidase enzymatic activity in all AML cells lines whatever their differention stage.

NADPH oxidases activity influences the ROS level of AML cell lines whatever their differentiation stage

The activity of oxidases may produce downstream H_2O_2 since we found the expression of superoxide dismutases (*SOD1*, *SOD2 and SOD3)* in all AML cell lines (data not shown). H_2O_2 production rate has thus been quantified in each cell line. Control cells values have been compared with DPI inhibited and PMA activated values (Figure 3). DPI induced an inhibition of H_2O_2 production in all AML cell lines. H_2O_2 production decreased from approximately 13 RLU/min/10^6 cells in U937 cells to 20-35 RLU/min/10^6 cells in other cell lines (except NB4). These results represented an average inhibition of 40% in KG1a (-40.4 ± 4.9 %), KG1 (-41.7 ± 9.5 %) and HL60 (-38.0 ± 5.3 %) un/low-differentiated AML cell lines (FAB M0/M1/M2). It was twice as low in THP1 (-19.4% ± 2.9%), U937 (-22.9% ± 0.9 %) and MV4-11 (-16.3 ± 3.5 %) more differentiated AML cells (FAB M4/M5). ML2 cell line presented an intermediary diminution (-26.0% ± 9.2 %). The effects of PMA appeared more heterogeneous; the ROS production were clearly increased only in HL60 (+187.7 ± 83.1 %), NB4 (+57.2 ± 18.8 %) and THP1 (+41.0 ± 7.6 %) AML cells without detectable effect in all other cell lines.

Intracellular H_2O_2 level has been quantified in control, DPI and catalase treated cells. H_2O_2 is highly diffusible through the plasma membrane and extracellular NOX derived production could potentially influence its intracellular level. The catalase supplementation in the cultures was used to eliminate the extracellular H_2O_2 and to mimic the NOX inhibition. Extracellular catalase induced a decrease in H_2O_2 intracellular level in all the AML cell lines and similar results were obtained with DPI exposure. As expected, the higher decrease in ROS level was observed in the

monocytic AML cells (Figure 4). Sub-cellular localization of Nrf2 is a reflect of ROS level in leukemic cells and in accordance with the previous results, NADPH oxidase inhibition by DPI exposure was associated with a lower quantity of Nrf2 in the nucleus of all AML cells (Figure 5).

ROS derived from NADPH oxidase constitutive activity regulate leukemic cells proliferation whatever their differentiation stage

The effects of exposure to various doses of DPI and catalase on the number of viable leukemic cells were compared. Without treatment, the number of viable cells after culture for 48 h was increased in all experiments. Interestingly, this increase was lower in DPI treated cells than in untreated cells, mimicking the effects of catalase treatment (Figure 6). We observed a dose-response effect and even the lowest dose of DPI (0.5 µM, used in all other experiments of this article) slowed the increase in the viable cell number (50 % lower on average).

The study of the viability (Trypan blue exclusion) and cell cycle after DPI exposure (0.5 µM, 48h) revealed two profiles. NB4, ML2 and MV4-11 AML cells seemed sensitive to DPI with a decrease in the viability of 10-20 % and a lack of effect on the percentage of cells in G0/G1, S and G2/M phase. Conversely, DPI did not modify the viability of all other AML cells (KG1a, KG1, HL60, THP1 and U937) and we observed a moderate increase in the percentage of cells in S phase (Figure 7). Finally, the number of mitoses during 84h-DPI exposure was quantified by flow cytometry and we observed 1-3 mitoses instead of 5 in all the AML cells studied (Figure 8). Interestingly, we did not found a higher hypoploid sub-G1 peak in DPI-treated cells suggesting the lack of pro-apoptic effect of DPI.

All these results suggest that inhibition of NADPHoxydase by DPI exposure induces a slowing of the cell cycle in accordance with a role of ROS derived from NADPH oxidase activity in the promotion of the AML cells proliferation whatever their differentiation stage.

Discussion

ROS are involved in normal and tumor cells physiology [21, 25-27]. There are growing evidences of their implication in various cellular mechanisms such as proliferation and differentiation [17, 18, 25]. ROS act through different intracellular signaling pathways composing a complex network. Intracellular ROS level is a finely regulated parameter which results in a balance between ROS production and elimination. ROS functions in normal hematopoiesis have been described [2, 28-31]. NADPH oxidases expression and activity have been characterized in these normal cells and interestingly was observed in normal hematopoietic progenitors [32, 33].

In our study we were interested in NADPH oxidases in leukemic cells and studied 8 AML cells lines (various FAB subtypes) to determine the constitutive activity of this enzyme and if oxidases could influence leukemic cells proliferation as shown in many different cells [34]. Very recently, it has been reported that myelomonocytic and monocytic AML cells use Nox2 derived ROS as an immune evasion mechanism [35] and in this study, the authors measured the ROS production of PMA-activated AML cells and did not show the constitutive production of ROS in unactivated cells.

We reported that RNAs from NOX family members were expressed in all the AML cell lines tested. The transcripts from different isoforms, except *NOX4* and *NOX5,* were detected in the cell lines and it's interesting to note that NOX1 transcript appeared as monocytic differentiation specificity while *NOX3* was highly expressed in undifferentiated cells. DUOX members have been found in all AML cells, especially *DUOX2* that was homogeneously highly expressed while *DUOX1* expression was very variable and heterogeneous. The most interesting results were obtained with *NOX2* expression, well previously described in myelomonocytic and monocytic leukemic cells [35]. All the AML cells we studied expressed *NOX2* whatever their FAB differentiation stage and the lower level was found in undifferentiated cells (KG1a, KG1). $p22^{PHOX}$, the other functional catalytic cytochrome b_{558} component, was also expressed in all AML cells, its expression being high even in undifferentiated cells. Moreover it's interesting to note that the transcripts of all the regulatory subunits (P40PHOX, P47PHOX, P67PHOX, NOXO1 and NOXA1) were clearly expressed in all the AML cell lines, suggesting the capacity to generate functional complexes. Le level of P47PHOX was low in KG1a cells, but not those of

NOXO1, a constitutively activated $p47^{phox}$ counterpart able to substitute to $p47^{phox}$ [36-38]. Moreover, the very low level of P40PHOX in these cells doesn't exclude an oxidase activity, p40phox being not strictly necessary [39].

The expression of Nox2 and $p22^{phox}$ proteins was more heterogeneous in the AML cells, but these two proteins were detected everywhere, reinforcing the hypothesis of a functional cytochrome b_{558} even in the undifferentiated leukemic cells. The Nox2 associated proteins $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ and $p67^{phox}$ have been heterogeneously detected. The highest levels were found in myelomonocytic and monocytic leukemic cells (THP1, U937 and MV4-11) and the lowest in KG1a and KG1 leukemic cells. Taken together these results suggest an influence of NADPH oxidases on ROS production by leukemic cells including a Nox2 activated process. We hypothesized that oxidases could be constitutively activated in AML cells even in undifferentiated cell like it was described in normal hematopoiesis [32].

NOX family members are superoxides generators. Their activity generates superoxides which are quickly transformed in H_2O_2 by SOD. We checked *SOD1*, *SOD2* and *SOD3* expression in all AML cells and consequently oxidases could be an important source of H_2O_2 through SODs intervention. This observation allowed us to monitor oxidases activity through the H_2O_2 second messenger. The decreased production observed after DPI treatment revealed a constitutive activity in the leukemic cells and the intensity of the drop suggest that NOX are important ROS producers in AML cell lines. This constitutive oxidases activity in leukemic cells mimics the activity described in normal hematopoiesis [32]. PMA was not able to increase the NADPH oxidase activity of KG1a, KG1, ML2, U937 and MV4-11 leukemic cells, suggesting a maximal activation in these leukemia. Conversely, HL60, NB4 and THP1 leukemic cells presented an important reserve of not activated complexes. These observations were coherent with the activability of oxidases previously described in myelomonocytic and monocytic AML that triggers NK or T cell apoptosis [35].

AML cells present high ROS level [9]. By studying the ROS level in the AML cells lines, the similar decrease observed with extracellular catalase and DPI suggest that NADPH oxidase / SOD derived H_2O_2 were highly diffusible through the plasma membrane. The lower level of intracellular ROS and the preferential cytoplasmic localization of Nrf2 [40, 41] that we found after DPI exposure, suggest that NADPH oxidase participates to the control of intracellular ROS homeostasis and

consequently could regulate the leukemic proliferation. DPI and catalase effects on leukemic cell viability, cell cycle phase and quantification of the mitoses established that NADPH oxidase promoted the proliferation of the AML cell lines. These results are in accordance with the high level of ROS reported in primary AML [9] , leukemia being highly proliferative diseases. Moreover, leukemic stem cells (LSCs) are thought to be quiescent [42] and a differential ROS level has been reported in leukemic stem cells and leukoblast [9, 10]. All these elements suggest that NADPH oxidase may be a regulator of leukemic cells ROS level involved in leukemic proliferation.

It could be interesting to target this enzyme with pharmacological tools, nevertheless the oxidases inhibition strategies targeting mature blasts could potentially induce contrary effects if it strength and promote LSCs subpopulation. Furthers studies of primary AML will clarify the respective expression and activity of NADPH oxydase in the LSCs and leukoblasts subpopulations to optimize the AML therapeutic opportunities.

Aknowledgments

The authors are grateful to Rex Scaramuzzi for critical reading of the manuscript. Joan Leclerc received grants from the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, from the Société Française d'Hématologie and from the CANCEN association. This study was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer, the International Rotary Club of Blois (district 1720) and the French "Les Sapins de l'Espoir Contre le Cancer" association.

Figures

Figure 1. NADPH oxidases RNAs expression in AML cell lines. Oxidases RNAs expression were evaluated by RT-qPCR. Results were normalized using *GAPDH* expression (ΔCt *vs.* GAPDH). In the scale used, plot size represents the average expression level (n=3). The dark grey plots present the catalytic subunits and light grey plots the regulatory subunits.

Figure 2. Nox2 complex expression in AML cell lines. Twenty micrograms of total protein extract were SDS-PAGE resolved and blotted. Phagocyte oxidase components (Nox2, $p22^{phox}$, $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ and Rac1) were detected using specific antibodies and Hsc70 have been used as loading control. Representative experiment (n=10)

Figure 3. Effects of oxidases modulation on ROS production by AML cell lines. Cells were washed and suspended in PBS supplemented with 0.5 M $MgCl_2$, 0.9 M $CaCl_2$, 20 mM glucose. DPI 20 µM and PMA 80 ng/mL were used as oxidases inhibitor and activator, respectively. To measure H_2O_2 production, 10^6 cells per well were used and H_2DCFDA 10 µM was added. H_2O_2 production was followed by DCF fluorescence acquisition; (A) Example of kinetic curve allowing the calculation of H_2O_2 production rate (RLU/min/10^6 cells); (B) Histograms (mean +/- sem, n=3) for control cells (blue), PMA activated cells (green) and DPI treated cells (red).

Figure 4. Effects of oxidases modulation on intracellular ROS level in AML cell lines. DPI 20 µM was used as inhibitor and catalase 0.3 mg/mL was used as oxidases inhibition mimetic. One hour later, the cells were stained with CM-H_2DCFDA 10 µM for 10 min before cytometric analysis of DCF fluorescence. The histogram presents the intracellular H_2O_2 level (mean +/- sem, n=5) of control cells (blue), DPI treated cells (red) and catalase treated cells (orange). A representative experiment on MV4-11 cell line is presented.

Figure 5. Effect of oxidases inhibition on Nrf2 sub-cellular localization. Nrf2 is a marker of high level of intracellular ROS as an increase in ROS level induces its

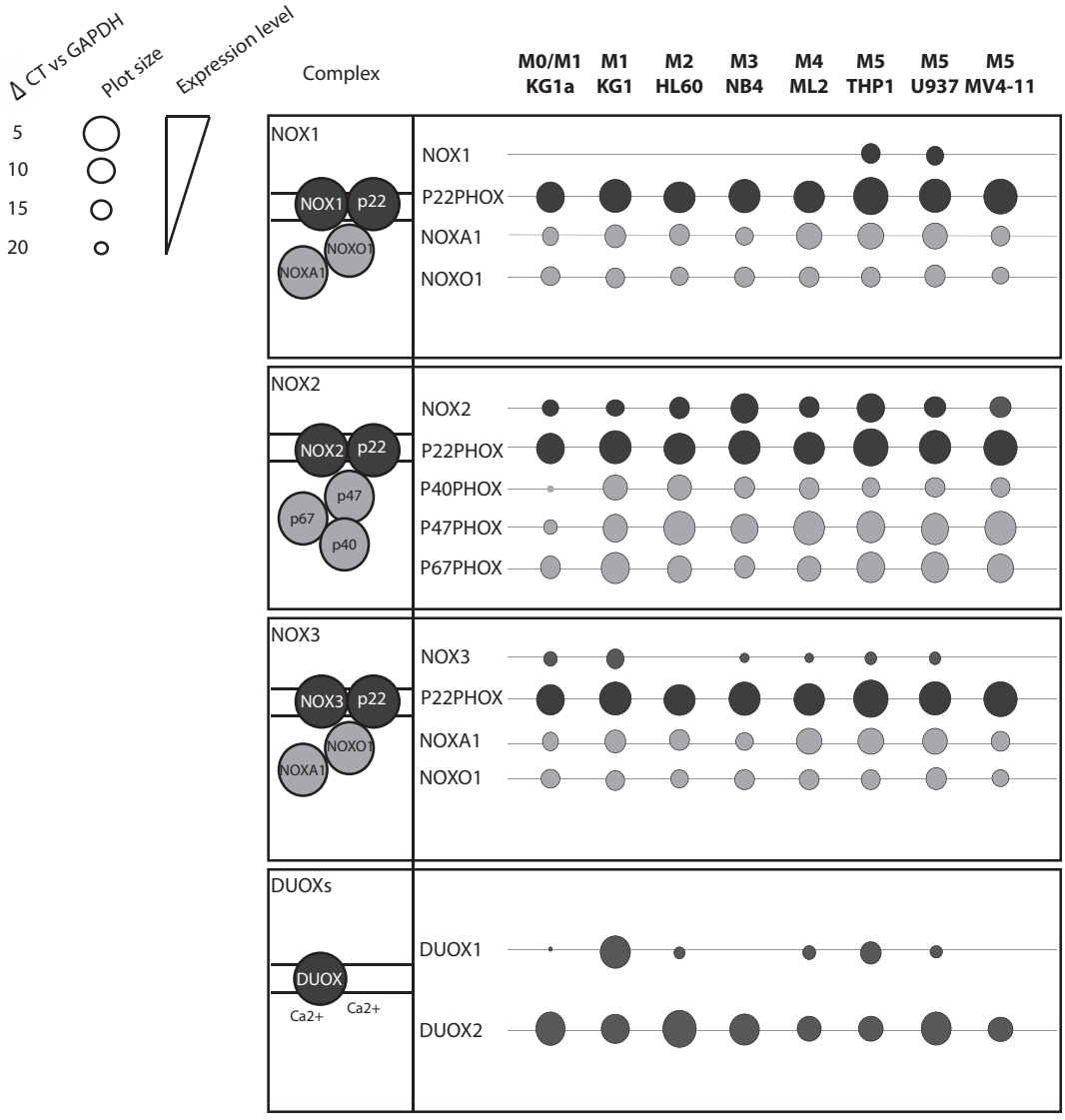
activation and translocation to the nucleus. Nuclear (N) *vs.* cytosolic (C) protein extraction was realized after DPI treatment (0.5 µM, 48h). Topoisomerase 1 (Topo1) and Raf1 were used respectively as nuclear and cytosolic fraction loading and fractionation quality controls (representative experiment).

Figure 6. Effect of oxidases inhibition on the number of viable AML cells. MTT assays were performed to follow cells proliferation during 48h. Effect of DPI (0.5-1-2 µM; blue curves) and catalase (250- 500 µg/mL; orange curves) were evaluated (mean +/- sem, n=3). These curves present the 590 nm formazan absorbance, a reflect of the number of viable cells.

Figure 7. Effect of oxidases inhibition on the viability and cell-cycle phases distribution. Cells were cultured during 48 h with DPI 0.5 µM. (A) Cell viability was evaluated by Trypan blue exclusion. (B) Cell cycle phases distribution was studied by propidium iodide staining. (mean +/- sem, n=3)

Figure 8. Effect of oxidases inhibition on the number of mitoses. AML cells were initially stained with the fluorescent Cell proliferation Dye efluor 450 (t0). The cells were treated with DPI (0.5 µM, 84 h) before fluorescence measurement (t84h). The intensity of the fluorescence shift reflects the number of mitoses (representative experiment).

Figure 1:



NOX4 and NOX5 not expressed

Figure 2:

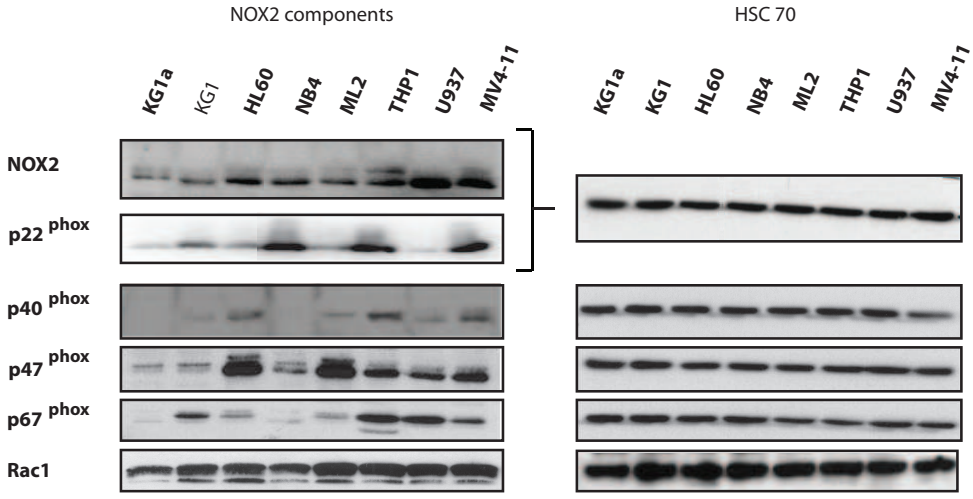

NOX2 components
HSC 70
KG1a
KG1
HL60
NB4
ML2
THP1
U937
MV4-11
NOX2
p22 phox
p40 phox
p47 phox
p67 phox
Rac1

Figure 3:

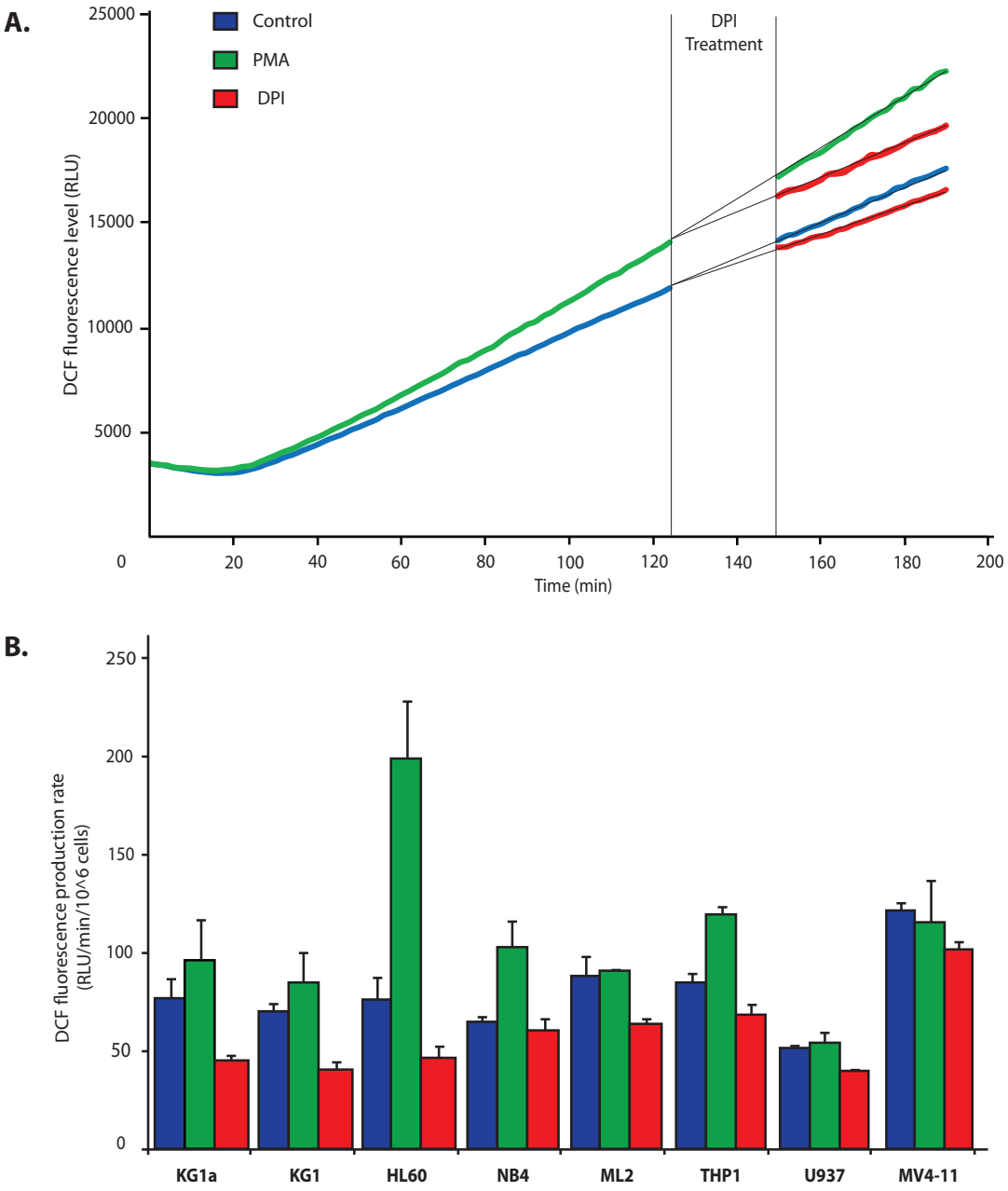

A.
Control
PMA
DPI
DPI
Treatment
DCF fluorescence level (RLU)
25000
20000
15000
10000
5000
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
Time (min)
B.
DCF fluorescence production rate
(RLU/min/10^6 cells)
250
200
150
100
50
0
KG1a
KG1
HL60
NB4
ML2
THP1
U937
MV4-11

Figure 4:

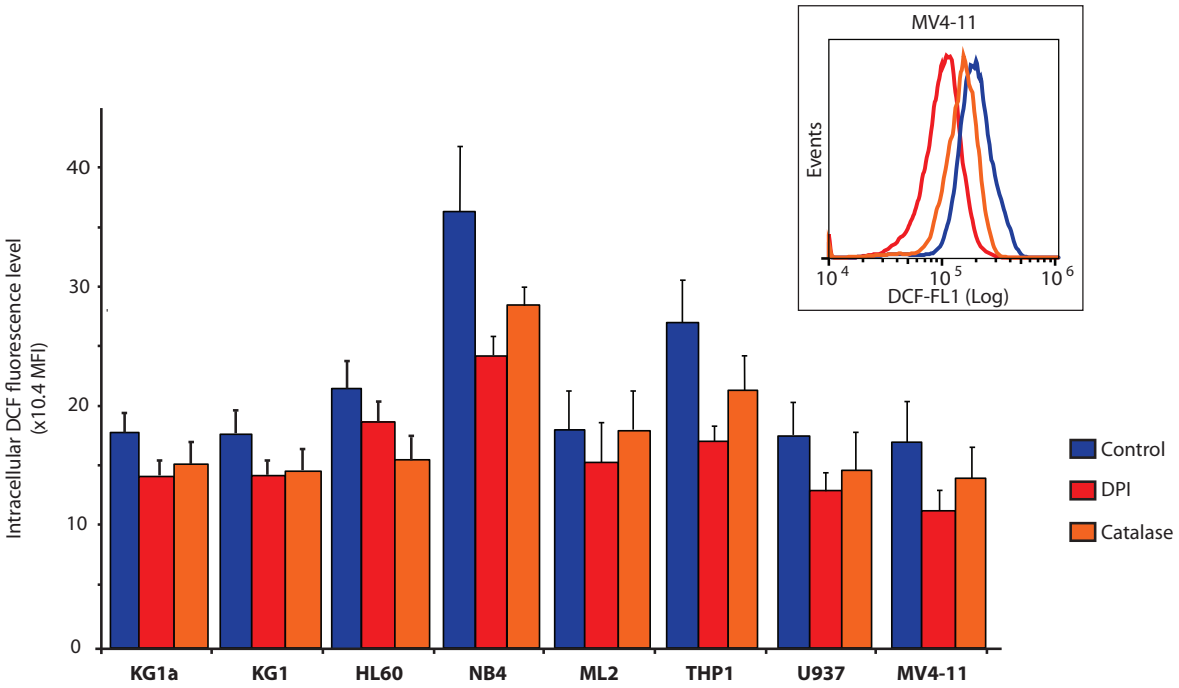

MV4-11
Events
10 4
10 5
10 6
DCF-FL1 (Log)
Intracellular DCF fluorescence level
(x10.4 MFI)
0
10
20
30
40
KG1a
KG1
HL60
NB4
ML2
THP1
U937
MV4-11
Control
DPI
Catalase

Figure 5:

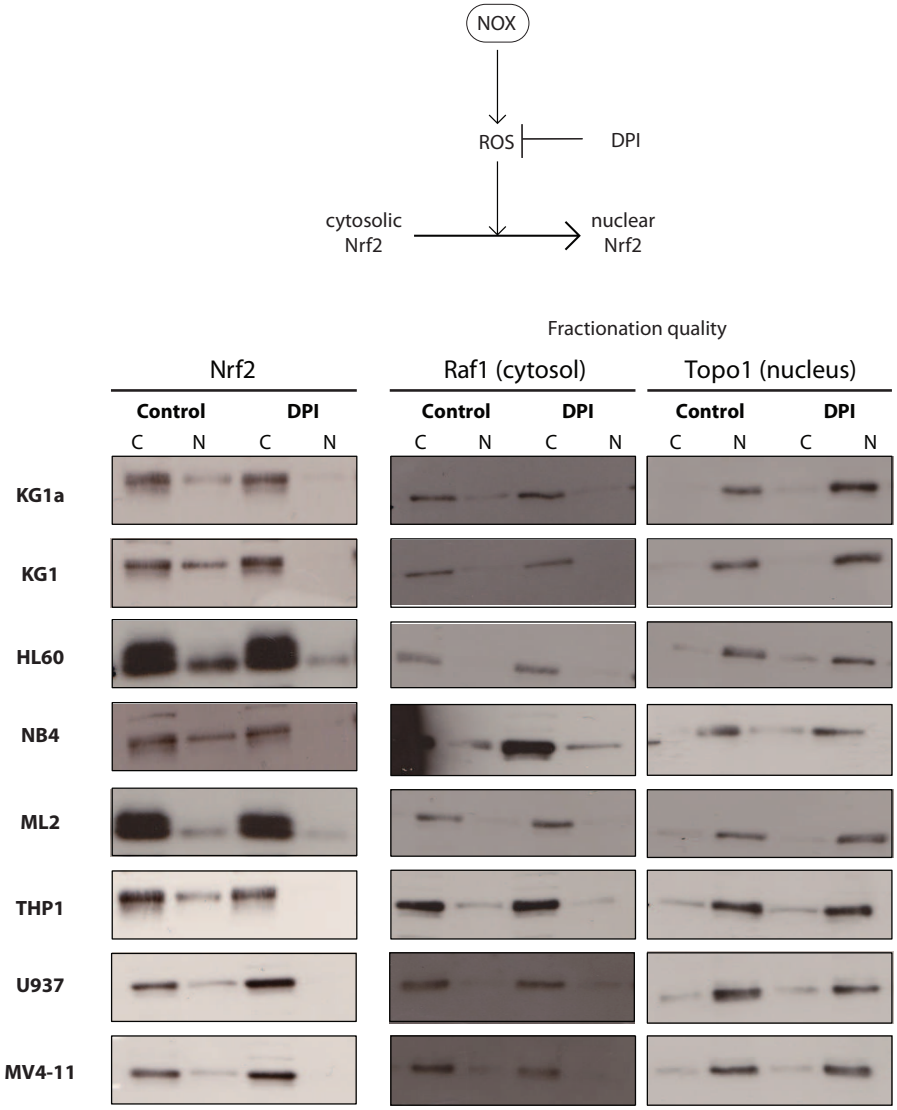

NOX
ROS
DPI
cytosolic Nrf2
nuclear Nrf2
Fractionation quality
Nrf2
Raf1 (cytosol)
Topo1 (nucleus)
Control
DPI
C
N
KG1a
KG1
HL60
NB4
ML2
THP1
U937
MV4-11

Figure 6:

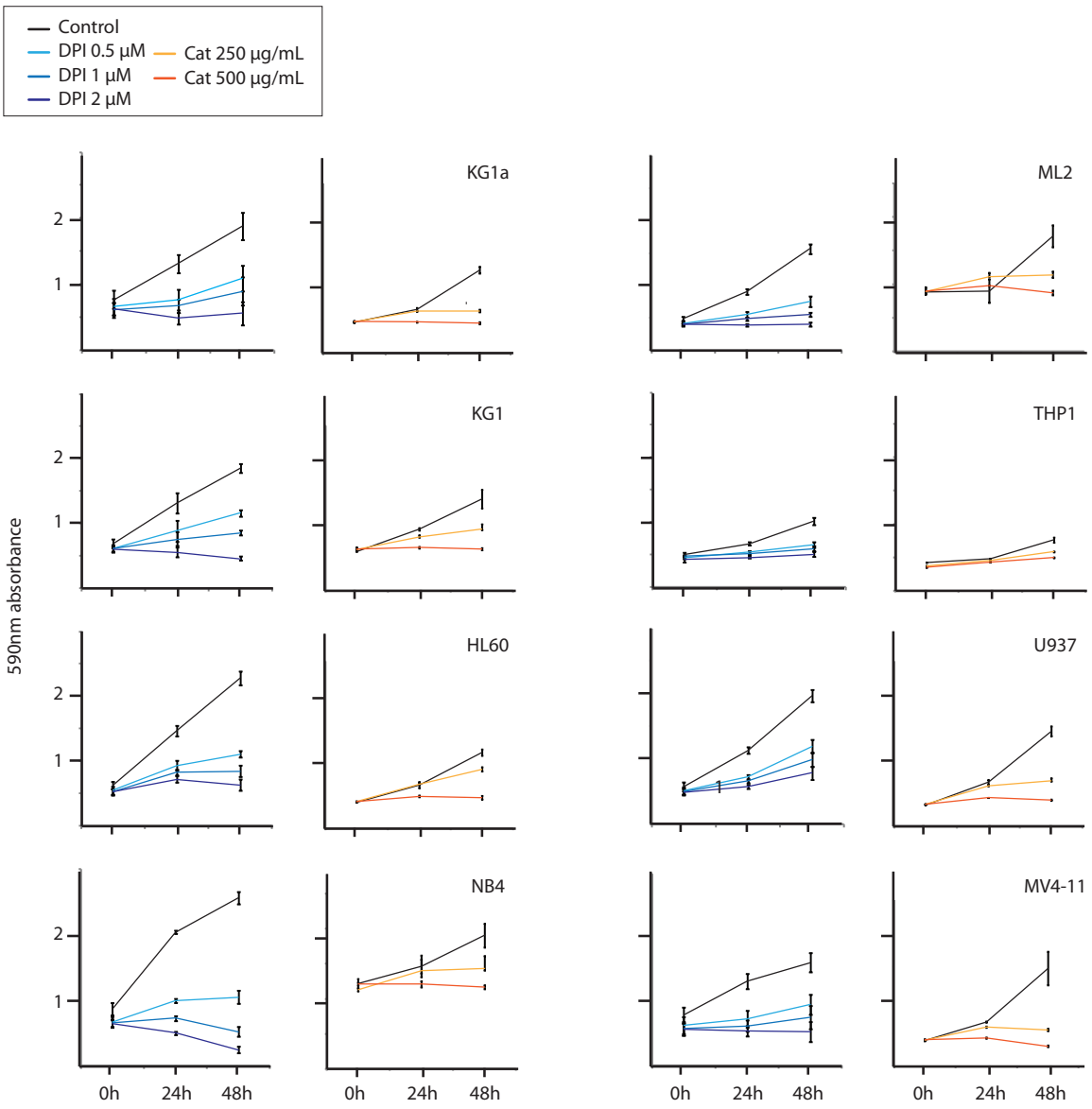
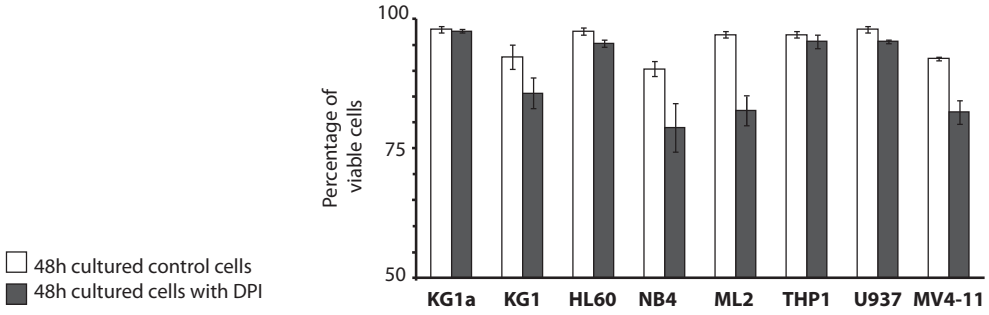

Control
DPI 0.5 µM
DPI 1 µM
DPI 2 µM
Cat 250 µg/mL
Cat 500 µg/mL
590nm absorbance
KG1a
ML2
KG1
THP1
HL60
U937
NB4
MV4-11
0h
24h
48h

Figure 7:

A.


100
75
50
Percentage of viable cells
48h cultured control cells
48h cultured cells with DPI
KG1a
KG1
HL60
NB4
ML2
THP1
U937
MV4-11

B.

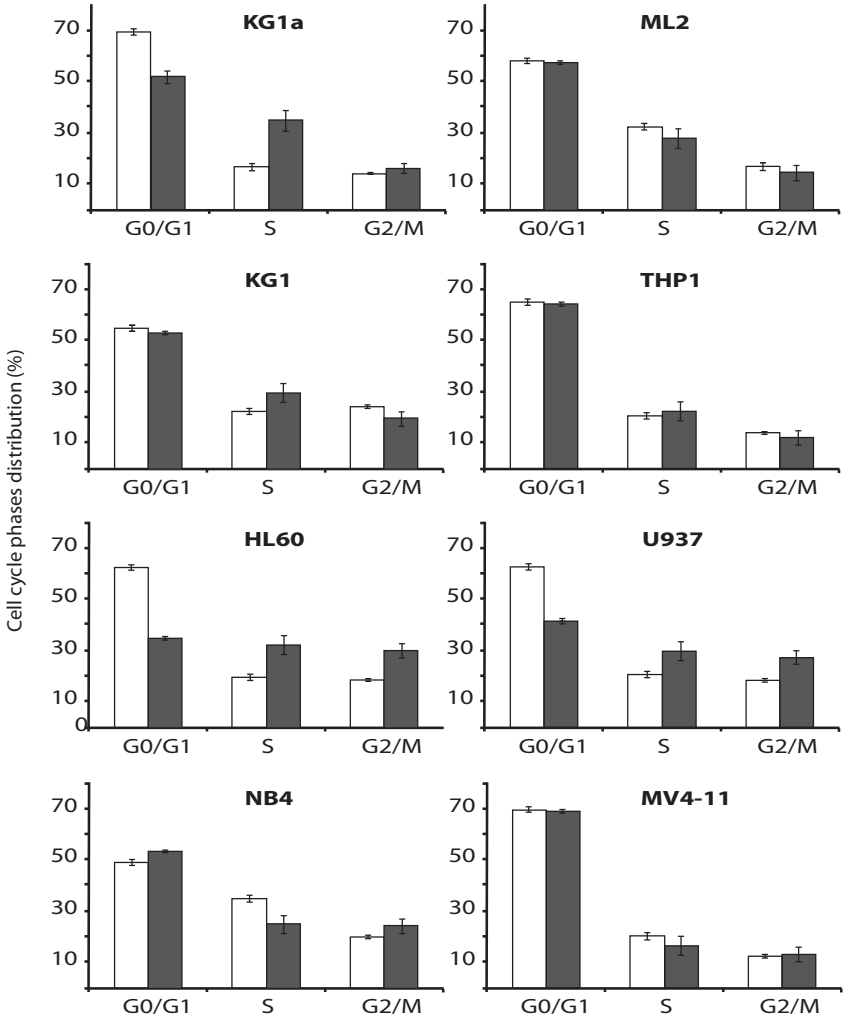
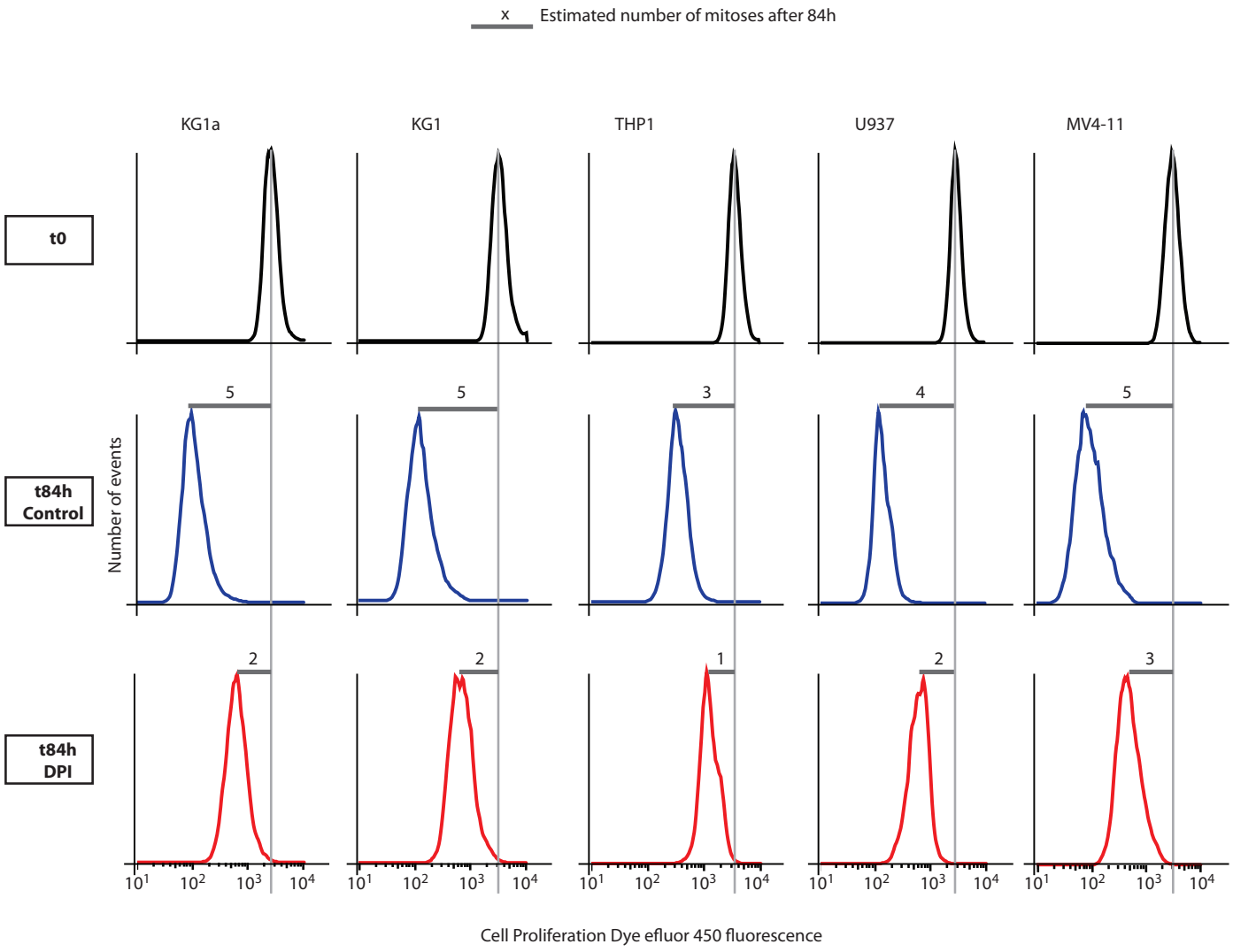

Cell cycle phases distribution (%)
KG1a
ML2
KG1
THP1
HL60
U937
NB4
MV4-11
70
50
30
10
0
G0/G1
S
G2/M

Figure 8:


x Estimated number of mitoses after 84h
KG1a
KG1
THP1
U937
MV4-11
t0
t84h Control
t84h DPI
Number of events
5
5
3
4
5
2
2
1
2
3
10^1 10^2 10^3 10^4
Cell Proliferation Dye efluor 450 fluorescence

References

1. Zhu, Q.-S., et al., *G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth.* Blood, 2006. **107**(5): p. 1847-1856.
2. Tothova, Z., et al., *FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress.* Cell, 2007. **128**(2): p. 325-339.
3. Owusu-Ansah, E. and U. Banerjee, *Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation.* Nature, 2009. **461**(7263): p. 537-541.
4. Sattler, M., et al., *Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species.* Blood, 1999. **93**(9): p. 2928-2935.
5. Czech, M.P., *Differential effects of sulfhydryl reagents on activation and deactivation of the fat cell hexose transport system.* The Journal of biological chemistry, 1976. **251**(4): p. 1164-1170.
6. Mukherjee, S.P., R.H. Lane, and W.S. Lynn, *Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulfhydryl reagents.* Biochemical pharmacology, 1978. **27**(22): p. 2589-2594.
7. Mukherjee, S.P. and C. Mukherjee, *Similar activities of nerve growth factor and its homologue proinsulin in intracellular hydrogen peroxide production and metabolism in adipocytes. Transmembrane signalling relative to insulin-mimicking cellular effects.* Biochemical pharmacology, 1982. **31**(20): p. 3163-3172.
8. Whitacre, C.M. and M.K. Cathcart, *Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens.* Cellular immunology, 1992. **144**(2): p. 287-295.
9. Lagadinou, E.D., et al., *BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells.* Cell stem cell, 2013. **12**(3): p. 329-341.
10. Herault, O., et al., *A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells.* The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(5): p. 895-901.
11. Kato, M., et al., *Superoxide radical generation and Mn- and Cu-Zn superoxide dismutases activities in human leukemic cells.* Hematological oncology, 2003. **21**(1): p. 11-16.
12. Sallmyr, A., J. Fan, and F.V. Rassool, *Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair.* Cancer letters, 2008. **270**(1): p. 1-9.
13. Battisti, V., et al., *Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients.* Clinical biochemistry, 2008. **41**(7-8): p. 511-518.
14. Farquhar, M.J. and D.T. Bowen, *Oxidative stress and the myelodysplastic syndromes.* International journal of hematology, 2003. **77**(4): p. 342-350.
15. de Carvalho, D.D., et al., *Nox1 downstream of 12-lipoxygenase controls cell proliferation but not cell spreading of colon cancer cells.* International journal of cancer. Journal international du cancer, 2008. **122**(8): p. 1757-1764.
16. Arnold, R.S., et al., *Nox1 expression determines cellular reactive oxygen and modulates c-fos-induced growth factor, interleukin-8, and Cav-1.* The American journal of pathology, 2007. **171**(6): p. 2021-2032.
17. Maraldi, T., et al., *NAD(P)H oxidase isoform Nox2 plays a prosurvival role in human leukaemia cells.* Free radical research, 2009. **43**(11): p. 1111-1121.

18. Clerkin, J.S., et al., *Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis.* Cancer letters, 2008. **266**(1): p. 30-36.
19. Bedard, K. and K.-H. Krause, *The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology.* Physiological Reviews, 2007. **87**(1): p. 245-313.
20. Nauseef, W.M., *Biological roles for the NOX family NADPH oxidases.* The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(25): p. 16961-16965.
21. Finkel, T., *Reactive oxygen species and signal transduction.* IUBMB life, 2001. **52**(1-2): p. 3-6.
22. Hassan, H.M., *Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases.* Free radical biology & medicine, 1988. **5**(5-6): p. 377-385.
23. Rushworth, S.A., et al., *The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF-kappaB and underlies its chemo-resistance.* Blood, 2012. **120**(26): p. 5188-98.
24. Bloom, D.A. and A.K. Jaiswal, *Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression.* J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44675-82.
25. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* The international journal of biochemistry & cell biology, 2007. **39**(1): p. 44-84.
26. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.* Chemico-biological interactions, 2006. **160**(1): p. 1-40.
27. Finkel, T., *Oxidant signals and oxidative stress.* Current opinion in cell biology, 2003. **15**(2): p. 247-254.
28. Gupta, R., S. Karpatkin, and R.S. Basch, *Hematopoiesis and stem cell renewal in long-term bone marrow cultures containing catalase.* Blood, 2006. **107**(5): p. 1837-1846.
29. Ito, K., et al., *Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells.* Nature medicine, 2006. **12**(4): p. 446-451.
30. Jang, Y.-Y. and S.J. Sharkis, *A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche.* Blood, 2007. **110**(8): p. 3056-3063.
31. Vignon, C., et al., *Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Regulate the Metabolism of H2O2 In Human Leukemic Cells.* ASH Annual Meeting Abstracts, 2010. **116**(21).
32. Piccoli, C., et al., *Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species.* Biochemical and biophysical research communications, 2007. **353**(4): p. 965-972.
33. Piccoli, C., et al., *Role of reactive oxygen species as signal molecules in the pre-commitment phase of adult stem cells.* The Italian journal of biochemistry, 2007. **56**(4): p. 295-301.
34. Doroshow, J.H., et al., *Antiproliferative mechanisms of action of the flavin dehydrogenase inhibitors diphenylene iodonium and di-2-thienyliodonium based on molecular profiling of the NCI-60 human tumor cell panel.* Biochemical pharmacology, 2012. **83**(9): p. 1195-1207.
35. Aurelius, J., et al., *Monocytic AML cells inactivate antileukemic lymphocytes: role of NADPH oxidase/gp91(phox) expression and the PARP-1/PAR pathway of apoptosis.* Blood, 2012. **119**(24): p. 5832-5837.
36. Bánfi, B., et al., *Two Novel Proteins Activate Superoxide Generation by the NADPH Oxidase NOX1.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(6): p. 3510-3513.

37. Bánfi, B., et al., *NOX3, a Superoxide-generating NADPH Oxidase of the Inner Ear.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(44): p. 46065-46072.
38. Takeya, R., et al., *Novel Human Homologues of p47phox and p67phox Participate in Activation of Superoxide-producing NADPH Oxidases.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(27): p. 25234-25246.
39. Babior, B.M., J.D. Lambeth, and W. Nauseef, *The neutrophil NADPH oxidase.* Archives of biochemistry and biophysics, 2002. **397**(2): p. 342-344.
40. Rushworth, S.A., K.M. Bowles, and D.J. MacEwan, *High basal nuclear levels of Nrf2 in acute myeloid leukemia reduces sensitivity to proteasome inhibitors.* Cancer research, 2011. **71**(5): p. 1999-2009.
41. Homma, S., et al., *Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer.* Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2009. **15**(10): p. 3423-3432.
42. Guan, Y., B. Gerhard, and D.E. Hogge, *Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML).* Blood, 2003. **101**(8): p. 3142-9.

3. Discussion

Cette étude à mis en évidence l'expression de multiples isoformes des oxydases dans les cellules leucémiques. Certaines semblent avoir une expression dépendante du niveau de différenciation, comme par exemple *NOX1* dont l'expression n'est observée que dans les lignées à différenciation monocytaire THP1 et U937, ou à l'inverse *NOX3* qui est plus exprimé dans les lignées plus immatures KG1a et KG1. Toutefois des oxydases sont exprimées (ARN, protéine) dans chacunes de lignées leucémiques, et en particulier NOX2 et l'ensemble de ses sous-unités régulatrices qui présentent une expression plus importante dans les lignées à différenciation monocytaire.

Au niveau fonctionnel, l'observation de la production d'H_2O_2 a permis de mettre en évidence une fraction de ROS produite par les oxydases. Il existe dans les cellules leucémiques de tous les types FAB étudiés une activation constitutive des oxydases, productrice de ROS. L'analyse du niveau intracellulaire de ROS en présence de catalase éliminant les H_2O_2 extracellulaires produits par la dismutation des superoxydes a permis d'établir que les ROS produits par les oxydases contribuent au niveau global de ROS intracellulaires et donc potentiellement à la physiologie des cellules leucémiques. L'inhibition des oxydases par le DPI diminue de façon dose dépendante la cellularité, en faveur d'un effet anti-prolifératif du DPI. L'analyse du cycle cellulaire et de l'apoptose n'ont pas objectivé sur les lignées de diminution des phases S, G2/M, ni d'augmentation de l'hypoploïdie pré-G1 lié au DPI. Ceci suggère un effet anti-prolifératif en lien avec un allongement du cycle cellulaire. Nos résultats expérimentaux sont donc en faveur d'un impact positif des ROS issus des oxydases sur la prolifération leucémique quel que soit le stade de différenciation de la leucémie. Si ces résultats sont confirmés sur des cellules primaires et par une stratégie d'inhibition *via* des shRNA, il est probable que les NADPH oxydases participent à la physiopathologie des LAM non seulement en inhibant les réactions immunitaires de défense (Aurelius et al., 2012), mais aussi en régulant positivement le cycle cellulaire des leucoblastes. Ceci renforce l'intérêt d'une compréhension accrue de leur rôle en vue d'un ciblage d'intérêt thérapeutique.

Cette première partie expérimentale sur le compartiment leucoblastique des leucémies n'a pas pris en compte une potentielle différence d'activité oxydase entre CSL et leucoblastes. Les expériences rapportées dans l'article 2 de cette thèse apportent des éléments de réponse à cette problématique.

Article 2 : Une plus faible activité NADPH oxydase dans les cellules souches leucémiques induites par les oncogènes Hoxa9 et Meis1. (Article en préparation)

« A lower NADPH oxidase activity in Hoxa9-Meis1 induced leukemic stem cells »

Leclerc J.[1*], Debeissat C. [2*], Sauvageau G.[3], Herault O.[1,2]

[1] Université François Rabelais, CNRS UMR 7292, LNOx team, Tours, France

[2] CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, Tours, France

[3] Université de Montreal, Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal, Canada

[*] Contribution équivalente

1. Introduction

Pour analyser la différence d'activité NADPH oxydases entre des CSL et des leucoblastes, nous avons utilisé un modèle de leucémies murines primaires générées à partir des oncogènes *Hox9* et *Meis1*, les leucémies FLA2 et FLB1 (Herault et al., 2012; Trost et al., 2012; Wilhelm et al., 2011). Ces leucémies ont été générées à partir de cellules KLS de foie fœtal et ne diffèrent pas sur le plan phénotypique et cytogénétique, mais présentent une différence de niveau de ROS (très diminué dans la leucémie FLA2) et de fréquence en CSL (70 % pour la leucémie FLA2 et <1% pour la leucémie FLB1). En outre, dans ces leucémies les ROS activent spécifiquement p38MAPK (Trost et al., 2012) s'il a déjà été bien établi que la différence de niveau de ROS pouvait être associée à une plus grande activité de la glutathione peroxydase 3 (GPx3) dans les leucémies FLA2 (Herault et al., 2012), le versant production de ROS et en particulier l'analyse de l'activité NADPH oxydase de ces cellules n'a pas été caractérisé à ce jour et est un des possibles déterminants du niveau d'H_2O_2 dans les CSL.

L'activation de la NADPH oxydase nécessite le recrutement des sous-unités activatrices $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$, et l'assemblage du complexe est facilité par l'acide arachidonique (AA) (Hii and Ferrante, 2007) libéré par la phospholipase A2 cytoplasmique (PLA2c) à partir des phospholipides membranaires (Chakraborti et al., 2012).

Pour analyser la NADPH oxydase dans les leucémies FLA2 et FLB1, nous avons évalué l'impact de p38MAPK sur l'activation de la PLA2c (Chakraborti et al., 2012; Menzel et al., 2012) à partir des phospholipides membranaires, la différence de libération d'AA, la colocalisation membranaire de $p67^{phox}$ et $gp91^{phox}$ (NOX2) et l'effet du DPI et du PMA sur la production de ROS.

Ces résultats, dont certains devront être consolidés, sont en faveur d'une moindre activation de la NADPH oxydase dans les CSL (FLA2), comparativement aux cellules blastiques (FLB1).

2. Matériel et méthode

2.1. Reconstitution in vivo des leucémies FLA2 et FLB1

L'ensemble de la procédure expérimentale a été approuvée par le Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale Val de Loire (n°2012-08-5) et par le Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux de l'Université de Montréal. Les souris C57BL-6 (Ly 5.2) ont été produites et maintenues, en cages ventilées individuellement, et disposaient de nourriture et d'eau *ad libitum*. Toutes les expériences ont été réalisées avec des souris âgées de 6 à 15 semaines. Les souris ont été conditionnées par une injection intrapéritonéale de busulfan (Busilvex®, (Robert-Richard et al., 2006)) à 25 mg/kg 24h avant l'injection des cellules leucémiques (Robert-Richard et al., 2006). 2.10^5 cellules FLA2 ou FLB1 (Ly 5.1) ont ensuite été injectées en intraveineuse. Aux premiers signes cliniques de développement leucémique, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et leurs fémurs et tibias ont été prélevés. La moelle osseuse a été extraite en PBS-2% SVF, filtrée (70 µm) puis analysée.

Le développement leucémique a été confirmé par l'analyse du chimérisme Ly 5.1/Ly 5.2 par cytométrie en flux. Pour cela, 1.10^6 cellules ont été co-marquées avec un anti-mCD45-1 PE (BD Pharmingen ; #553776) et un anti-mCD45-2 FITC (eBiosciences ; #11-0454) puis lavées en PBS et analysées avec un FACS Canto II (Beckton Dickinson). Seules les souris présentant un envahissement leucémique médullaire supérieur à 95 % ont été retenues pour les analyses.

2.2. Inhibition *in vivo* de p38MAPK et PLA2c

L'inhibition de p38MAPK a été obtenue avec du SB203580 (Sigma), injecté en intra-péritonéal à raison de 3 injections de 15 mg/kg à deux jours d'intervalle à la fin du développement de la leucémie FLB1, le SB203580 étant reconstitué en DMSO, des quantités équivalentes de DMSO ont été injectées aux souris « contrôles ». L'inhibition obtenue a été vérifiée en étudiant par western blot l'une des cibles de p38MAPK, la MAPKAP kinase 2 (MAPKAPK2).

2.3. Western blot pour MAPKAPK2 et PLA2c

Les cellules (5.10^6) ont été lavées 3 fois en PBS avant que les protéines soient extraites en tampon Cytobuster (Merck4Biosciences) supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases (Sigma). Les protéines (20 µg) ont été séparées par migration en gel de polyaccrylamide 10% en condition dénaturantes et transférées sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les membranes ont été incubées une nuit à 4 °C sous agitation en présence des anticorps primaires spécifiques, puis lavées trois fois avant incubation avec l'anticorps secondaire couplé à la horse radish peroxydase dirigé contre l'espèce d'origine de chaque anticorps. La révélation a été réalisée grâce a une solution de luminol permettant l'utilisation de films photographiques pour visualiser la présence des protéines d'intérêt.

2.4. Quantification de l'acide arachidonique

Les lipides ont été extraits de la membrane plasmique suivant la méthode de Folch. (Folch et al., 1957). Les acides gras (AG) ont été extrait avec de l'hexane puis analysés en chromatographie gazeuse (Hewlett Packard 5890 gas chromatograph) avec des colonnes CPSIL-88 (Varian) et équipé d'un détecteur d'ionisation de flamme (FID). Le gaz propulseur utilisé était de l'hydrogène à une pression de 210 kPa. Les extraits ont été portés à une température de 60 °C pendant 5 min, puis élevés à 165 °C (+15°C/min) pour 1 min, puis portés à 225°C (+2 °C/min) pour 17 min. L'injecteur et le détecteur ont eux été maintenus à une température de 250°C. Les AG esterifiés ont été identifiés par comparaison à un standard de synthèse (Sigma Aldrich). Les données ont été traitées à l'aide du logiciel EZChrom Elite (Agilent Technologies) et présentés en pourcentage des acides gras totaux.

2.5. Colocalisation des sous-unités NOX2 et $p67^{phox}$

Immédiatement après extraction des fémurs et tibias, les cellules ont été conservées sur glace jusqu'à analyse. Les prélèvements de moelle ont été lavés 3 fois en PBS les culots ont été repris en PBS 3,7% para-formaldéhyde, 15 min, 4 °C, pour fixer les cellules. Les cellules fixées ont été lavées de nouveaux 3 fois en PBS puis les culots ont été repris dans 1mL de tampon PBS, 1% BSA, 0,5% Tween20, 45 min, à température ambiante, pour perméabiliser la membrane plasmique en vue du marquage intracellulaire. Après cette étape, elles ont été de nouveau reprises dans 200µL du même tampon. Les anticorps primaires anti-$gp91^{phox}$ (sc5827, Santa Cruz) et anti-$p67^{phox}$ (610912, Beckton Dickinson) ont été ajoutés dilués au 1:50 pour une incubation d'une heure à température ambiante sous légère agitation. Les

cellules ont ensuite été lavées 3 fois en tampon de perméabilisation puis incubées avec des anticorps secondaires fluorescents adaptés à l'espèce d'origine de chaque anticorps primaire utilisés au 1:200, 1h, à température ambiante sous légère agitation, suivie de 3 lavages en tampon de perméabilisation et d'une reprise finale en PBS.
La suspension de cellules marquées a été déposée sur une lamelle de verre préalablement coatée à la poly-L-Lysine, à l'obscurité, pendant quelques minutes. Le montage entre lame et lamelle a été réalisé en ajoutant une goutte de milieu de montage Vectashield Hard Set contenant du Dapi (Vector), conservé une nuit dans le noir à 4°C pour polymérisation avant d'être scellé.

Les lames ont été observées avec un microscope confocale à balayage laser (Olympus FV500) et une caméra d'acquisition rapide (Hamamatsu ORCA-r2),. L'acquisition des images et l'analyse de colocalisation a été réalisée à l'aide du logiciel Imaris 7 (Bitplane AG). Pour l'acquisition de chaque point, les fluorophores utilisés ont été excités et acquis séquentiellement à leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques. L'analyse de colocalisation a été effectuée par une analyse de la colocalisation point par point (dans le repère x,y) pour chacune des couches acquises individuellement dans l'épaisseur de la cellule (composante z). L'image finale reflète l'empilement des analyses de colocalisation de chaque couche, ce procédé permettant de représenter la colocalisation analysée dans un espace en trois dimensions par une image plane en deux dimensions.

2.6. Analyse du niveau de production de ROS

Les souris normales, FLA2 et FLB1 ont été exposées au même conditionnement (Busulfan). Les cellules médullaires ont été reprises dans un milieu composé de PBS, supplémenté avec 0,9M $CaCL_2$, 0,5M $MgCl_2$ et 20mM de glucose. Elles ont été réparties en plaque 96 puits à une concentration de 10^6 cellules par puits. Les modulateurs pharmacologiques des oxydases, DPI et PMA ont été dilués en tampon de réaction et ajoutés dans les puits correspondants de façon à obtenir une concentration de 20 µM pour le DPI et 80 ng/mL pour le PMA dans un volume réactionnel de 200 µL. Le DPI a été ajouté 30 min avant le début de l'expérience tandis que le PMA a été ajouté au départ des mesures. Les mesures ont commencé lors de l'ajout de DCF-DA à une concentration finale de 10µM/puits. L'apparition de fluorescence du DCF a été suivie toutes les 2 min pendant 2 h afin d'obtenir la cinétique de sa production. Pour chaque expérience, chaque moelle murine la mesure a été réalisée sur huit puits différents. La courbe moyenne de production de DCF à l'état stable

étant linéaire, le coefficient directeur de la droite de régression linéaire a été utilisé pour déterminer la production de DCF et donc de ROS par unité de temps, par million de cellules. Les résultats obtenus avec le PMA ont été utilisés comme référence d'activation maximale des oxydases tandis que ceux obtenus avec le DPI ont été utilisés comme référence de production de ROS sans la contribution des oxydases. La définition de ces bornes a permis de calculer le pourcentage d'activation des oxydases. La mesure de fluorescence a été réalisée avec un fluorimètre Mithras LB940 (Berthold Technologies), le protocole de mesure et acquisition a été géré par le logiciel associé MicroWin2000.

2.7. Expression des sous-unités de la NADPH oxydases phagocytaire

L'expression de *Cybb* ($gp91^{phox}$), *Cyba* ($p22^{phox}$), *Ncf1* ($p47^{phox}$), *Ncf2* ($p67^{phox}$) et *Ncf4* ($p40^{phox}$) a été mesurée par qRT-PCR en utilisant la stratégie UPL (Roche). La *Gapdh* a été utilisée comme gène domestique. Les cellules à raison de 5.10^6 ont été reprises dans 1mL et l'extraction des ARN totaux en phénol/chloroforme ont été réalisées suivant les instructions du fabricant. La rétrotranscription des ARN a été réalisée avec le kit Superscript Vilo^{TM} cDNA Synthesis (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

Un thermocycleur Light Cycler 480 (Roche) a été utilisé pour réaliser les différents cycles d'amplification. Le logiciel d'analyse propose un Ct (cycle thresold) correspondant au cycle au cours duquel la courbe du signal de fluorescence commence à être exponentielle. Un coefficient d'expression ($\Delta Ct = Ct_{gène} - Ct_{GAPDH}$) peut être calculé pour chaque gène étudié en prenant comme référence le gène domestique. Ensuite, le coefficient de variation de l'expression du gène dans une leucémie a été comparé à son expression dans l'autre leucémie grâce à la quantification relative, $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} = (\Delta Ct_{\text{gène cible}} - \Delta ct_{\text{gène de référence}})$. Les couples d'amorces ont été préalablement validés avec un efficacité proche de 2. Chaque couple d'amorces était testé sur une série de dilutions d'ADNc issus d'ARN totaux murins (Stratagene, Agilent Technologies).

3. Résultats

3.1. Contrôle de l'envahissement par les leucémies greffées

Le pourcentage de cellules leucémiques dans la moelle a été calculé en quantifiant la fraction $CD45.1^+$ $CD45.2^-$. Celle-ci était supérieure à 90 % dans toutes les expériences réalisées.

3.2. Activation de PLA2c

L'activation de la PLA2c sur la sérine 505 était plus faible dans les leucémies FLA2 que les leucémies FLB1 (Figure 1). Pour la relier avec la différence d'activation de p38MAPK, son inhibition par le SB203580 a été vérifiée par western blot en quantifiant l'activation (sur Thr^{334}) de la MAPKAPK2, une cible de p38MAPK (Figure 1). Pour les deux souris ayant reçu du SB203580 et comparativement au DMSO, il a été obtenu une inactivation de p38MAPK. Concomitamment, il a été observé une inactivation de la PLA2c (Ser^{505}) sur chacune des deux souris traitées par SB203580 (Figure 1). L'activation de p38MAPK étant plus élevée dans les leucémies FLB1 que FLA2 (Trost et al., 2012), ces éléments suggèrent que l'axe GPX3/ROS/p38MAPK contrôle l'activation de PLA2c.

3.3. Analyse de la composition en acides gras des leucémies FLA2 et FLB1

La PLA2c est capable de libérer l'acide arachidonique (AA), un élément clé de l'activation des la NADPH oxydases. L'analyse du contenu en acides gras des leucémies FLA2 et FLB1 a objectivé un contenu assez homogène pour la majorité des AG. Les AG 18:0, 12:2 n-6, 20:4 n-6, 18:1 n-9, 16:0 et 22:6 n-3 étaient les AG majoritairement contenus dans les deux leucémies, représentant à eux seuls près de 70% des AG totaux mesurés (Figure 2). L'acide arachidonique (20 : 4 n-6) était l'un des AG les plus présents dans les leucémies FLA2 et FLB1 où il représentait respectivement 11,8 % (+/- 1,5) et 16,4 % (+/- 0,76) des AG totaux. En analysant les variations des pourcentages des lipides totaux dans les leucémies FLA2 et FLB1, seuls deux AG étaient systématiquement différents (l'acide linoléique 18:2n-6 et l'AA), la différence la plus importante étant pour l'AA (+39,0 +/-4,6% dans les leucémies FLB1), la variation de l'acide linoléique, un AG intervenant dans la fabrication des membranes cellulaires, n'étant que de +17,8 +/- 2,1 %). Au total, ces éléments sont en faveur d'une moindre production d'AA dans les cellules souches leucémiques (FLA2).

3.4. Colocalisation des sous-unités

Les premières expériences de microscopie confocale sont en faveur d'une expression de NOX2 homogène à la surface des leucémies FLA2 et FLB1. Concernant la sous-unité régulatrice $p67^{phox}$, il y aurait une localisation préférentielle dans le cytoplasme des leucémies FLA2 et à la membrane plasmique des leucémies FLB1 (Figure 3).

L'analyse de la colocalisation en trois dimensions de NOX2 et de la sous-unité $p67^{phox}$ suggèrerait une colocalisation de ces deux protéines à la membrane dans la leucémie FLB1 comparée à la leucémie FLA2 (Figure 3).

Les leucémies FLB1 traitées au SB203580 auraient elles aussi une plus faible colocalisation (données non présentées). Des expériences supplémentaires devront confirmer ces tendances.

3.5. Production de ROS des leucémies FLA2 et FLB1

L'analyse fluorimétrique a montré que la production de ROS était plus élevée dans les moelles leucémiques que dans les moelles normales (Figure 4).

Dans les moelles leucémiques, la production de ROS indépendante des oxydases était identique (production en présence de DPI). De plus, le maximum d'activité oxydase obtenu après activation par le PMA n'était pas différent dans les leucémies FLA2 et FLB1 (Figure 4). Il est intéressant de noter que dans les leucémies FLA2 (CSL), l'activation des oxydases était de 43,6 +/- 6,0 % alors qu'elle était de 67,4+/- 7,7 % dans les leucémies FLB1 (Figure 5). Cette différence d'activation n'était pas associée dans nos conditions expérimentales (air ambiant, 37°C) à une différence mesurable de production de ROS. Ceci ne peut pas être expliqué par une expression plus importante des composants du complexe Nox2, la quantification des ARNm des sous-unités du complexe ne révélant aucune différence majeure (Figure 6).

4. Discussion, perspectives

Cette étude avait pour objectif de comparer l'activité NADPH oxydase des leucoblastes et des CSL à l'aide du modèle des leucémies primaires murines induites FLA2 et FLB1 possédant respectivement une forte fréquence en CSL (70 %) et une faible fréquence en CSL (inférieure à 1 %). La comparaison de ces leucémies a déjà permis de mettre en évidence l'influence d'une surexpression de *GPX3* dans les CSL, concomitante d'une plus faible activation de p38MAPK favorable à leur auto-renouvellement (Herault et al., 2012; Trost et al., 2012). Mettant en évidence une stratégie antioxydante des CSL. C'est dans ce contexte, que la comparaison de l'activité NADPH oxydase entre les deux leucémies a pris corps. En effet, l'homéostasie cellulaire des ROS repose sur l'équilibre entre leur production et leur élimination. Il était donc intéressant de considérer aussi le versant production de ROS dont les oxydases sont des contributeurs importants. De plus, la différence d'activation de p38MAPK

dans ces deux leucémies a suggéré un intérêt potentiel des oxydases par plusieurs aspects : i- une cible de p38MAPK est la PLA2c dont l'activité (libération d'AA) influence l'activation des oxydases ; ii- p38MAPK intervient dans la phosphorylation des sous-unités régulatrice de l'oxydase phagocytaire.

Lors de cette étude, nous avons mis en évidence l'existence d'une plus grande phosphorylation de la PLA2c sur sérine 505 dans la leucémie FLB1 comparativement à la leucémie FLA2. L'inhibition de p38MAPK par le SB203580 dans la leucémie FLB1, a suggéré que la différence d'activation de p38MAPK dans les deux leucémies pourrait être à l'origine de cette différence de phosphorylation de PLA2c. De plus, l'étude de la composition en acides gras des deux leucémies a révélé une plus grande proportion d'AA dans la leucémie FLB1 que dans la leucémie FLA2 (CSL). Il est intéressant de noter que la composition en acides gras des deux leucémies ne semble différer que pour deux de leurs acides gras majoritaires avec la plus grande différence pour l'acide arachidonique.

Ces résultats sont en faveur d'un contexte cellulaire moins favorable à l'activation des oxydases dans la leucémie FLA2 que dans la leucémie FLB1. Les premières études de colocalisation de de la sous-unité catalytique NOX2 et de la sous-unité cytosolique régulatrice $p67^{phox}$ (méthode souvent utilisée pour révéler l'établissement des complexes oxydases) suggèrent une plus grande colocalisation dans la leucémie FLB1, compatible avec une plus grande activation des oxydases de cette leucémie.

Au niveau fonctionnel, l'étude de la production de ROS des deux leucémies en fonctions de modulateurs pharmacologiques des oxydases a mis en évidence une production de ROS des cellules leucémiques supérieure à celle de la moelle normale. Ces expériences ont montré pour les deux leucémies qu'elles présentaient une activité oxydase constitutive. Leur production totale de ROS a semblé être homogène. Cependant nous avons observé une plus forte activation des oxydases dans la leucémie FLB1 qui ne peut être expliquée par une différence d'expression (ARN) des sous-unités de l'oxydase phagocytaire.

Les résultats actuels de cette étude suggèrent donc une activation plus faible des oxydases dans les CSL comparativement aux leucoblastes. Cette étude devra être consolidée. L'analyse de l'expression protéique des composants de l'oxydase phagocytaire sera un point important qui permettra de plus de rechercher s'il existe des différences au niveau des phosphorylations nécessaires à l'activation des sous-unités cytosoliques régulatrices de

l’oxydase.L’analyse de la production de ROS après inhibition de p38MAPK sera déterminante, ainsi que l’impact de l’inhibition de la NADPH oxydases (sh $p22^{phox}$) sur la fréquence en CSL dans la leucémie FLB1. Enfin ces résultats suggèrent qu’il sera intéressant d’étudier le statut métabolique de ces leucémies. En effet des données récentes suggèrent qu’à l’inverse des CSH, les CSL utilisent un métabolisme basé sur la phosphorylation oxydative potentiellement générateur de ROS (Lagadinou et al., 2013). Cette observation pourrait permettre de compléter et de comprendre pourquoi dans nos conditions expérimentales (pO_2 ambiante) nous n’observons pas de différences de production totale de ROS malgré la différence d’activation des oxydases. Ces résultats renforcent l’influence des enzymes antioxydantes dans le déterminisme du faible niveau de ROS des CSL, et en particulier GPx3 décrit dans ce même modèle (Herault et al., 2012).

5. Figures

Figure 1. Différence d'activation de PLA2c (Ser505)

A. L'analyse de la phosphorylation activatrice (Ser505) de PLA2c en western blot a révélé un plus fort niveau dans la leucémie FLB1 comparé à la leucémie FLA2. B. L'utilisation d'un inhibiteur de p38MAPK, dont l'effet in vivo sur les leucémies FLB1 a été vérifié par la diminution de la phosphorylation d'une cible de p38MAPK, la MAPKAPK2 (Thr334) a permis de mettre en évidence l'activation de PLA2c par p38MAPK dans ces leucémies.

Figure 2. Analyse de la composition en acides gras des leucémies FLA2 et FLB1.

L'analyse de la composition en acides gras des leucémies par chromatographie en phase gazeuse a mis en évidence que l'acide arachidonique est l'un des acides gras majoritaire des deux leucémies. L'analyse de 3 leucémies FLA2 a toujours présenté une proportion inférieure d'acide arachidonique comparativement aux 3 leucémies FLB1 analysées. L'acide arachidonique est l'acide gras présentant la plus grande variation entre les deux leucémies.

Figure 3. Différence de colocalisation de NOX2 et $p67^{phox}$ dans les leucémies FLA2 et FLB1.

Le marquage de NOX2 (vert) montre une fluorescence et une répartition homogène entre les leucémies FLA2 et FLB1. Le marquage de $p67^{phox}$ (rouge) présente des résultats différents: dans la leucémie FLA2 la fluorescence semble répartie uniformement dans le cytosol tandis que les contours cellulaires semblent plus marqués dans la leucémie FLB1. La colocalisation en 3 dimensions (jaune) des sous-unités NOX2 et $p67^{phox}$ semble plus forte dans la leucémies FLB1 que dans la leucémie FLA2 Figure 3. Différence de colocalisation de NOX2 et les p67phox dans les leucémies FLA2 et FLB1.

Figure 4. Analyse de la production de ROS des moelles de souris FLA2 et FLB1.

L'analyse de la production de ROS de moelle de souris normale (n=1), ou ayant developpé les leucémies FLA2 (n=13) et FLB1 (n=7), est présenté en bleu. L'effet du PMA (vert) et du DPI (rouge) suggèrent une activité constitutive (DPI) des oxydases dans ces leucémies. Cette activité n'est pas maximale puisqu'elle peut être augmentée (PMA).

Figure 5. Etat d'activation des oxydases dans les leucémies FLA2 et FLB1.

La mesure des ROS en présence de DPI correspond à la production non liée à la NADPH oxydase. Elle correspond au seuil minimal d'activation des oxydases (0%), tandis que la mesure de la production de ROS en présence de PMA correspond au maximum d'activabilité (100%). Les leucémies FLA2 (n=13) auraient une plus faible activité NADPH oxydase que les leucémies FLB1 (n=7).

Figure 6. Expression des sous-unités du complexe oxydase phagocytaire.

L'analyse d'expression (ARN) des sous-unités du complexe de l'oxydase phagocytaire n'a pas mis en évidence de différences.

Figure 1

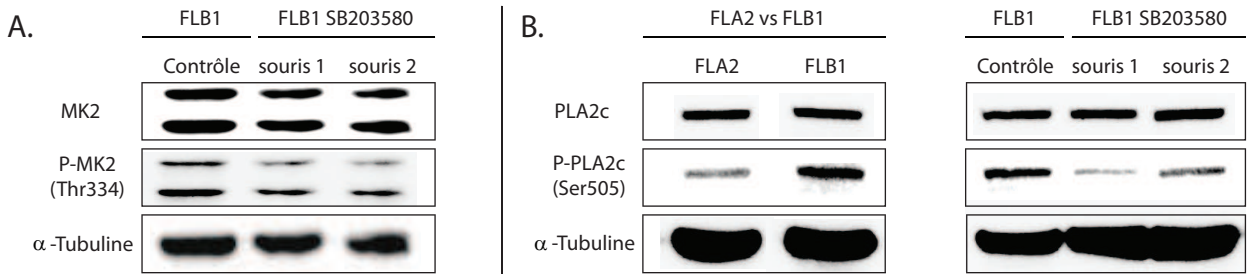
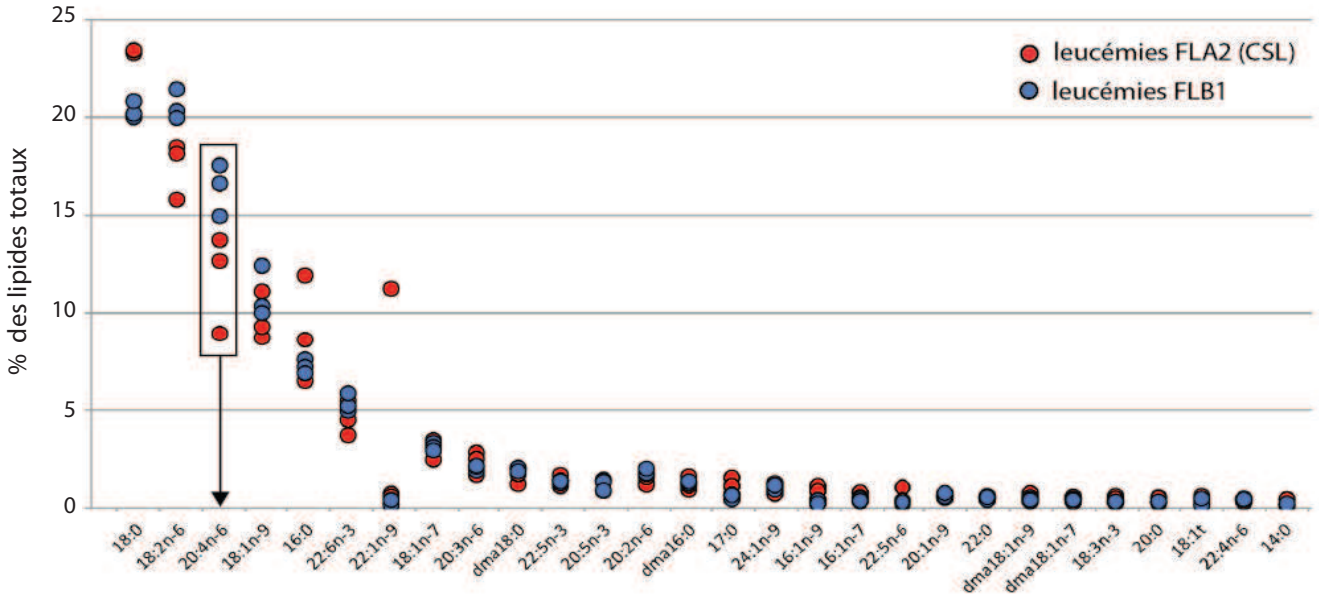

A.
FLB1
FLB1 SB203580
Contrôle
souris 1
souris 2
MK2
P-MK2
(Thr334)
α -Tubuline
B.
FLA2 vs FLB1
FLA2
FLB1
PLA2c
P-PLA2c
(Ser505)
α -Tubuline
FLB1
FLB1 SB203580
Contrôle
souris 1
souris 2

Figure 2



saturés

14: 0 Acide myristique
16: 0 Acide palmitique
17:0 Acide marganique
18: 0 Acide stéarique
20: 0 Acide arachidique
22: 0 Acide behenique

dma: forme diméthyle acétale

insaturés

16: 1n-7 Acide palmitoléique
18: 1n-7 Acide vaccenique
18: 1n-9 Acide oléique
18: 2n-6 Acide linoléique
18: 3n-3 Acide rumelenique
20: 1n-9 Acide eicosenoïque
20: 2n-6 Acide eicosadiénoïque
20: 3n-6 Acide di-homo-gamma linolénique
20: 4n-6 Acide arachidonique
20: 5n-3 Acide eicosa-penta-enoïque
22: 1n-9 Acide erucique
22: 4n-6 Acide adrenique
22: 5n-3 Acide docosa-penta-enoïque
24: 1n-9 Acide neuronique

Figure 3

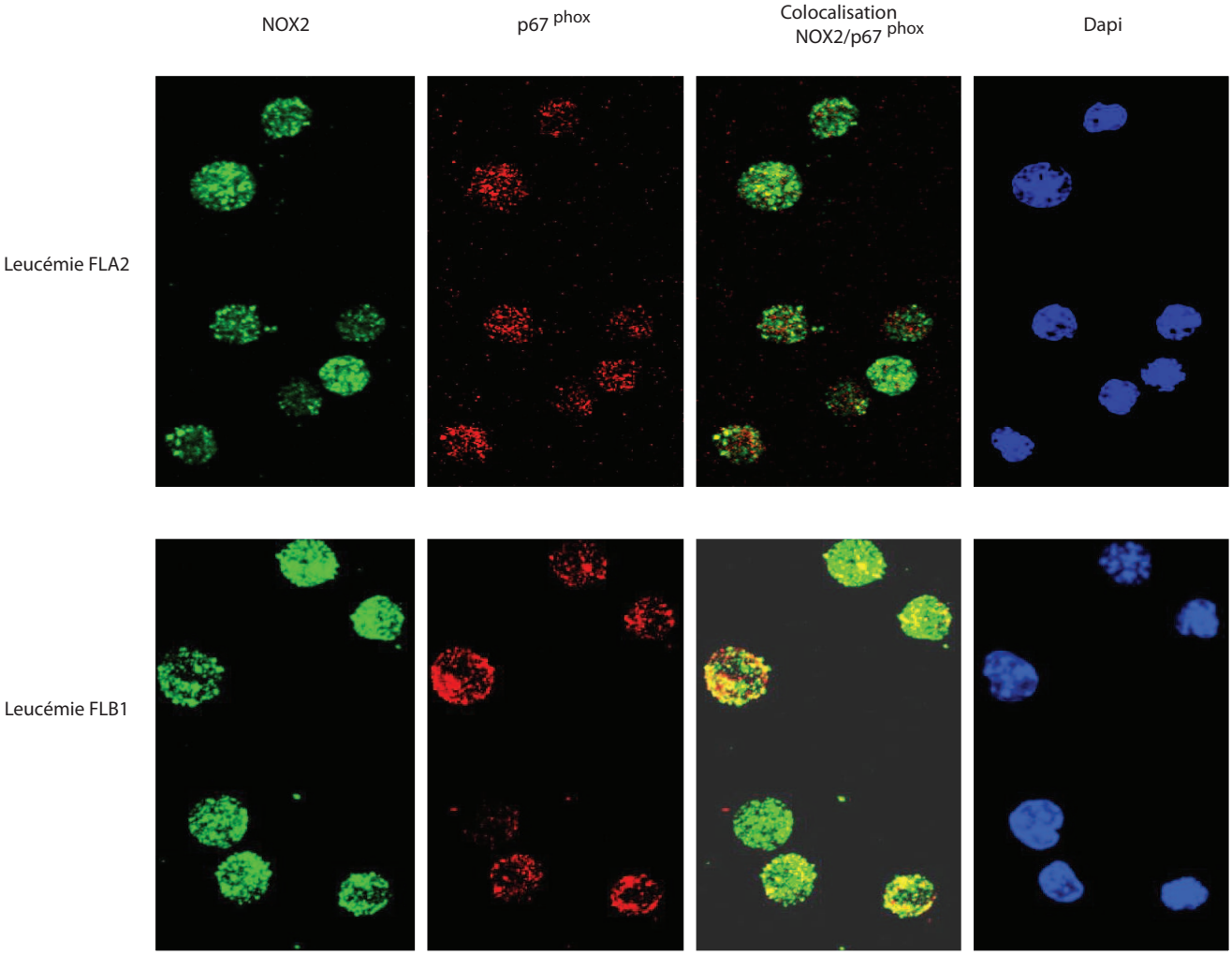

NOX2
p67 phox
Colocalisation NOX2/p67 phox
Dapi
Leucémie FLA2
Leucémie FLB1

Figure 4

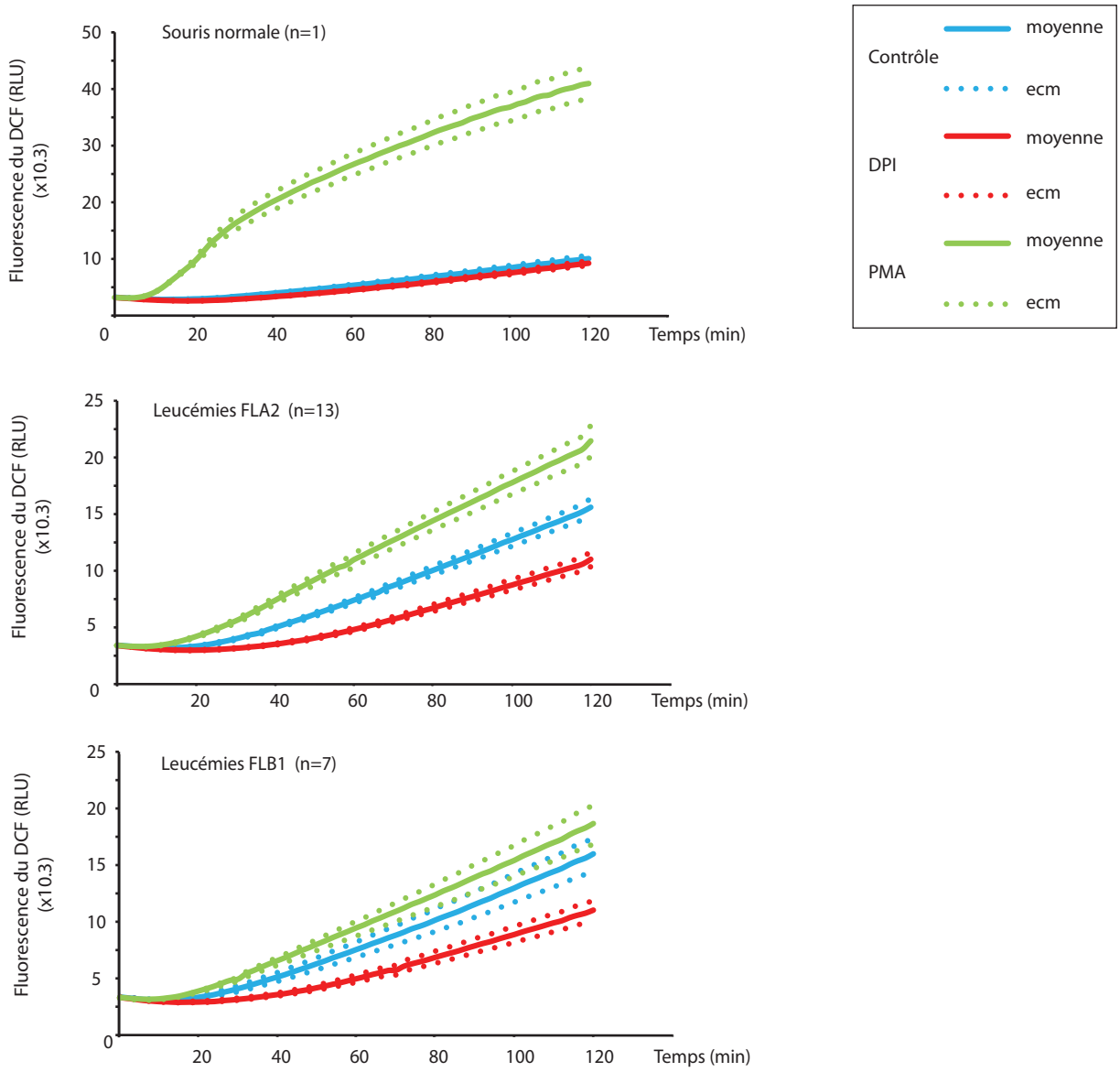

Souris normale (n=1)
Fluorescence du DCF (RLU) (x10.3)
50
40
30
20
10
0
20
40
60
80
100
120
Temps (min)
Leucémies FLA2 (n=13)
Fluorescence du DCF (RLU) (x10.3)
25
20
15
10
5
0
20
40
60
80
100
120
Temps (min)
Leucémies FLB1 (n=7)
Fluorescence du DCF (RLU) (x10.3)
25
20
15
10
5
0
20
40
60
80
100
120
Temps (min)
Contrôle
moyenne
ecm
DPI
moyenne
ecm
PMA
moyenne
ecm

Figure 5

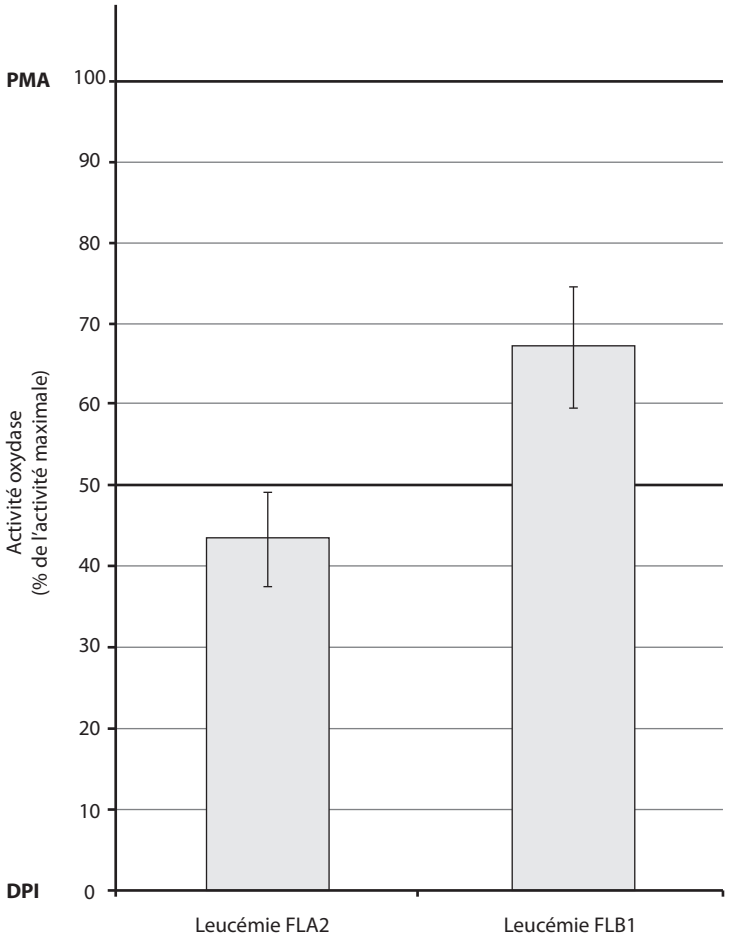
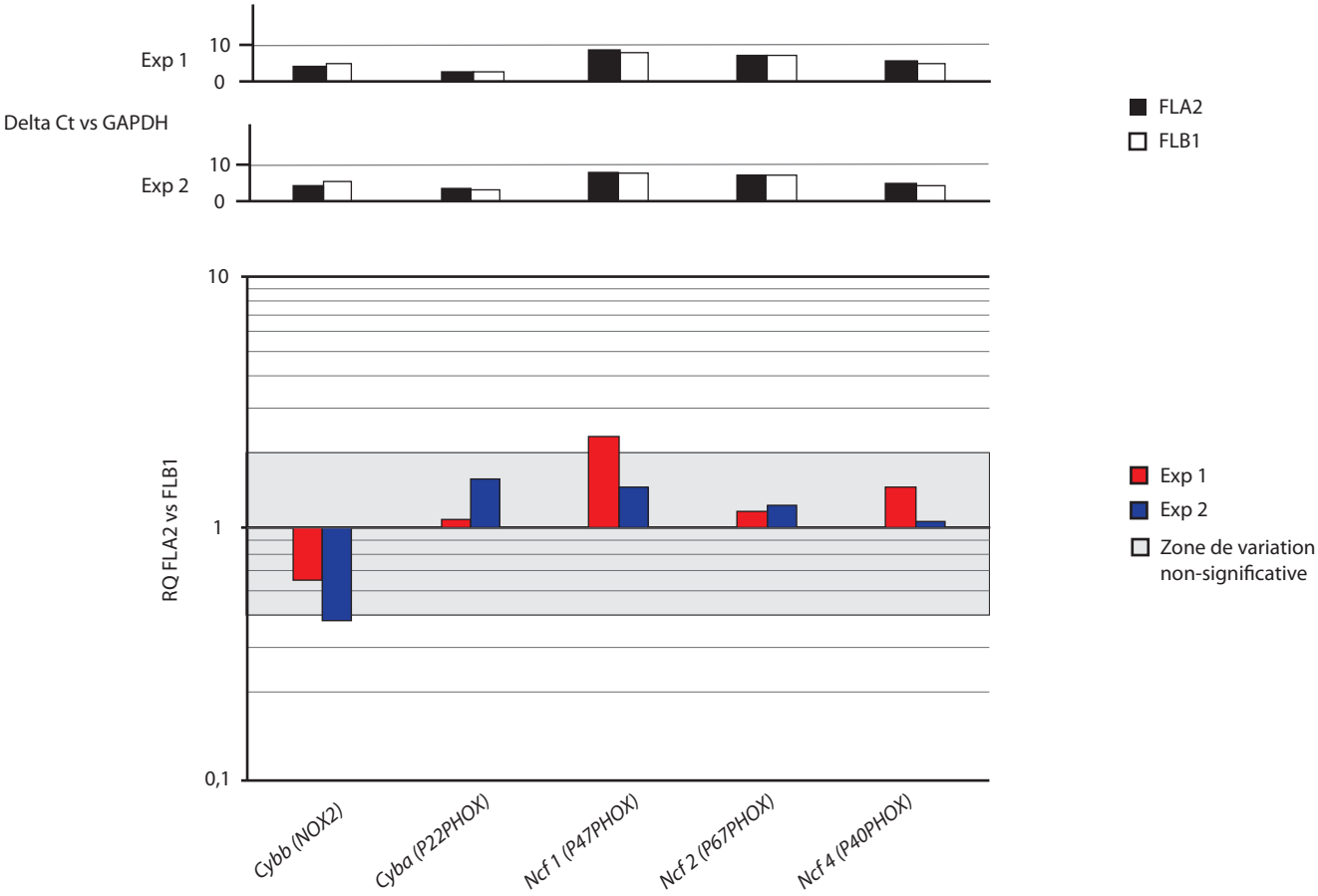

PMA
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
DPI
0
Activité oxydase
(% de l'activité maximale)
Leucémie FLA2
Leucémie FLB1

Figure 6

A.

Gène	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde UPL
Cybb	tgccaacttcctcagctaca	gtgcacagcaaagtgattgg	ctggctgg
Cyba	gccattgccagtgtgatcta	taggctcaatgggagtccac	gcagccat
Ncf 1	gacaccttcattcgccatatc	cctgccacttaaccaggaac	ctgctggg
Ncf 2	cttcggattcaccctcagtc	ggtggtggaatatcggattct	agccccag
Ncf 4	tcttccttctcagtaagatcaacaaa	cctgggaagatgcctgtg	ctggctgg

B.



Conclusion générale

Les LAM sont des affections graves au cours desquelles la mise en place d'une hématopoïèse leucémique mimant l'hématopoïèse normale aboutit à un envahissement blastique médullaire. Les LAM constituent ainsi une population hétérogène constituée de CSL (Dick, 1996b; Lapidot et al., 1994), de progéniteurs, de précurseurs et de leucoblastes bloqués dans leur différenciation. Les CSL sont responsables du taux de rechute élevé observé dans près de 50% des LAM. En effet, les CSL, quiescentes et douées d'auto-renouvellement sont peu sensibles aux thérapeutiques conventionnelles.

Les CSL ont été identifiées en utilisant de modèles murins NOD/SCID (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994), comme une population minoritaire capable de reconstituer la leucémie lors de greffes successives et présentant un phénotype : $CD34^+$ $CD38^-$ $CD71^-$ $CD90^-$ HLA-DR^- $CD117^-$ $CD123^+$ (Bonnet and Dick, 1997; Jordan et al., 2006), des caractéristiques phénotypiques proches des CSH normales. Cependant, l'utilisation de souris à système immunitaire plus affaibli (souris NSG) a permis de mettre récemment en évidence que les populations $CD38^+$, $CD44^+$ et $CD47^+$ peuvent contenir des CSL de même que la fraction $CD34^-$. Cependant il existe des variations LAM-dépendantes et la même étude a montré que les populations positives pour le marqueur de lignage (Lin^+), sont capables de reconstituer intégralement la leucémie dans toute son hétérogénéité. Cela suppose l'existence de CSL de phénotype plus mature capables de se dédifférencier pour redevenir Lin^- (Sarry et al., 2011).

L'hématopoïèse leucémique se déroule dans la moelle osseuse. Des calculs prédictifs modélisent une très faible pression partielle en oxygène au sein de ces niches (Chow et al., 2001) avec une concentration en oxygène de l'ordre de 5 à 0,5%. En accord avec ces données calculées, une concentration en O_2 de l'ordre de 5% est rapportée dans la moelle osseuse (Harrison et al., 2002). Ces données corroborent les observations préalables qui avaient montré que *in vitro* une faible pression partielle en oxygène était nécessaire pour le maintien des CSH (Koller et al., 1992) et même qu'une concentration en O_2 de 0,1% est responsable d'un retour en G0 chez des cellules $CD34^+$ en cycle (Hermitte et al., 2006). L'hypoxie favoriserait un faible niveau de ROS dans les CSH (Fan et al., 2008; Skinner et al., 2008), et les CSH sont ROS^{low}, à l'inverse des cellules différenciées (ROS^{high}) (Ito et al., 2004; Jang and Sharkis, 2007; Vignon et al., 2012) des CSH. Ces données sont bien documentées et mettent en jeu des mécanismes antioxydants : l'axe ROS/p38MAPK (Herault et al., 2012; Ito et al., 2006; Jang and Sharkis, 2007; Trost et al., 2012), Gpx3 (Herault et al., 2012; Vignon et

al., 2012) et les facteurs de transcription FoxO (Kornblau et al., 2010; Macleod, 2008; Miyamoto et al., 2007; Tothova et al., 2007).

Concernant la production de ROS, les 2 principales sources sont la chaîne respiratoire mitochondriale et les oxydases. Il a été montré au niveau métabolique que la production d'énergie par les CSH est supportée par la glycolyse (Simsek et al., 2010; Takubo et al., 2013) nécessaire au maintien de la quiescence. Lors de l'engagement en différenciation, la glycolyse serait suppléée puis remplacée par la phosphorylation oxydative mitochondriale pour approvisionner les cellules efficacement en énergie (Eliasson and Jönsson, 2010). En lien avec une modulation du nombre de mitochondries et du contenu mitochondrial (Kim et al., 1998; McKenzie et al., 2007). Il a ainsi été démontré que dans la fraction $CD34^+$ issue de sang de cordon, la sous-population $mitochondrie^{low}$ est enrichie en cellules capables de restaurer l'hématopoïèse (Romero-Moya et al., 2013). Ces observations sont à l'origine d'une hypothèse de ségrégation différentielle du contenu mitochondrial de la CSH lors de la division asymétrique qui déterminerait le devenir des cellules filles : CSH pour la cellule obtenant un faible nombre de mitochondries peu fonctionnelles et engagement en différenciation pour la cellule recevant un grand nombre de mitochondries pleinement fonctionnelles (Mantel and Broxmeyer, 2008). La mitochondrie est l'un des principaux fournisseurs de ROS cellulaires lors de la phosphorylation oxydative. En cumulant les données oxydatives et métaboliques, il existe une opposition entre CSH et cellules engagées en différenciation qui peut être résumé ainsi : les CSH sont ROS^{low} $mitochondrie^{low}$ à l'inverse des cellules engagées qui sont ROS^{high} $mitochondrie^{high}$. L'influence des NADPH oxydases, l'autre source de ROS, a été évalué sur la physiologie des CSH. Il a été mis en évidence qu'une activité oxydase constitutive est responsable d'une production de ROS dans les celules $CD34^+$ humaines (Frassanito et al., 2008; Piccoli et al., 2007b; Piccoli et al., 2005). Ces études ont proposé un mécanisme au cours duquel la CSH posséderait une faible activité oxydase au sein de la niche hématopoïétique à faible concentration en O_2. Cette activité serait liée à l'activité constitutive (ne nécessitant aucune régulation) de NOX4. NOX4 serait ainsi un senseur du niveau d'O_2 qui lors de l'engagement en différenciation d'une cellule fille issue de la différenciation asymétrique d'une CSH, verrait son activité de production de ROS mécaniquement augmenter en présence d'une augmentation de la concentration en oxygène. Ces ROS issus de NOX4 seraient alors les seconds messagers responsables de l'activation des autres isoformes des oxydases présentes dans les CSH et contribueraient à l'augmentation globale du niveau de ROS des cellules en différenciation. Ce système reposant sur un senseur

d'oxygène (NOX4) déclenchant l'activation de la production de ROS serait de plus un système qui s'auto-entretient et s'auto-amplifie, en faveur de l'augmentation du niveau de ROS de la CSH à la cellule mature (Piccoli et al., 2005). De façon très intéressante, il est proposé que les aspects mitochondriaux et oxydatifs *via* les oxydases puissent se croiser. En effet, l'hypothèse d'un cross-talk entre les ROS issus des mitochondries et des oxydases est évoquée (Daiber, 2010; Dikalov, 2011). Les ROS issus des mitochondries pourraient contribuer à la régulation des oxydases et inversement. Ce croisement aboutirait donc à une augmentation de la production de ROS dans les cellules engagées en différenciation qui impliquerait : la mise en place de la phosphorylation oxydative, la boucle d'activation des oxydases, et les effets d'activation croisés de ces deux voies l'une sur l'autre.

Dans le contexte des LAM, des études similaires ont été réalisées. L'étude de la population hétérogène leucémique, en majorité leucoblastique a mis en évidence une production excessive de ROS (Dolado et al., 2007; Pelicano et al., 2004). Cette production excessive a été reliée à l'activation d'oncogènes : Ras (Dolado et al., 2007), Flt3 (Sallmyr et al., 2008), BCR-ABL (Kim et al., 2005). De plus il a été mis en évidence de façon intéressante que les leucocytes de patients atteints de LAM, stimulés par des activateurs des oxydases (PMA, fMLP) augmentent leur production de ROS comparativement aux leucocytes de sujets témoins (Er et al., 2007; Kato et al., 2003). En complément une autre étude a démontré que dans les progéniteurs $CD34^+$ humains, l'expression induite de Ras est responsable d'une augmentation de production des ROS *via* les oxydases. Cette augmentation des ROS, indépendante des facteurs de croissance contribue à une augmentation de prolifération des $CD34^+$ (Hole et al., 2010). Une dernière étude a mis en évidence que l'activation de la production de ROS par les oxydases dans les cellules leucémiques à différenciation monocytaire est responsable d'une inactivation des lymphocytes NK et favorise ainsi le développement de ces leucémies par évitement de la réponse immunitaire (Aurelius et al., 2012).

Les études s'attachant à décrire spécifiquement la sous-population des CSL ont mis en évidence une différence de niveau de ROS entre CSL, ROS^{low} et leucoblastes, ROS^{high}. Lors de la comparaison de leucémies murines primaires induites par les oncogènes *Hoxa9* et *Meis1* ne différant que par leur fréquence en CSL (FLA2>70 % et FLB1 <1 %), il a été mis en évidence que l'expression de *Gpx3* est augmenté dans les CSL associé a une inactivation de p38MAPK et contribue à leur auto-renouvellement (Herault et al., 2012). De plus une

expression élevée de GPX3 a été corrélée a un mauvais pronostic des LAM chez les patients (Herault et al., 2012). Très récemment une étude sur des LAM humaines a rapporté un faible niveau de ROS dans les CSL et un niveau élevé dans les CSL (Lagadinou et al., 2013). En outre, la niche pourrait participer à ce faible niveau de ROS dans les CSL puisqu'il a été rapporté que le contact *in vitro* entre CSM et cellules leucémiques est responsable d'une surexpression de GPX3, d'une inactivation de p38MAPK et d'une baisse du niveau intracellulaire de (Vignon et al., 2010).

Dans cette thèse, nous nous sommes attachés à décrire l'activité oxydase des LAM humaines en temps que contributeur potentiel à la production de ROS. Pour discriminer cet aspect en tenant compte des leucoblastes et des CSL nous avons adapté notre stratégie : i-des lignées continues de LAM humaines ont été utilisées pour modéliser la population blastique ; ii- l'utilisation des leucémies murines FLA2 (CSL) et FLB1 *in vivo* a permis d'appréhender les oxydases des CSL.

Dans la première partie de ce travail (Article 1) nous avons étudié l'activité NADPH oxydase des principales lignées de LAM humaines couvrant les classes FAB M0/M1 (indifférenciées, lignées KG1a et KG1), M2 (myéloblastiques, lignée HL60), M3 (promyélocytaire, lignée NB4), M4 (myélomonocytaire, lignée ML2) et M5 (monocytaires, lignées THP1, U937 et MV4-11). Lors de cette étude nous avons rapporté que les cellules leucémiques expriment (ARN) différentes isoformes catalytiques de la famille des oxydases, ainsi que la totalité des sous-unités cytosoliques régulatrices. Nous avons relevé que certaines sous-unité catalytiques ont semblé avoir une expression dépendante du stade de différenciation des leucémies, comme *NOX1* observé seulement dans les lignées monocytaires (THP1 et U937) et *NOX3* surtout exprimé dans les lignées les moins différenciées (KG1a et KG1). Au contraire, l'expression de certaines sous-unités catalytiques a été relevée dans toutes les lignées sans lien avec leur stade de différenciation, comme *NOX2* et *DUOX2*. Les ARN de l'ensemble des sous-unités régulatrices des oxydases ont été observés dans toutes les lignées étudiées de façon assez homogène. Seule la lignée KG1a exprimait très peu l'ARN de la sous-unité $p40^{phox}$. Nous nous sommes focalisé sur l'expression de la phagocyte oxydase, car nous avons observé que les composants du cytochrome b_{558} (NOX2 et $p22^{phox}$) dans toutes les leucémies. Ces observations ont été confirmées au niveau protéique. L'étude de l'expression des protéines cytosoliques du complexe a mis en évidence une expression des protéines régulatrices $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ et de Rac1 dans toutes les lignées avec une expression

plus marquée dans les lignées à différenciation monocytaire. Seule la sous-unité $p40^{phox}$ non strictement nécessaire n'a pas été détectée dans toutes les lignées : clairement présente dans les lignées les plus différentiées (ML2, THP1, U937, MV4-11), faiblement observée dans les lignées KG1, HL60 et non observée dans les lignées KG1a et NB4.

Nous avons donc étudié s'il existait une activité NADPH oxydase dans ces cellules leucémiques. Pour cela nous avons utilisé les propriétés de production d'anions superoxydes de cette famille d'enzymes. Nous avons vérifié que toutes les lignées leucémiques étudiées exprimaient les superoxydes dismutases (SOD1, SOD2, SOD3). Cela nous a permis de choisir d'étudier l'activité oxydase *via* la production d'H_2O_2 issu de la dismutation des superoxydes produits par les oxydases. L'utilisation d'un inhibiteur (DPI) et d'un activateur (PMA) des oxydases nous a permis d'observer l'impact des oxydases sur la production totale de ROS. Lors de ces expériences nous avons constaté que toutes les lignées leucémiques présentaient une fraction de leur production de ROS sensible au DPI, mettant en lumière une activation constitutive des oxydases. L'utilisation d'un activateur a permis de relever qu'il n'est pas ou très peu possible de suractiver cette part de production des oxydases. Cependant, certaines lignées comme HL60 et à un degré moindre THP1 et NB4 ont présenté une réserve d'activabilité des oxydases qui a permis d'augmenter significativement leur production de ROS. La mise en évidence de cette activité constitutive des oxydases responsable de la formation d'H_2O_2 extracellulaire nous a amené à vérifier si ces ROS issus des oxydases apportent leur contribution au niveau de ROS intracellulaire élevé des leucoblastes. L'utilisation d'une supplémentation en catalase du milieu réactionnel qui dégrade les H_2O_2 extracellulaires nous a permis de prouver qu'ils traversent la membrane plasmique et influencent le niveau intracellulaire de ROS. Ces résultats mimant une inhibition de la production de ROS issus des oxydases ont été confirmés par un effet identique de l'inhibition des oxydases (DPI) induisant une diminution du niveau de ROS intracellulaires. De plus nous avons observé que l'inhibition des oxydases avait un effet sur la localisation cytosolique ou nucléaire du facteur de transcription Nrf2 régissant une partie de la réponse antioxydante lors d'un stress oxydatif par translocation nucléaire et activation de transcription de gènes codant pour des enzymes antioxydantes. Lors de l'inhibition de l'activité constitutive des oxydases des cellules leucémiques, nous avons observé une inhibition de la translocation nucléaire de Nrf2, concomitante de la baisse de niveau de ROS.

Les H_2O_2 produits sont des acteurs majeurs de la signalisation cellulaire (inhibition des phosphatases) participant au contrôle du cycle cellulaire. Nous avons établi que l'inhibition des oxydases par le DPI avait un effet sur la cellularité. Nos tests ont mis en évidence une diminution de prolifération lors de l'inhibition des oxydases n'impliquant pas d'augmentation significative de mortalité ni d'induction d'apoptose. Nous avons observé que le cycle cellulaire à 48h était modifié avec une augmentation de la proportion des cellules en phases S et G2/M en défaveur des phases G0/G1. Ces résultats sont cohérents avec une inhibition de la prolifération liée à un ralentissement général du cycle cellulaire lors de l'inhibition des oxydases.

Les résultats de cette première partie suggèrent qu'une activation constitutive des oxydases dans les cellules leucémiques différenciées contribue à leur niveau de ROS élevé. La fraction de ROS issue de cette activité favoriserait leur prolifération en accélérant leur cycle cellulaire (Figure 36).

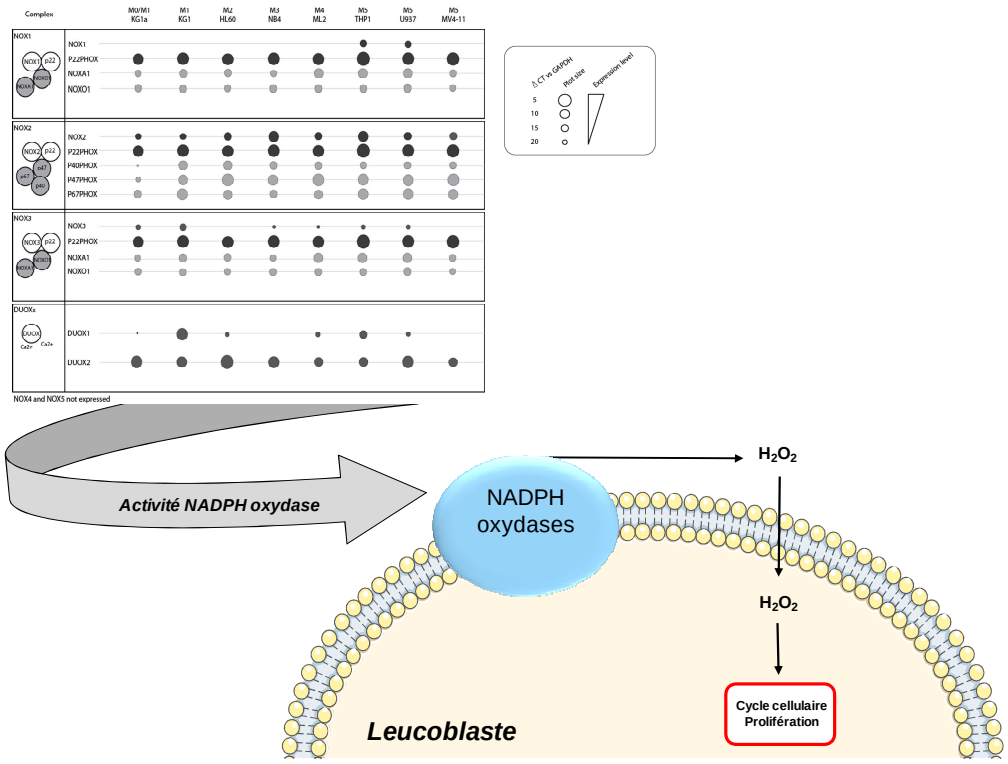


Figure 36: Modélisation de l'activité NADPH oxydase constitutive des cellules leucémiques qui produit des ROS favorisant leur prolifération.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux CSL présentes dans les LAM. Afin d'observer s'il existe une différence d'activation et donc de production de ROS au sein de

cette population caractérisée par son faible niveau de ROS. Pour réaliser cette seconde partie de l'étude nous nous sommes appuyés sur l'utilisation de 2 leucémies murines primaires induites par les oncogènes *Hoxa9* et *Meis1* qui diffèrent par leur fréquence en CSL, par l'expression de Gpx3 et par l'activation de p38MAPK.

Une plus faible activation de p38MAPK dans les CSL (FLA2) avait été mise en évidence précédemment. Des expériences utilisant un inhibiteur de p38MAPK, le SB203580, ont établit que dans les leucémies, p38MAPK active PLA2c (Chakraborti et al., 2012; Menzel et al., 2012), une cible importante pour l'activation des oxydases (Chakraborti et al., 2012; González-Perilli et al., 2013; Hii and Ferrante, 2007; Souabni et al., 2012). La phosphorylation sur Ser^{505} de PLA2c était plus faible dans les CSL (FLA2) que dans les leucoblastes (FLB1). La PLA2c agit sur les oxydases *via* la libération de l'AA favorisant l'assemblage du complexe actif. De façon intéressante, l'analyse du contenu des deux leucémies a révélé que parmi les AG majoritaires, c'est l'AA qui variait le plus entre les deux leucémies : les cellules de la leucémie FLA2 contiennent moins d'AA que les cellules de la leucémie FLB1.

Dans ce contexte, l'observation de la colocalisation des sous-unités membranaires catalytiques (NOX2, $gp91^{phox}$) et cytosolique activatrice ($p67^{phox}$) a été réalisée. Ces résultats ont suggéré une plus grande colocalisation dans la leucémie FLB1 comparativement à la leucémie FLA2 en adéquation avec les taux d'AA mesurés dans les leucémies.

Au niveau fonctionnel, l'étude de la production d'H_2O_2 par les leucémies FLA2 et FLB1 a révélé des différences au niveau de l'activité NADPH oxydase. Nous avons observé que les deux leucémies ont une production spontanée de ROS supérieure à celle de la moelle de souris normales. La quantification de l'état d'activation (pourcentage) des oxydases dans les deux leucémies a montré qu'elles seraient moins activées dans les cellules souches leucémiques (FLA2).

Globalisés, les différences observées en terme de niveau de ROS, d'activation de l'axe p38MAPK/PLA2c, de proportion en AA, de colocalisation des sous-unités oxydases membranaires et cytosolique ainsi que la différence d'état d'activation vont globalement dans le sens d'une moins grande activation des oxydases dans les CSL leucémiques.

Les résultats de cette seconde partie méritent ainsi d'être consolidés et renforcés par des expériences complémentaires. Il sera important de les compléter au niveau fonctionnel par l'étude de l'inhibition de p38MAPK (SB203580) dans la leucémie FLB1 sur la production de ROS des oxydases et le niveau de phosphorylation des sous-unités régulatrices $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$. De plus la comparaison de l'expression protéique des sous-unités de l'oxydase phagocytaire et l'analyse de leurs niveaux de phosphorylation activatrices seront d'intérêt. L'impact de l'activité NADPH oxydase sur la fréquence en CSL devra être caractérisé, notamment en inhibant $p22^{phox}$ dans les leucémies FLB1. Au terme de cette étude il pourrait être proposé un modèle de contrôle des ROS dans les cellules leucémiques associant l'axe GPX3/p38MAPK et la NADPH oxydase, *via* la PLA2c et l'AA (Figure 37).

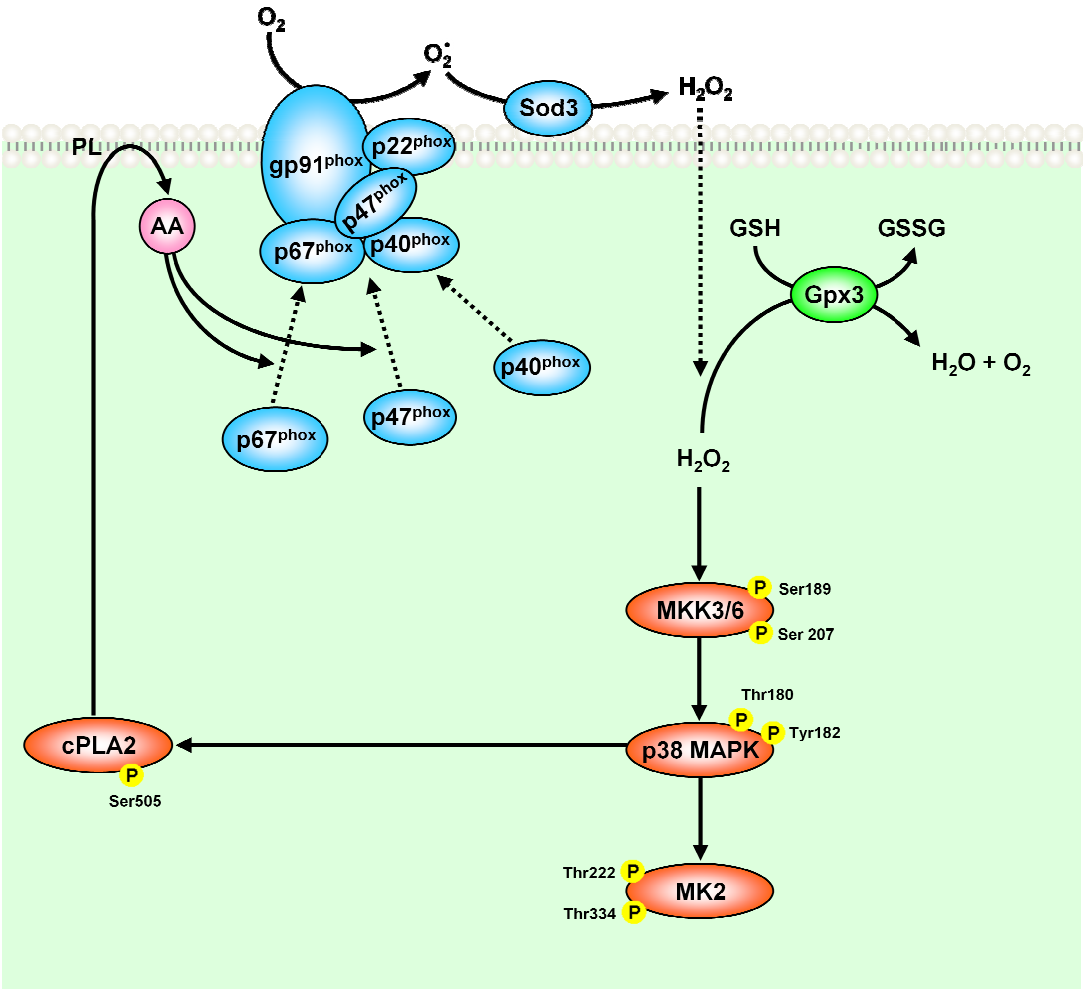


Figure 37 : Modèle de contrôle des ROS dans les cellules leucémiques impliquant l'axe Gpx3/p38MAPK et la NADPH oxydase.

.

Il sera important de vérifier chez les patients présentant une LAM qu'il existe une corrélation dans les cellules leucémiques entre l'expression de Nox2, le niveau de ROS et les marqueurs classiquement associés aux CSL ($CD34^+$, $CD38^-$, $CD123^+$).

Au final, s'il apparait pertinent de chercher pour les LAM des stratégies thérapeutiques pour diminuer l'activité NADPH oxydase à des fins anti-prolifératives, il convient certainement d'être très prudent quant à un rôle potentiellement délétère de ces stratégies qui pourraient favoriser les CSL.

Bibliographie

AAbkowitz, J.L., Robinson, A.E., Kale, S., Long, M.W., and Chen, J. (2003). Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. Blood *102*, 1249-1253.

Ago, T., Kitazono, T., Ooboshi, H., Iyama, T., Han, Y.H., Takada, J., Wakisaka, M., Ibayashi, S., Utsumi, H., and Iida, M. (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. Circulation *109*, 227-233.

Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. J Exp Med *185*, 111-120.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA *100*, 3983-3988.

Allford, S., Grimwade, D., Langabeer, S., Duprez, E., Saurin, A., Chatters, S., Walker, H., Roberts, P., Rogers, J., Bain, B., *et al.* (1999). Identification of the t(15;17) in AML FAB types other than M3: evaluation of the role of molecular screening for the PML/RARalpha rearrangement in newly diagnosed AML. The Medical Research Council (MRC) Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol *105*, 198-207.

Ambasta, R.K., Kumar, P., Griendling, K.K., Schmidt, H.H.H.W., Busse, R., and Brandes, R.P. (2004). Direct Interaction of the Novel Nox Proteins with p22phox Is Required for the Formation of a Functionally Active NADPH Oxidase. J Biol Chem *279*, 45935-45941.

Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J.-L., Frapart, Y.-M., Apostolou, D., Agnandji, D., Gnidehou, S., Ohayon, R., Noël-Hudson, M.-S., Francon, J., *et al.* (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca2+-dependent H2O2-generating activity. J Biol Chem *280*, 30046-30054.

Andrews, R.G., Singer, J.W., and Bernstein, I.D. (1986). Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. Blood *67*, 842-845.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell *118*, 149-161.

Aurelius, J., Thorén, F.B., Akhiani, A.A., Brune, M., Palmqvist, L., Hansson, M., Hellstrand, K., and Martner, A. (2012). Monocytic AML cells inactivate antileukemic lymphocytes: role of NADPH oxidase/gp91(phox) expression and the PARP-1/PAR pathway of apoptosis. Blood *119*, 5832-5837.

Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., *et al.* (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. Nat Med *10*, 64-71.

Bánfi, B., Clark, R.A., Steger, K., and Krause, K.-H. (2003). Two Novel Proteins Activate Superoxide Generation by the NADPH Oxidase NOX1. J Biol Chem *278*, 3510-3513.

Bánfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., and Krause, K.-H. (2004). NOX3, a Superoxide-generating NADPH Oxidase of the Inner Ear. J Biol Chem *279*, 46065-46072.

Bánfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., and Krause, K.-H. (2000a). A Mammalian H+ Channel Generated Through Alternative Splicing of the NADPH Oxidase Homolog NOH-1. Science *287*, 138-142.

Bánfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., and Krause, K.H. (2000b). A mammalian H+ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. Science *287*, 138-142.

Bánfi, B., Molnár, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedûs, B., Demaurex, N., and Krause, K.H. (2001). A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. J Biol Chem *276*, 37594-37601.

Banki, K., Hutter, E., Gonchoroff, N.J., and Perl, A. (1999). Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. J Immunol *162*, 1466-1479.

Barzilai, A., Rotman, G., and Shiloh, Y. (2002). ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. DNA Repair (Amst) *1*, 3-25.

Bayraktutan, U., Blayney, L., and Shah, A.M. (2000). Molecular Characterization and Localization of the NAD(P)H Oxidase Components gp91-phox and p22-phox in Endothelial Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol *20*, 1903-1911.

Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. Physiol Rev *87*, 245-313.

BelAiba, R.S., Djordjevic, T., Petry, A., Diemer, K., Bonello, S., Banfi, B., Hess, J., Pogrebniak, A., Bickel, C., and Görlach, A. (2007). NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. Free Radic Biol Med *42*, 446-459.

Belaid-Choucair, Z., Lepelletier, Y., Poncin, G., Thiry, A., Humblet, C., Maachi, M., Beaulieu, A., Schneider, E., Briquet, A., Mineur, P., *et al.* (2008). Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition. Stem Cells *26*, 1556-1564.

Benna, J.E., Dang, P.M.-C., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J., and Gougerot-Pocidalo, M.-A. (1997). Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p67 phox during Human Neutrophil Activation REGULATION BY PROTEIN KINASE C-DEPENDENT AND INDEPENDENT PATHWAYS. J Biol Chem *272*, 17204-17208.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol *33*, 451-458.

Berendes, H., Bridges, R.A., and Good, R.A. (1957). A fatal granulomatosus of childhood: the clinical study of a new syndrome. Minnesota medicine *40*, 309-312.

Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell *2*, 313-319.

Bierl, C., Voetsch, B., Jin, R.C., Handy, D.E., and Loscalzo, J. (2004). Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. J Biol Chem *279*, 26839-26845.

Bokoch, G.M., and Knaus, U.G. (2003). NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! Trends Biochem Sci *28*, 502-508.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med *3*, 730-737.

Boonstra, J., and Post, J.A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. Gene *337*, 1-13.

Bouin, A.P., Grandvaux, N., Vignais, P.V., and Fuchs, A. (1998). p40(phox) is phosphorylated on threonine 154 and serine 315 during activation of the phagocyte NADPH oxidase. Implication of a protein kinase c-type kinase in the phosphorylation process. J Biol Chem *273*, 30097-30103.

Bowen, D., Wang, L., Frew, M., Kerr, R., and Groves, M. (2003). Antioxidant enzyme expression in myelodysplastic and acute myeloid leukemia bone marrow: further evidence of a pathogenetic role for oxidative stress? Haematologica *88*, 1070-1072.

Bradley, T.R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. The Australian journal of experimental biology and medical science *44*, 287-299.

Brar, S.S., Corbin, Z., Kennedy, T.P., Hemendinger, R., Thornton, L., Bommarius, B., Arnold, R.S., Whorton, A.R., Sturrock, A.B., Hueckstead, T.P., *et al.* (2003). NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. Am J Physiol, Cell Physiol *285*, C353-369.

Brodsky, S.V., Zhang, F., Nasjletti, A., and Goligorsky, M.S. (2004). Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. Am J Physiol Heart Circ Physiol *286*, H1910-1915.

Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Lu, L., Miller, M.E., Langefeld, C.D., and Ralph, P. (1990). Enhanced stimulation of human bone marrow macrophage colony formation in vitro by recombinant human macrophage colony-stimulating factor in agarose medium and at low oxygen tension. Blood *76*, 323-329.

Bryder, D., Rossi, D.J., and Weissman, I.L. (2006). Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. Am J Pathol *169*, 338-346.

Buggisch, M., Ateghang, B., Ruhe, C., Strobel, C., Lange, S., Wartenberg, M., and Sauer, H. (2007). Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. J Cell Sci *120*, 885-894.

Bulavin, D.V., and Fornace, A.J., Jr. (2004). p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. Adv Cancer Res *92*, 95-118.

Burhans, W.C., and Heintz, N.H. (2009). The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. Free Radic Biol Med *47*, 1282-1293.

Burritt, J.B., Foubert, T.R., Baniulis, D., Lord, C.I., Taylor, R.M., Mills, J.S., Baughan, T.D., Roos, D., Parkos, C.A., and Jesaitis, A.J. (2003). Functional Epitope on Human Neutrophil Flavocytochrome b558. J Immunol *170*, 6082-6089.

Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic Biol Med *29*, 222-230.

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature *425*, 841-846.

Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. J Orthop Res *9*, 641-650.

Carmona-Cuenca, I., Herrera, B., Ventura, J.-J., Roncero, C., Fernández, M., and Fabregat, I. (2006). EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. J Cell Physiol *207*, 322-330.

Chabannon, C. (2005). [Happy birthday, CD34!]. Med Sci (Paris) *21*, 503-506.

Chakraborti, S., Roy, S., Mandal, A., Dey, K., Chowdhury, A., Shaikh, S., and Chakraborti, T. (2012). Role of PKCalpha-p(38)MAPK-G(i)alpha axis in NADPH oxidase derived O(2)(.-)-mediated activation of cPLA(2) under U46619 stimulation in pulmonary artery smooth muscle cells. Arch Biochem Biophys *523*, 169-180.

Chamulitrat, W., Stremmel, W., Kawahara, T., Rokutan, K., Fujii, H., Wingler, K., Schmidt, H.H.H.W., and Schmidt, R. (2004). A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. J Invest Dermatol *122*, 1000-1009.

Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K.-L., Liu, Y., and Zheng, P. (2008). TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. J Exp Med *205*, 2397-2408.

Chen, Y., Gill, P.S., and Welch, W.J. (2005). Oxygen availability limits renal NADPH-dependent superoxide production. Am J Physiol Renal Physiol *289*, F749-753.

Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E.G., and Lambeth, J.D. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. Gene *269*, 131-140.

Cheng, G., and Lambeth, J.D. (2005). Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of Nox1 and Nox3. Gene *356*, 118-126.

Chiu, J., and Dawes, I.W. (2012). Redox control of cell proliferation. Trends Cell Biol *22*, 592-601.

Cho, Y.M., Kwon, S., Pak, Y.K., Seol, H.W., Choi, Y.M., Park, D.J., Park, K.S., and Lee, H.K. (2006). Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during

the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun *348*, 1472-1478.

Chow, D.C., Wenning, L.A., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2001). Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. Biophys J *81*, 685-696.

Cifuentes-Pagano, E., Csanyi, G., and Pagano, P.J. (2012). NADPH oxidase inhibitors: a decade of discovery from Nox2ds to HTS. Cell Mol Life Sci *69*, 2315-2325.

Cipolleschi, M.G., Dello Sbarba, P., and Olivotto, M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. Blood *82*, 2031-2037.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res *66*, 9339-9344.

Coffer, P.J., and Burgering, B.M.T. (2007). Stressed marrow: FoxOs stem tumour growth. Nat Cell Biol *9*, 251-253.

Coulombel, L., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (1983). Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. Blood *62*, 291-297.

Cross, A.R., and Segal, A.W. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. Biochim Biophys Acta *1657*, 1-22.

Cucoranu, I., Clempus, R., Dikalova, A., Phelan, P.J., Ariyan, S., Dikalov, S., and Sorescu, D. (2005). NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. Circ Res *97*, 900-907.

Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. Nature *450*, 736-740.

Daiber, A. (2010). Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta *1797*, 897-906.

Danet, G.H., Pan, Y., Luongo, J.L., Bonnet, D.A., and Simon, M.C. (2003). Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. J Clin Invest *112*, 126-135.

Dang, L., Jin, S., and Su, S.M. (2010). IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. Trends Mol Med *16*, 387-397.

Dang, P.M.-C., Morel, F., Gougerot-Pocidalo, M.-A., and El Benna, J. (2003a). Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. Biochemistry *42*, 4520-4526.

Dang, P.M., Elbim, C., Marie, J.C., Chiandotto, M., Gougerot-Pocidalo, M.A., and El-Benna, J. (2006). Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in

ERK1/2 activity. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *20*, 1504-1506.

Dang, P.M., Morel, F., Gougerot-Pocidalo, M.A., and El Benna, J. (2003b). Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. Biochemistry *42*, 4520-4526.

De Deken, X., Wang, D., Many, M.C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E., and Miot, F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. J Biol Chem *275*, 23227-23233.

DeLeo, F.R., Burritt, J.B., Yu, L., Jesaitis, A.J., Dinauer, M.C., and Nauseef, W.M. (2000). Processing and Maturation of Flavocytochromeb 558 Include Incorporation of Heme as a Prerequisite for Heterodimer Assembly. J Biol Chem *275*, 13986-13993.

Delgado, M.B., Clark-Lewis, I., Loetscher, P., Langen, H., Thelen, M., Baggiolini, M., and Wolf, M. (2001). Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. Eur J Immunol *31*, 699-707.

Dewas, C., Dang, P.M., Gougerot-Pocidalo, M.A., and El-Benna, J. (2003). TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J Immunol *171*, 4392-4398.

Dexter, T.M., Allen, T.D., and Lajtha, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. J Cell Physiol *91*, 335-344.

Dick, J.E. (1996a). Human stem cell assays in immune-deficient mice. Curr Opin Hematol *3*, 405-409.

Dick, J.E. (1996b). Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. Semin Immunol *8*, 197-206.

Dikalov, S. (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. Free Radic Biol Med *51*, 1289-1301.

Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2007). p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. Cancer Cell *11*, 191-205.

Donkó, A., Péterfi, Z., Sum, A., Leto, T., and Geiszt, M. (2005). Dual oxidases. Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci *360*, 2301-2308.

Doussière, J., and Vignais, P.V. (1992). Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils. Factors controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell-free system of oxidase activation. Eur J Biochem *208*, 61-71.

Drew, E., Huettner, C.S., Tenen, D.G., and McNagny, K.M. (2005). CD34 expression by mast cells: of mice and men. Blood *106*, 1885-1887.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev *82*, 47-95.

Dröge, W. (2003). Oxidative stress and aging. Adv Exp Med Biol *543*, 191-200.

Dröse, S., and Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. Adv Exp Med Biol *748*, 145-169.

Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noël-Hudson, M.S., Dème, D., and Virion, A. (1999). Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. J Biol Chem *274*, 37265-37269.

Durand, D., Cannella, D., Dubosclard, V., Pebay-Peyroula, E., Vachette, P., and Fieschi, F. (2006). Small-angle X-ray scattering reveals an extended organization for the autoinhibitory resting state of the p47(phox) modular protein. Biochemistry *45*, 7185-7193.

Dusi, S., Della Bianca, V., Grzeskowiak, M., and Rossi, F. (1993). Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and p67phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca(2+)-depleted human neutrophils. Biochem J *290 (Pt 1)*, 173-178.

Dusi, S., Donini, M., and Rossi, F. (1996). Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47phox or p67phox. Biochem J *314 (Pt 2)*, 409-412.

el Benna, J., Faust, L.P., and Babior, B.M. (1994). The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. J Biol Chem *269*, 23431-23436.

El Benna, J., Han, J., Park, J.W., Schmid, E., Ulevitch, R.J., and Babior, B.M. (1996). Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. Arch Biochem Biophys *334*, 395-400.

Eliasson, P., and Jönsson, J.-I. (2010). The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. J Cell Physiol *222*, 17-22.

Ellmark, S.H.M., Dusting, G.J., Fui, M.N.T., Guzzo-Pernell, N., and Drummond, G.R. (2005). The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. Cardiovasc Res *65*, 495-504.

Ellson, C.D., Anderson, K.E., Morgan, G., Chilvers, E.R., Lipp, P., Stephens, L.R., and Hawkins, P.T. (2001). Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes. Curr Biol *11*, 1631-1635.

Er, T.-K., Tsai, S.-M., Wu, S.-H., Chiang, W., Lin, H.-C., Lin, S.-F., Wu, S.-H., Tsai, L.-Y., and Liu, T.-Z. (2007). Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. Clin Biochem *40*, 1015-1019.

Fan, J., Cai, H., Yang, S., Yan, L., and Tan, W. (2008). Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo culture of CD34(+) cells. Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol *151*, 153-158.

Faust, L.R., el Benna, J., Babior, B.M., and Chanock, S.J. (1995). The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. J Clin Invest *96*, 1499-1505.

Ferree, A., and Shirihai, O. (2012). Mitochondrial dynamics: the intersection of form and function. Adv Exp Med Biol *748*, 13-40.

Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. Curr Opin Cell Biol *15*, 247-254.

Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. J Cell Biol *194*, 7-15.

Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem *226*, 497-509.

Folmes, C.D.L., Dzeja, P.P., Nelson, T.J., and Terzic, A. (2012). Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. Cell Stem Cell *11*, 596-606.

Fontayne, A., Dang, P.M., Gougerot-Pocidalo, M.A., and El-Benna, J. (2002). Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. Biochemistry *41*, 7743-7750.

Forbes, L.V., Truong, O., Wientjes, F.B., Moss, S.J., and Segal, A.W. (1999). The major phosphorylation site of the NADPH oxidase component p67phox is Thr233. Biochem J *338 (Pt 1)*, 99-105.

Frassanito, M.C., Piccoli, C., Capozzi, V., Boffoli, D., Tabilio, A., and Capitanio, N. (2008). Topological organization of NADPH-oxidase in haematopoietic stem cell membrane: preliminary study by fluorescence near-field optical microscopy. J Microsc *229*, 517-524.

Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., and Keiliss-Borok, I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation *17*, 331-340.

Friesen, C., Fulda, S., and Debatin, K.M. (1999). Induction of CD95 ligand and apoptosis by doxorubicin is modulated by the redox state in chemosensitive- and drug-resistant tumor cells. Cell Death Differ *6*, 471-480.

Fuchs, A., Bouin, A.P., Rabilloud, T., and Vignais, P.V. (1997). The 40-kDa component of the phagocyte NADPH oxidase (p40phox) is phosphorylated during activation in differentiated HL60 cells. Eur J Biochem *249*, 531-539.

Gabig, T.G., and Babior, B.M. (1979). The O2(-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. J Biol Chem *254*, 9070-9074.

Gartner, S., and Kaplan, H.S. (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci U S A *77*, 4756-4759.

Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P., and Leto, T.L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 8010-8014.

Geiszt, M., and Leto, T.L. (2004). The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. J Biol Chem *279*, 51715-51718.

González-Perilli, L., Álvarez, M.N., Prolo, C., Radi, R., Rubbo, H., and Trostchansky, A. (2013). Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages. Free Radic Biol Med *58*, 126-133.

Gorin, Y., Ricono, J.M., Kim, N.-H., Bhandari, B., Choudhury, G.G., and Abboud, H.E. (2003). Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells. Am J Physiol Renal Physiol *285*, F219-229.

Grandvaux, N., Grizot, S., Vignais, P.V., and Dagher, M.C. (1999). The Ku70 autoantigen interacts with p40phox in B lymphocytes. J Cell Sci *112 (Pt 4)*, 503-513.

Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. Oncogene *24*, 7410-7425.

Grizot, S., Grandvaux, N., Fieschi, F., Fauré, J., Massenet, C., Andrieu, J.P., Fuchs, A., Vignais, P.V., Timmins, P.A., Dagher, M.C., *et al.* (2001). Small angle neutron scattering and gel filtration analyses of neutrophil NADPH oxidase cytosolic factors highlight the role of the C-terminal end of p47phox in the association with p40phox. Biochemistry *40*, 3127-3133.

Groemping, Y., and Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. Biochem J *386*, 401-416.

Guenechea, G., Gan, O.I., Dorrell, C., and Dick, J.E. (2001). Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. Nat Immunol *2*, 75-82.

Gupta, R., Karpatkin, S., and Basch, R.S. (2006). Hematopoiesis and stem cell renewal in long-term bone marrow cultures containing catalase. Blood *107*, 1837-1846.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., *et al.* (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. Nature *468*, 659-663.

Han, C.-H., Freeman, J.L.R., Lee, T., Motalebi, S.A., and Lambeth, J.D. (1998a). Regulation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase IDENTIFICATION OF AN ACTIVATION DOMAIN IN p67 phox. J Biol Chem *273*, 16663-16668.

Han, C.H., Freeman, J.L., Lee, T., Motalebi, S.A., and Lambeth, J.D. (1998b). Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). J Biol Chem *273*, 16663-16668.

Han, C.H., Nisimoto, Y., Lee, S.H., Kim, E.T., and Lambeth, J.D. (2001). Characterization of the flavoprotein domain of gp91phox which has NADPH diaphorase activity. J Biochem *129*, 513-520.

Handgretinger, R., Gordon, P.R., Leimig, T., Chen, X., Buhring, H.-J., Niethammer, D., and Kuci, S. (2003). Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. Ann N Y Acad Sci *996*, 141-151.

Hanna, I.R., Hilenski, L.L., Dikalova, A., Taniyama, Y., Dikalov, S., Lyle, A., Quinn, M.T., Lassègue, B., and Griendling, K.K. (2004). Functional association of nox1 with p22phox in vascular smooth muscle cells. Free Radic Biol Med *37*, 1542-1549.

Hannig, M., Figulla, H.-R., Sauer, H., and Wartenberg, M. (2010). Control of leucocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue. J Cell Mol Med *14*, 303-312.

Harper, A.M., Chaplin, M.F., and Segal, A.W. (1985). Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. Biochem J *227*, 783-788.

Harrison, J.S., Rameshwar, P., Chang, V., and Bandari, P. (2002). Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. Blood *99*.

Helmcke, I., Heumüller, S., Tikkanen, R., Schröder, K., and Brandes, R.P. (2009). Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity. Antioxid Redox Signal *11*, 1279-1287.

Herault, O., Hope, K.J., Deneault, E., Mayotte, N., Chagraoui, J., Wilhelm, B.T., Cellot, S., Sauvageau, M., Andrade-Navarro, M.A., Hébert, J., *et al.* (2012). A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells. J Exp Med *209*, 895-901.

Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Belloc, F., Praloran, V., and Ivanovic, Z. (2006). Very low O2 concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34+ cells. Stem Cells *24*, 65-73.

Herrera, B., Alvarez, A.M., Sánchez, A., Fernández, M., Roncero, C., Benito, M., and Fabregat, I. (2001). Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. FASEB J *15*, 741-751.

Hevehan, D.L., Papoutsakis, E.T., and Miller, W.M. (2000). Physiologically significant effects of pH and oxygen tension on granulopoiesis. Exp Hematol *28*, 267-275.

Heyworth, P.G., Curnutte, J.T., Nauseef, W.M., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Rosen, H., and Clark, R.A. (1991). Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cytochrome b558. J Clin Invest *87*, 352-356.

Hii, C.S., and Ferrante, A. (2007). Regulation of the NADPH oxidase activity and anti-microbial function of neutrophils by arachidonic acid. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) *55*, 99-110.

Hildeman, D.A., Mitchell, T., Teague, T.K., Henson, P., Day, B.J., Kappler, J., and Marrack, P.C. (1999). Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. Immunity *10*, 735-744.

Hilenski, L.L., Clempus, R.E., Quinn, M.T., Lambeth, J.D., and Griendling, K.K. (2004). Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol *24*, 677-683.

Hole, P.S., Pearn, L., Tonks, A.J., James, P.E., Burnett, A.K., Darley, R.L., and Tonks, A. (2010). Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood *115*, 1238-1246.

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A., and International Society for Cellular, T. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy *7*, 393-395.

Hosen, N., Park, C.Y., Tatsumi, N., Oji, Y., Sugiyama, H., Gramatzki, M., Krensky, A.M., and Weissman, I.L. (2007). CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 11008-11013.

Hsu, P.P., and Sabatini, D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell *134*, 703-707.

Iiyama, M., Kakihana, K., Kurosu, T., and Miura, O. (2006). Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. Cell Signal *18*, 174-182.

Imajoh-Ohmi, S., Tokita, K., Ochiai, H., Nakamura, M., and Kanegasaki, S. (1992). Topology of cytochrome b558 in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis. J Biol Chem *267*, 180-184.

Ishikawa, F., Yasukawa, M., Lyons, B., Yoshida, S., Miyamoto, T., Yoshimoto, G., Watanabe, T., Akashi, K., Shultz, L.D., and Harada, M. (2005). Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. Blood *106*, 1565-1573.

Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., *et al.* (2007). Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. Nat Biotechnol *25*, 1315-1321.

Ito, K., Bernardi, R., Morotti, A., Matsuoka, S., Saglio, G., Ikeda, Y., Rosenblatt, J., Avigan, D.E., Teruya-Feldstein, J., and Pandolfi, P.P. (2008). PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. Nature *453*, 1072-1078.

Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.-H., *et al.* (2012). A PML–PPAR-δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. Nat Med *18*, 1350-1358.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., *et al.* (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature *431*, 997-1002.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., *et al.* (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nat Med *12*, 446-451.

Ivanović, Z., Bartolozzi, B., Bernabei, P.A., Cipolleschi, M.G., Rovida, E., Milenković, P., Praloran, V., and Dello Sbarba, P. (2000). Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. Br J Haematol *108*, 424-429.

Ivanovic, Z., Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Dazey, B., Belloc, F., Lacombe, F., Vezon, G., and Praloran, V. (2004). Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O2 concentration (3%). Stem Cells *22*, 716-724.

Jagnandan, D., Church, J.E., Banfi, B., Stuehr, D.J., Marrero, M.B., and Fulton, D.J.R. (2007). Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5. calcium sensitization via phosphorylation. J Biol Chem *282*, 6494-6507.

Jang, Y.-Y., and Sharkis, S.J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood *110*, 3056-3063.

Jay, D.B., Papaharalambus, C.A., Seidel-Rogol, B., Dikalova, A.E., Lassègue, B., and Griendling, K.K. (2008). Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells. Free Radic Biol Med *45*, 329-335.

Jazwiec, B., Solanilla, A., Grosset, C., Mahon, F.X., Dupouy, M., Pigeonnier-Lagarde, V., Belloc, F., Schweitzer, K., Reiffers, J., and Ripoche, J. (1998). Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids. Leukemia *12*, 1210-1220.

Jesaitis, A.J., Buescher, E.S., Harrison, D., Quinn, M.T., Parkos, C.A., Livesey, S., and Linner, J. (1990). Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. J Clin Invest *85*, 821-835.

Jin, H., Sood, R., Xu, J., Zhen, F., English, M.A., Liu, P.P., and Wen, Z. (2009a). Definitive hematopoietic stem/progenitor cells manifest distinct differentiation output in the zebrafish VDA and PBI. Development *136*, 647-654.

Jin, L., Hope, K.J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F., and Dick, J.E. (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. Nat Med *12*, 1167-1174.

Jin, L., Lee, E.M., Ramshaw, H.S., Busfield, S.J., Peoppl, A.G., Wilkinson, L., Guthridge, M.A., Thomas, D., Barry, E.F., Boyd, A., *et al.* (2009b). Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. Cell Stem Cell *5*, 31-42.

Jordan, C.T., Guzman, M.L., and Noble, M. (2006). Cancer stem cells. N Engl J Med *355*, 1253-1261.

Juntilla, M.M., Patil, V.D., Calamito, M., Joshi, R.P., Birnbaum, M.J., and Koretzky, G.A. (2010). AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. Blood *115*, 4030-4038.

Kamiguti, A.S., Serrander, L., Lin, K., Harris, R.J., Cawley, J.C., Allsup, D.J., Slupsky, J.R., Krause, K.-H., and Zuzel, M. (2005). Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia. J Immunol *175*, 8424-8430.

Kanda, Y., Hinata, T., Kang, S.W., and Watanabe, Y. (2011). Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. Life Sci *89*, 250-258.

Kato, M., Minakami, H., Kuroiwa, M., Kobayashi, Y., Oshima, S., Kozawa, K., Morikawa, A., and Kimura, H. (2003). Superoxide radical generation and Mn- and Cu-Zn superoxide dismutases activities in human leukemic cells. Hematol Oncol *21*, 11-16.

Kawahara, T., Kohjima, M., Kuwano, Y., Mino, H., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Tsunawaki, S., Wada, A., Sumimoto, H., and Rokutan, K. (2005a). Helicobacter pylori lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer NOXO1 in guinea pig gastric mucosal cells. Am J Physiol, Cell Physiol *288*, C450-457.

Kawahara, T., Ritsick, D., Cheng, G., and Lambeth, J.D. (2005b). Point Mutations in the Proline-rich Region of p22phox Are Dominant Inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent Reactive Oxygen Generation. J Biol Chem *280*, 31859-31869.

Kharas, M.G., Okabe, R., Ganis, J.J., Gozo, M., Khandan, T., Paktinat, M., Gilliland, D.G., and Gritsman, K. (2010). Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. Blood *115*, 1406-1415.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell *121*, 1109-1121.

Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H., and Fukumoto, M. (2000). NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. Gene *254*, 237-243.

Kim, J.H., Chu, S.C., Gramlich, J.L., Pride, Y.B., Babendreier, E., Chauhan, D., Salgia, R., Podar, K., Griffin, J.D., and Sattler, M. (2005). Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. Blood *105*, 1717-1723.

Kim, M., Cooper, D.D., Hayes, S.F., and Spangrude, G.J. (1998). Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux. Blood *91*, 4106-4117.

Koller, M.R., Bender, J.G., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (1992). Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow. Exp Hematol *20*, 264-270.

Kollet, O., Spiegel, A., Peled, A., Petit, I., Byk, T., Hershkoviz, R., Guetta, E., Barkai, G., Nagler, A., and Lapidot, T. (2001). Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. Blood *97*, 3283-3291.

Kopp, H.-G., Avecilla, S.T., Hooper, A.T., and Rafii, S. (2005). The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. Physiology (Bethesda) *20*, 349-356.

Kops, G.J.P.L., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W.A., Coffer, P.J., Huang, T.-T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.M.T. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature *419*, 316-321.

Kornblau, S.M., Singh, N., Qiu, Y., Chen, W., Zhang, N., and Coombes, K.R. (2010). Highly phosphorylated FOXO3A is an adverse prognostic factor in acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res *16*, 1865-1874.

Krause, K.-H. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. Jpn J Infect Dis *57*, S28-29.

Kubota, Y., Takubo, K., and Suda, T. (2008). Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. Biochem Biophys Res Commun *366*, 335-339.

Kusumoto, K., Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Morita, K., Kishi, K., and Rokutan, K. (2005). Ecabet sodium inhibits Helicobacter pylori lipopolysaccharide-induced activation of NADPH oxidase 1 or apoptosis of guinea pig gastric mucosal cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol *288*, G300-307.

Kwong, C.H., Malech, H.L., Rotrosen, D., and Leto, T.L. (1993). Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins. Biochemistry *32*, 5711-5717.

Lagadinou, E.D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R.M., Neering, S.J., Minhajuddin, M., Ashton, J.M., Pei, S., Grose, V., O'Dwyer, K.M., *et al.* (2013). BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. Cell Stem Cell *12*, 329-341.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature *367*, 645-648.

Lataillade, J.-J., Clay, D., Bourin, P., Hérodin, F., Dupuy, C., Jasmin, C., and Le Bousse-Kerdilès, M.-C. (2002). Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. Blood *99*, 1117-1129.

Latini, A., Scussiato, K., Rosa, R.B., Leipnitz, G., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Dutra-Filho, C.S., and Wajner, M. (2003). Induction of oxidative stress by L-2-hydroxyglutaric acid in rat brain. J Neurosci Res *74*, 103-110.

Laude, K., Cai, H., Fink, B., Hoch, N., Weber, D.S., McCann, L., Kojda, G., Fukai, T., Schmidt, H.H.H.W., Dikalov, S., *et al.* (2005). Hemodynamic and biochemical adaptations to vascular smooth muscle overexpression of p22phox in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol *288*, H7-12.

Lee, N.K., Choi, Y.G., Baik, J.Y., Han, S.Y., Jeong, D.-W., Bae, Y.S., Kim, N., and Lee, S.Y. (2005). A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. Blood *106*, 852-859.

Lerat, H., Lissitzky, J.C., Singer, J.W., Keating, A., Herve, P., and Charbord, P. (1993). Role of stromal cells and macrophages in fibronectin biosynthesis and matrix assembly in human long-term marrow cultures. Blood *82*, 1480-1492.

Leto, T.L., Adams, A.G., and Mendez, I.d. (1994). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. PNAS *91*, 10650-10654.

Lévesque, J.P., Takamatsu, Y., Nilsson, S.K., Haylock, D.N., and Simmons, P.J. (2001). Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. Blood *98*, 1289-1297.

Li, Q., Harraz, M.M., Zhou, W., Zhang, L.N., Ding, W., Zhang, Y., Eggleston, T., Yeaman, C., Banfi, B., and Engelhardt, J.F. (2006). Nox2 and Rac1 regulate H2O2-dependent recruitment of TRAF6 to endosomal interleukin-1 receptor complexes. Mol Cell Biol *26*, 140-154.

Li, Q., Zhang, Y., Marden, J.J., Banfi, B., and Engelhardt, J.F. (2008). Endosomal NADPH oxidase regulates c-Src activation following hypoxia/reoxygenation injury. Biochem J *411*, 531-541.

Li, W.M., Huang, W.Q., Huang, Y.H., Jiang, D.Z., and Wang, Q.R. (2000). Positive and negative hematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells. Cytokine *12*, 1017-1023.

Li, Y., and Trush, M.A. (1998). Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. Biochem Biophys Res Commun *253*, 295-299.

Lonergan, T., Brenner, C., and Bavister, B. (2006). Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence. J Cell Physiol *208*, 149-153.

Long, M.W., Briddell, R., Walter, A.W., Bruno, E., and Hoffman, R. (1992). Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules. J Clin Invest *90*, 251-255.

Lymperi, S., Ersek, A., Ferraro, F., Dazzi, F., and Horwood, N.J. (2011). Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. Blood *117*, 1540-1549.

Macleod, K.F. (2008). The role of the RB tumour suppressor pathway in oxidative stress responses in the haematopoietic system. Nat Rev Cancer *8*, 769-781.

Magli, M.C., Iscove, N.N., and Odartchenko, N. (1982). Transient nature of early haematopoietic spleen colonies. Nature *295*, 527-529.

Mantel, C., and Broxmeyer, H.E. (2008). Sirtuin 1, stem cells, aging, and stem cell aging. Curr Opin Hematol *15*, 326-331.

Maraldi, T., Prata, C., Caliceti, C., Vieceli Dalla Sega, F., Zambonin, L., Fiorentini, D., and Hakim, G. (2010). VEGF-induced ROS generation from NAD(P)H oxidases protects human leukemic cells from apoptosis. Int J Oncol *36*, 1581-1589.

Marcoux, J., Man, P., Castellan, M., Vives, C., Forest, E., and Fieschi, F. (2009). Conformational changes in p47(phox) upon activation highlighted by mass spectrometry coupled to hydrogen/deuterium exchange and limited proteolysis. FEBS Lett *583*, 835-840.

Marinkovic, D., Zhang, X., Yalcin, S., Luciano, J.P., Brugnara, C., Huber, T., and Ghaffari, S. (2007). Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. J Clin Invest *117*, 2133-2144.

Martyn, K.D., Frederick, L.M., von Loehneysen, K., Dinauer, M.C., and Knaus, U.G. (2006). Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. Cell Signal *18*, 69-82.

Massenet, C., Chenavas, S., Cohen-Addad, C., Dagher, M.-C., Brandolin, G., Pebay-Peyroula, E., and Fieschi, F. (2005). Effects of p47phox C Terminus Phosphorylations on Binding Interactions with p40phox and p67phox STRUCTURAL AND FUNCTIONAL COMPARISON OF p40phox and p67phox SH3 DOMAINS. J Biol Chem *280*, 13752-13761.

Mauch, P., Constine, L., Greenberger, J., Knospe, W., Sullivan, J., Liesveld, J.L., and Deeg, H.J. (1995). Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. International journal of radiation oncology, biology, physics *31*, 1319-1339.

McAdams, T.A., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (1996). Hematopoietic cell culture therapies (Part I): Cell culture considerations. Trends Biotechnol *14*, 341-349.

McKenzie, J.L., Takenaka, K., Gan, O.I., Doedens, M., and Dick, J.E. (2007). Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. Blood *109*, 543-545.

Mendez, I.d., Homayounpour, N., and Leto, T.L. (1997). Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. Mol Cell Biol *17*, 2177-2185.

Meng, T.C., Buckley, D.A., Galic, S., Tiganis, T., and Tonks, N.K. (2004). Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. J Biol Chem *279*, 37716-37725.

Meng, T.C., Fukada, T., and Tonks, N.K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. Molecular cell *9*, 387-399.

Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., Gentzsch, J., Kaderali, L., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2012). MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles. PLoS pathogens *8*, e1002829.

Metcalf, D. (2007). On hematopoietic stem cell fate. Immunity *26*, 669-673.

Mirkovic, N., Voehringer, D.W., Story, M.D., McConkey, D.J., McDonnell, T.J., and Meyn, R.E. (1997). Resistance to radiation-induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting cellular thiols. Oncogene *15*, 1461-1470.

Miyamoto, K. (2008). [FoxO3a is essential for the maintenance of hematopoietic stem cell pool]. Rinsho Ketsueki *49*, 141-146.

Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., *et al.* (2007). Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. Cell Stem Cell *1*, 101-112.

Möhle, R., Bautz, F., Rafii, S., Moore, M.A., Brugger, W., and Kanz, L. (1998). The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. Blood *91*, 4523-4530.

Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature *441*, 1068-1074.

Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity *1*, 661-673.

Mortensen, M., Soilleux, E.J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A.J., Glanville, J., Knight, S., Jacobsen, S.-E.W., *et al.* (2011a). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. J Exp Med *208*, 455-467.

Mortensen, M., Watson, A.S., and Simon, A.K. (2011b). Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. Autophagy *7*, 1069-1070.

Moskwa, P., Palicz, A., Paclet, M.-H., Dagher, M.-C., Erdos, M., Maródi, L., and Ligeti, E. (2004). Glucocerebroside inhibits NADPH oxidase activation in cell-free system. Biochim Biophys Acta *1688*, 197-203.

Muller-Sieburg, C.E., Cho, R.H., Thoman, M., Adkins, B., and Sieburg, H.B. (2002). Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Blood *100*, 1302-1309.

Muller-Sieburg, C.E., Whitlock, C.A., and Weissman, I.L. (1986). Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell. Cell *44*, 653-662.

Mumbengegwi, D.R., Li, Q., Li, C., Bear, C.E., and Engelhardt, J.F. (2008). Evidence for a superoxide permeability pathway in endosomal membranes. Mol Cell Biol *28*, 3700-3712.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J *417*, 1-13.

Musset, B., Clark, R.A., DeCoursey, T.E., Petheo, G.L., Geiszt, M., Chen, Y., Cornell, J.E., Eddy, C.A., Brzyski, R.G., and El Jamali, A. (2012). NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. J Biol Chem *287*, 9376-9388.

Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. Proc Natl Acad Sci USA *91*, 2305-2309.

Nakamura, M., Murakami, M., Koga, T., Tanaka, Y., and Minakami, S. (1987). Monoclonal antibody 7D5 raised to cytochrome b558 of human neutrophils: immunocytochemical detection of the antigen in peripheral phagocytes of normal subjects, patients with chronic granulomatous disease, and their carrier mothers. Blood *69*, 1404-1408.

Nakamura, Y., Komano, H., and Nakauchi, H. (1993). Two alternative forms of cDNA encoding CD34. Exp Hematol *21*, 236-242.

Nakano, Y., Banfi, B., Jesaitis, A.J., Dinauer, M.C., Allen, L.-A.H., and Nauseef, W.M. (2007). Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. Biochem J *403*, 97-108.

Nakano, Y., Longo-Guess, C.M., Bergstrom, D.E., Nauseef, W.M., Jones, S.M., and Bánfi, B. (2008). Mutation of the Cyba gene encoding p22phox causes vestibular and immune defects in mice. J Clin Invest *118*, 1176-1185.

Nauseef, W.M. (2004). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. Histochem Cell Biol *122*, 277-291.

Nie, Y., Han, Y.-C., and Zou, Y.-R. (2008). CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. J Exp Med *205*, 777-783.

Nilsson, S.K., Dooner, M.S., Tiarks, C.Y., Weier, H.U., and Quesenberry, P.J. (1997). Potential and distribution of transplanted hematopoietic stem cells in a nonablated mouse model. Blood *89*, 4013-4020.

Nilsson, S.K., Johnston, H.M., and Coverdale, J.A. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. Blood *97*, 2293-2299.

Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., Williams, B., Webb, R.J., Denhardt, D.T., Bertoncello, I., Bendall, L.J., Simmons, P.J., and Haylock, D.N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. Blood *106*, 1232-1239.

Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C.-H., and Lambeth, J.D. (1999). The p67 phox Activation Domain Regulates Electron Flow from NADPH to Flavin in Flavocytochromeb 558. J Biol Chem *274*, 22999-23005.

Nobuhisa, I., Takeya, R., Ogura, K., Ueno, N., Kohda, D., Inagaki, F., and Sumimoto, H. (2006). Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires co-operation between the tandem SH3 domains of p47phox in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent alpha-helix of p22phox. Biochem J *396*, 183-192.

Novak, I. (2012). Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal. Antioxid Redox Signal *17*, 794-802.

Novelli, E.M., Ramirez, M., and Civin, C.I. (1998). Biology of CD34+CD38- cells in lymphohematopoiesis. Leuk Lymphoma *31*, 285-293.

Nunoi, H., Rotrosen, D., Gallin, J.I., and Malech, H.L. (1988). Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. Science *242*, 1298-1301.

O'Donnell, B.V., Tew, D.G., Jones, O.T., and England, P.J. (1993). Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. Biochem J *290 (Pt 1)*, 41-49.

Oakley, F.D., Abbott, D., Li, Q., and Engelhardt, J.F. (2009). Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes. Antioxid Redox Signal *11*, 1313-1333.

Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood *81*, 2844-2853.

Okuno, Y., Iwasaki, H., Huettner, C.S., Radomska, H.S., Gonzalez, D.A., Tenen, D.G., and Akashi, K. (2002). Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 6246-6251.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996a). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science *273*, 242-245.

Osawa, M., Nakamura, K., Nishi, N., Takahasi, N., Tokuomoto, Y., Inoue, H., and Nakauchi, H. (1996b). In vivo self-renewal of c-Kit+ Sca-1+ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. J Immunol *156*, 3207-3214.

Owusu-Ansah, E., and Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. Nature *461*, 537-541.

Paclet, M.-H., Henderson, L.M., Campion, Y., Morel, F., and Dagher, M.-C. (2004). Localization of Nox2 N-terminus using polyclonal antipeptide antibodies. Biochem J *382*, 981-986.

Paclet, M.H., Coleman, A.W., Burritt, J., and Morel, F. (2001). NADPH oxidase of Epstein-Barr-virus immortalized B lymphocytes. Effect of cytochrome b(558) glycosylation. Eur J Biochem *268*, 5197-5208.

Pacquelet, S., Lehmann, M., Luxen, S., Regazzoni, K., Frausto, M., Noack, D., and Knaus, U.G. (2008). Inhibitory action of NoxA1 on dual oxidase activity in airway cells. J Biol Chem *283*, 24649-24658.

Papa, S., Martino, P.L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmo, D., Signorile, A., and Petruzzella, V. (2012). The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. Adv Exp Med Biol *942*, 3-37.

Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G.V., and Wolf, N.S. (1995). The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. Proc Natl Acad Sci USA *92*, 9647-9651.

Parkos, C.A., Dinauer, M.C., Walker, L.E., Allen, R.A., Jesaitis, A.J., and Orkin, S.H. (1988). Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. PNAS *85*, 3319-3323.

Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R., and Down, J.D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. Proc Natl Acad Sci USA *104*, 5431-5436.

Pearce, D.J., Taussig, D., Zibara, K., Smith, L.L., Ridler, C.M., Preudhomme, C., Young, B.D., Rohatiner, A.Z., Lister, T.A., and Bonnet, D. (2006). AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. Blood *107*, 1166-1173.

Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben-Hur, H., Lapidot, T., and Alon, R. (1999). The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. J Clin Invest *104*, 1199-1211.

Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M.M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., *et al.* (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. Blood *95*, 3289-3296.

Pelicano, H., Carney, D., and Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resist Updat *7*, 97-110.

Pendyala, S., and Natarajan, V. (2010). Redox regulation of Nox proteins. Respir Physiol Neurobiol *174*, 265-271.

Piccoli, C., Agriesti, F., Scrima, R., Falzetti, F., Di Ianni, M., and Capitanio, N. (2013). To breathe or not to breathe: the haematopoietic stem/progenitor cells dilemma. Br J Pharmacol *169*, 1652-1671.

Piccoli, C., D'Aprile, A., Ripoli, M., Scrima, R., Boffoli, D., Tabilio, A., and Capitanio, N. (2007a). The hypoxia-inducible factor is stabilized in circulating hematopoietic stem cells under normoxic conditions. FEBS Lett *581*, 3111-3119.

Piccoli, C., D'Aprile, A., Ripoli, M., Scrima, R., Lecce, L., Boffoli, D., Tabilio, A., and Capitanio, N. (2007b). Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. Biochem Biophys Res Commun *353*, 965-972.

Piccoli, C., D'Aprile, A., Scrima, R., Ripoli, M., Boffoli, D., Tabilio, A., and Capitanio, N. (2007c). Role of reactive oxygen species as signal molecules in the pre-commitment phase of adult stem cells. Ital J Biochem *56*, 295-301.

Piccoli, C., Ria, R., Scrima, R., Cela, O., D'Aprile, A., Boffoli, D., Falzetti, F., Tabilio, A., and Capitanio, N. (2005). Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. J Biol Chem *280*, 26467-26476.

Piro, D., Piccoli, C., Guerra, L., Sassone, F., D'Aprile, A., Favia, M., Castellani, S., Di Gioia, S., Lepore, S., Garavaglia, M.L., *et al.* (2012). Hematopoietic stem/progenitor cells express functional mitochondrial energy-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Stem Cells Dev *21*, 634-646.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science *284*, 143-147.

Porter, C.D., Parkar, M.H., Verhoeven, A.J., Levinsky, R.J., Collins, M.K., and Kinnon, C. (1994). p22-phox-deficient chronic granulomatous disease: reconstitution by retrovirus-mediated expression and identification of a biosynthetic intermediate of gp91-phox. Blood *84*, 2767-2775.

Prabhakar, N.R. (2000). Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. J Appl Physiol *88*, 2287-2295.

Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science *276*, 71-74.

Raad, H., Paclet, M.H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, M.T., Gougerot-Pocidalo, M.A., Dang, P.M., and El-Benna, J. (2009). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *23*, 1011-1022.

Rada, B., Hably, C., Meczner, A., Timár, C., Lakatos, G., Enyedi, P., and Ligeti, E. (2008). Role of Nox2 in elimination of microorganisms. Semin Immunopathol *30*, 237-253.

Rafii, S., Mohle, R., Shapiro, F., Frey, B.M., and Moore, M.A. (1997). Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. Leuk Lymphoma *27*, 375-386.

Rafii, S., Shapiro, F., Pettengell, R., Ferris, B., Nachman, R.L., Moore, M.A., and Asch, A.S. (1995). Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. Blood *86*, 3353-3363.

Rassool, F.V., Gaymes, T.J., Omidvar, N., Brady, N., Beurlet, S., Pla, M., Reboul, M., Lea, N., Chomienne, C., Thomas, N.S.B., *et al.* (2007). Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? Cancer Res *67*, 8762-8771.

Razumovitch, J.A., Fuchs, D., Semenkova, G.N., and Cherenkevich, S.N. (2004). Influence of neopterin on generation of reactive species by myeloperoxidase in human neutrophils. Biochim Biophys Acta *1672*, 46-50.

Reddy, M.M., Fernandes, M.S., Salgia, R., Levine, R.L., Griffin, J.D., and Sattler, M. (2011). NADPH oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases. Leukemia *25*, 281-289.

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature *445*, 111-115.

Rich, I.N., and Kubanek, B. (1982). The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells in vitro. Br J Haematol *52*, 579-588.

Riganti, C., Costamagna, C., Bosia, A., and Ghigo, D. (2006). The NADPH oxidase inhibitor apocynin (acetovanillone) induces oxidative stress. Toxicology and applied pharmacology *212*, 179-187.

Rigutto, S., Hoste, C., Grasberger, H., Milenkovic, M., Communi, D., Dumont, J.E., Corvilain, B., Miot, F., and De Deken, X. (2009). Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. J Biol Chem *284*, 6725-6734.

Ris-Stalpers, C. (2006). Physiology and pathophysiology of the DUOXes. Antioxid Redox Signal *8*, 1563-1572.

Robert-Richard, E., Ged, C., Ortet, J., Santarelli, X., Lamrissi-Garcia, I., de Verneuil, H., and Mazurier, F. (2006). Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice. Haematologica *91*.

Rokutan, K., Kawahara, T., Kuwano, Y., Tominaga, K., Nishida, K., and Teshima-Kondo, S. (2008). Nox enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract. Semin Immunopathol *30*, 315-327.

Romero-Moya, D., Bueno, C., Montes, R., Navarro-Montero, O., Iborra, F.J., López, L.C., Martin, M., and Menendez, P. (2013). Cord blood-derived CD34+ hematopoietic cells with low mitochondrial mass are enriched in hematopoietic repopulating stem cell function. Haematologica *98*, 1022-1029.

Rouhanizadeh, M., Hwang, J., Clempus, R.E., Marcu, L., Lassègue, B., Sevanian, A., and Hsiai, T.K. (2005). Oxidized-1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine induces vascular endothelial superoxide production: implication of NADPH oxidase. Free Radic Biol Med *39*, 1512-1522.

Royer-Pokora, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T., and Orkin, S.H. (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. Nature *322*, 32-38.

Sallmyr, A., Fan, J., Datta, K., Kim, K.-T., Grosu, D., Shapiro, P., Small, D., and Rassool, F. (2008). Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. Blood *111*, 3173-3182.

Sambani, C., La Starza, R., Roumier, C., Crescenzi, B., Stavropoulou, C., Katsarou, O., Karafoulidou, A., Dhalle, J.H., Lai, J.-L., Preudhomme, C., *et al.* (2004). Partial duplication of the MLL oncogene in patients with aggressive acute myeloid leukemia. Haematologica *89*, 403-407.

Sanchez, P.V., Perry, R.L., Sarry, J.E., Perl, A.E., Murphy, K., Swider, C.R., Bagg, A., Choi, J.K., Biegel, J.A., Danet-Desnoyers, G., *et al.* (2009). A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. Leukemia *23*, 2109-2117.

Saretzki, G., Armstrong, L., Leake, A., Lako, M., and von Zglinicki, T. (2004). Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. Stem Cells *22*, 962-971.

Sarry, J.E., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P.V., Secreto, A., Keefer, C., Swider, C.R., Strzelecki, A.C., Cavelier, C., Recher, C., *et al.* (2011). Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgammac-deficient mice. J Clin Invest *121*, 384-395.

Sattler, M., Winkler, T., Verma, S., Byrne, C.H., Shrikhande, G., Salgia, R., and Griffin, J.D. (1999). Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. Blood *93*, 2928-2935.

Sauer, H., Rahimi, G., Hescheler, J., and Wartenberg, M. (2000). Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. FEBS Lett *476*, 218-223.

Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. Cell Physiol Biochem *11*, 173-186.

Savitsky, P.A., and Finkel, T. (2002). Redox regulation of Cdc25C. J Biol Chem *277*, 20535-20540.

Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., *et al.* (2008). Identification of cells initiating human melanomas. Nature *451*, 345-349.

Schmelter, M., Ateghang, B., Helmig, S., Wartenberg, M., and Sauer, H. (2006). Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. FASEB J *20*, 1182-1184.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells *4*, 7-25.

Schulze-Osthoff, K., Beyaert, R., Vandevoorde, V., Haegeman, G., and Fiers, W. (1993). Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. EMBO J *12*, 3095-3104.

Scott, L.M., Priestley, G.V., and Papayannopoulou, T. (2003). Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. Mol Cell Biol *23*, 9349-9360.

Segal, A.W., Jones, O.T., Webster, D., and Allison, A.C. (1978). Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. Lancet *2*, 446-449.

Seo, J.H., Ahn, Y., Lee, S.R., Yeol Yeo, C., and Chung Hur, K. (2005). The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is

phosphatase and tensin homolog and not phosphoinositide-3 kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway. Mol Biol Cell *16*, 348-357.

Sharma, S., Gurudutta, G.U., Satija, N.K., Pati, S., Afrin, F., Gupta, P., Verma, Y.K., Singh, V.K., and Tripathi, R.P. (2006). Stem cell c-KIT and HOXB4 genes: critical roles and mechanisms in self-renewal, proliferation, and differentiation. Stem Cells Dev *15*, 755-778.

Shima, H., Takubo, K., Tago, N., Iwasaki, H., Arai, F., Takahashi, T., and Suda, T. (2010). Acquisition of G_0 state by CD34-positive cord blood cells after bone marrow transplantation. Exp Hematol *38*, 1231-1240.

Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H. (2001). A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. J Biol Chem *276*, 1417-1423.

Shiose, A., and Sumimoto, H. (2000). Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. J Biol Chem *275*, 13793-13801.

Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., *et al.* (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. J Immunol *174*, 6477-6489.

Si, J., Fu, X., Behar, J., Wands, J., Beer, D.G., Souza, R.F., Spechler, S.J., Lambeth, D., and Cao, W. (2007). NADPH oxidase NOX5-S mediates acid-induced cyclooxygenase-2 expression via activation of NF-kappaB in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. J Biol Chem *282*, 16244-16255.

Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963). THE DISTRIBUTION OF COLONY-FORMING CELLS AMONG SPLEEN COLONIES. J Cell Physiol *62*, 327-336.

Simons, J.M., t Hart, B.A., Ip Vai Ching, T.R.A.M., Van Dijk, H., and Labadie, R.P. (1990). Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. Free Radical Biology and Medicine *8*, 251-258.

Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. Cell Stem Cell *7*, 380-390.

Sinenko, S.A., Hung, T., Moroz, T., Tran, Q.-M., Sidhu, S., Cheney, M.D., Speck, N.A., and Banerjee, U. (2010). Genetic manipulation of AML1-ETO-induced expansion of hematopoietic precursors in a Drosophila model. Blood *116*, 4612-4620.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. Nature *432*, 396-401.

Skinner, A.M., O'Neill, S.L., Grompe, M., and Kurre, P. (2008). CXCR4 induction in hematopoietic progenitor cells from Fanca(-/-), -c(-/-), and -d2(-/-) mice. Exp Hematol *36*, 273-282.

Souabni, H., Thoma, V., Bizouarn, T., Chatgilialoglu, C., Siafaka-Kapadai, A., Baciou, L., Ferreri, C., Houée-Levin, C., and Ostuni, M.A. (2012). trans Arachidonic acid isomers inhibit NADPH-oxidase activity by direct interaction with enzyme components. Biochim Biophys Acta *1818*, 2314-2324.

Spangrude, G.J., and Brooks, D.M. (1992). Phenotypic analysis of mouse hematopoietic stem cells shows a Thy-1-negative subset. Blood *80*, 1957-1964.

Stanger, O., Renner, W., Khoschsorur, G., Rigler, B., and Wascher, T.C. (2001). NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and lipid peroxidation in coronary artery disease. Clinical Physiology *21*, 718-722.

Stasia, M.J. (2007). [The X+ chronic granulomatous disease as a fabulous model to study the NADPH oxidase complex activation]. Med Sci (Paris) *23*, 526-532.

Stasia, M.J., Cathebras, P., Lutz, M.F., and Durieu, I. (2009). [Chronic-granulomatous disease]. Rev Med Interne *30*, 221-232.

Stuehr, D.J., Fasehun, O.A., Kwon, N.S., Gross, S.S., Gonzalez, J.A., Levi, R., and Nathan, C.F. (1991). Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. FASEB J *5*, 98-103.

Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. Cell Stem Cell *9*, 298-310.

Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griendling, K.K., and Lambeth, J.D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature *401*, 79-82.

Szeto, H.H. (2006). Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents. AAPS J *8*, E521-531.

Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1996). Human osteosarcoma cell lines MG-63 and SaOS-2 produce G-CSF and GM-CSF: identification and partial characterization of cell-associated isoforms. Exp Hematol *24*, 509-517.

Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1998). The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. Stem Cells *16*, 7-15.

Taichman, R.S., Reilly, M.J., and Emerson, S.G. (2000). The Hematopoietic Microenvironment: Osteoblasts and The Hematopoietic Microenvironment. Hematology *4*, 421-426.

Tajima, F., Deguchi, T., Laver, J.H., Zeng, H., and Ogawa, M. (2001). Reciprocal expression of CD38 and CD34 by adult murine hematopoietic stem cells. Blood *97*, 2618-2624.

Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nunoi, H., and Sumimoto, H. (2003). Novel Human Homologues of p47phox and p67phox Participate in Activation of Superoxide-producing NADPH Oxidases. J Biol Chem *278*, 25234-25246.

Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R.S., Soga, T., *et al.* (2013). Regulation of glycolysis by Pdk

functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell *12*, 49-61.

Tamura, M., Shiozaki, I., Ono, S., Miyano, K., Kunihiro, S., and Sasaki, T. (2007). p40phox as an alternative organizer to p47phox in Nox2 activation: a new mechanism involving an interaction with p22phox. FEBS Lett *581*, 4533-4538.

Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., and Honjo, T. (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. Science *261*, 600-603.

Taussig, D.C., Miraki-Moud, F., Anjos-Afonso, F., Pearce, D.J., Allen, K., Ridler, C., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S.G., *et al.* (2008). Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. Blood *112*, 568-575.

Taussig, D.C., Vargaftig, J., Miraki-Moud, F., Griessinger, E., Sharrock, K., Luke, T., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S.G., *et al.* (2010). Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. Blood *115*, 1976-1984.

Tavassoli, M., and Hardy, C.L. (1990). Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow. Blood *76*, 1059-1070.

Teahan, C., Rowe, P., Parker, P., Totty, N., and Segal, A.W. (1987). The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. Nature *327*, 720-721.

ten Freyhaus, H., Huntgeburth, M., Wingler, K., Schnitker, J., Bäumer, A.T., Vantler, M., Bekhite, M.M., Wartenberg, M., Sauer, H., and Rosenkranz, S. (2006). Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. Cardiovasc Res *71*, 331-341.

Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol *279*, L1005-1028.

Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res *14*, 213-222.

Till, J.E., McCulloch, E.A., and Siminovitch, L. (1964a). A STOCHASTIC MODEL OF STEM CELL PROLIFERATION, BASED ON THE GROWTH OF SPLEEN COLONY-FORMING CELLS. Proc Natl Acad Sci USA *51*, 29-36.

Till, J.E., McCulloch, E.A., and Siminovitch, L. (1964b). A STOCHASTIC MODEL OF STEM CELL PROLIFERATION, BASED ON THE GROWTH OF SPLEEN COLONY-FORMING CELLS. Proc Natl Acad Sci U S A *51*, 29-36.

Tonks, A., Tonks, A.J., Pearn, L., Pearce, L., Hoy, T., Couzens, S., Fisher, J., Burnett, A.K., and Darley, R.L. (2004). Expression of AML1-ETO in human myelomonocytic cells selectively inhibits granulocytic differentiation and promotes their self-renewal. Leukemia *18*, 1238-1245.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., *et al.* (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell *128*, 325-339.

Touyz, R.M., Chen, X., Tabet, F., Yao, G., He, G., Quinn, M.T., Pagano, P.J., and Schiffrin, E.L. (2002). Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. Circ Res *90*, 1205-1213.

Traver, D., Akashi, K., Weissman, I.L., and Lagasse, E. (1998). Mice defective in two apoptosis pathways in the myeloid lineage develop acute myeloblastic leukemia. Immunity *9*, 47-57.

Trost, M., Sauvageau, M., Hérault, O., Deleris, P., Pomiès, C., Chagraoui, J., Mayotte, N., Meloche, S., Sauvageau, G., and Thibault, P. (2012). Posttranslational regulation of self-renewal capacity: insights from proteome and phosphoproteome analyses of stem cell leukemia. Blood *120*, e17-27.

Tsunawaki, S., Mizunari, H., Nagata, M., Tatsuzawa, O., and Kuratsuji, T. (1994). A novel cytosolic component, p40phox, of respiratory burst oxidase associates with p67phox and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67phox. Biochem Biophys Res Commun *199*, 1378-1387.

Ueno, N., Takeya, R., Miyano, K., Kikuchi, H., and Sumimoto, H. (2005). The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. J Biol Chem *280*, 23328-23339.

Uhlinger, D.J., Tyagi, S.R., Inge, K.L., and Lambeth, J.D. (1993). The respiratory burst oxidase of human neutrophils. Guanine nucleotides and arachidonate regulate the assembly of a multicomponent complex in a semirecombinant cell-free system. J Biol Chem *268*, 8624-8631.

Ushio-Fukai, M. (2006). Localizing NADPH oxidase-derived ROS. Sci STKE *2006*.

Vallet, P., Charnay, Y., Steger, K., Ogier-Denis, E., Kovari, E., Herrmann, F., Michel, J.P., and Szanto, I. (2005). Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. Neuroscience *132*, 233-238.

Vignon, C., Georget, M.-T., Levern, Y., Ducrocq, E., Bernard, M.-C., Estienne, M.-H., Kerboeuf, D., Rosset, P., Gyan, E., Binet, C., *et al.* (2010). Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Regulate the Metabolism of H2O2 In Human Leukemic Cells. ASH Annual Meeting Abstracts *116*.

Vignon, C., Lachot, S., Levern, Y., Herault, B., Rosset, P., Perrotin, F., Gyan, E., Domenech, J., and Herault, O. (2012). Reactive Oxygen Species Level and GPX3 Expression in Human CD34+CD38- Progenitors Harvested From Cord Blood, Adult Bone Marrow and Peripheral Blood. ASH Annual Meeting Abstracts *120*.

Vincent, A., and Crozatier, M. (2010). Neither too much nor too little: reactive oxygen species levels regulate Drosophila hematopoiesis. J Mol Cell Biol *2*, 74-75.

Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res *92*, 827-839.

Volpp, B.D., Nauseef, W.M., and Clark, R.A. (1988). Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. Science *242*, 1295-1297.

Wallach, T.M., and Segal, A.W. (1997). Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. Biochem J *321 (Pt 3)*, 583-585.

Wang, D., Deken, X.D., Milenkovic, M., Song, Y., Pirson, I., Dumont, J.E., and Miot, F. (2005). Identification of a Novel Partner of Duox EFP1, A THIOREDOXIN-RELATED PROTEIN. J Biol Chem *280*, 3096-3103.

Wang, N., Xie, K., Huo, S., Zhao, J., Zhang, S., and Miao, J. (2007). Suppressing phosphatidylcholine-specific phospholipase C and elevating ROS level, NADPH oxidase activity and Rb level induced neuronal differentiation in mesenchymal stem cells. J Cell Biochem *100*, 1548-1557.

Ward, P.S., Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Coller, H.A., Cross, J.R., Fantin, V.R., Hedvat, C.V., Perl, A.E., *et al.* (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. Cancer Cell *17*, 225-234.

Warner, J.K., Wang, J.C.Y., Takenaka, K., Doulatov, S., McKenzie, J.L., Harrington, L., and Dick, J.E. (2005). Direct evidence for cooperating genetic events in the leukemic transformation of normal human hematopoietic cells. Leukemia *19*, 1794-1805.

Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. Nat Rev Mol Cell Biol *11*, 872-884.

Wicha, M.S., Liu, S., and Dontu, G. (2006). Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. Cancer Res *66*, 1883-1890; discussion 1895-1896.

Wientjes, F.B., Hsuan, J.J., Totty, N.F., and Segal, A.W. (1993). p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. Biochem J *296 (Pt 3)*, 557-561.

Wilhelm, B.T., Briau, M., Austin, P., Faubert, A., Boucher, G., Chagnon, P., Hope, K., Girard, S., Mayotte, N., Landry, J.-R., *et al.* (2011). RNA-seq analysis of 2 closely related leukemia clones that differ in their self-renewal capacity. Blood *117*, e27-38.

Wilson, A., Oser, G.M., Jaworski, M., Blanco-Bose, W.E., Laurenti, E., Adolphe, C., Essers, M.A., Macdonald, H.R., and Trumpp, A. (2007). Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. Ann N Y Acad Sci *1106*, 64-75.

Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol *6*, 93-106.

Wind, S., Beuerlein, K., Eucker, T., Müller, H., Scheurer, P., Armitage, M.E., Ho, H., Schmidt, H.H.H.W., and Wingler, K. (2010). Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. Br J Pharmacol *161*, 885-898.

Woolley, J.F., Naughton, R., Stanicka, J., Gough, D.R., Bhatt, L., Dickinson, B.C., Chang, C.J., and Cotter, T.G. (2012). H2O2 production downstream of FLT3 is mediated by p22phox in the endoplasmic reticulum and is required for STAT5 signalling. PLoS ONE *7*.

Wright, D.E., Bowman, E.P., Wagers, A.J., Butcher, E.C., and Weissman, I.L. (2002). Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. J Exp Med *195*, 1145-1154.

Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. Cell *124*, 471-484.

Xiao, Q., Luo, Z., Pepe, A.E., Margariti, A., Zeng, L., and Xu, Q. (2009). Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H2O2. Am J Physiol, Cell Physiol *296*, C711-723.

Yalcin, S., Zhang, X., Luciano, J.P., Mungamuri, S.K., Marinkovic, D., Vercherat, C., Sarkar, A., Grisotto, M., Taneja, R., and Ghaffari, S. (2008). Foxo3 is essential for the regulation of ataxia telangiectasia mutated and oxidative stress-mediated homeostasis of hematopoietic stem cells. J Biol Chem *283*, 25692-25705.

Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S.-i., Morita, Y., Eto, K., Ema, H., and Nakauchi, H. (2006). Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. EMBO J *25*, 3515-3523.

Yang, S., Madyastha, P., Bingel, S., Ries, W., and Key, L. (2001). A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. J Biol Chem *276*, 5452-5458.

Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene *27*, 5497-5510.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature *425*, 836-841.

Zhao, X., Xu, B., Bhattacharjee, A., Oldfield, C.M., Wientjes, F.B., Feldman, G.M., and Cathcart, M.K. (2005). Protein kinase Cδ regulates p67phox phosphorylation in human monocytes. J Leukoc Biol *77*, 414-420.

Zhou, F.-L., Zhang, W.-G., Wei, Y.-C., Meng, S., Bai, G.-G., Wang, B.-Y., Yang, H.-Y., Tian, W., Meng, X., Zhang, H., *et al.* (2010). Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia. J Biol Chem *285*, 15010-15015.

Zhu, Q.-S., Xia, L., Mills, G.B., Lowell, C.A., Touw, I.P., and Corey, S.J. (2006). G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. Blood *107*, 1847-1856.

Zohren, F., Toutzaris, D., Klärner, V., Hartung, H.-P., Kieseier, B., and Haas, R. (2008). The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. Blood *111*, 3893-3895.

Joan Leclerc

Activité NADPH oxydase des cellules de leucémie aiguë myéloïdes

Le métabolisme oxydatif joue un rôle important dans l'hématopoïèse normale et leucémique. L'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est un élément crucial qui repose sur une balance finement régulée entre leur élimination et leur production. A ce niveau, des études ont montrés une différence entre cellules souches leucémique (CSL) présentant un faible niveau de ROS et cellules différenciées leucoblastiques présentant un plus fort niveau de ROS. Dans cette étude nous avons montré que les NADPH oxydases sont des producteurs majeurs de ROS des cellules de leucémies aiguës myéloïdes. Les cellules leucoblastiques, quelque soit le stade de différenciation présentent une activité NADPH oxydase constitutive qui contribue à leur niveau de ROS élevé et favorise leur prolifération en accélérant le cycle cellulaire. A l'inverse, les analyses réalisées sur des CSL grâce à des modèles murins de leucémies primaires induites par les oncogènes *Hoxa9* et *Meis1* suggèrent qu'il existerait une plus faible activité oxydase dans les cellules souches leucémiques.

Mots clés : NADPH oxydase, Leucémie aiguë myéloïde, Espèces réactives de l'oxygène, Cellules souches leucémiques, Prolifération leucémique

Oxydative metabolism play a key role in normal and leukemic hematopoiesis. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis is a crucial point which is the result of a finely regulated balance between elimination and production. Recent studies establishe a difference in ROS level between leukemic stem cells (LSC, ROS^{low}) and differentiated leucoblasts (higher level). In our study we have shown that NADPH oxidases are major ROS producers in acute myeloid leukemic cells. Leukoblasts, wathever their differentition stage, have a constitutive NADPH oxydase activity that contributes to the ROS level and promotes the proliferation by accelerating the cell cycle. Conversly, the analyses of LSCs performed by using murins primary leukemia induced by *Hoxa9* and *Meis1* oncogens suggest a potential lower NADPH oxidase activity in LSCs.

Key words : NADPH oxidases, Acute myeloïd leukemia, Reactive oxygen species, Leukemic stem cells, Leukemic proliferation