



NNT/NL: 0000AIXM0000/000ED000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université Le 28 septembre 2021 par

Julien Grenier

Mécanismes moléculaires impliquant JAM-C dans le maintien du caractère souche des cellules de Leucémies Aigües Myéloïdes

Discipline • Biologie santé	Composition du jury	
Spécialité Oncologie	<u>Françoise Porteu</u> Cancer Campus Gustav	Rapporteuse e Roussy, INSERM U1287
École doctorale Ecole doctorale 62	<u>Cyril Broccardo</u> UMR1037 Inserm / Université Toulouse III F Sabatier	
Laboratoire/Partenaires de recherche Centre de Recherche en Cancérologie de	<u>Marion Espeli</u> Inserm U1160 "EMiLy"	Examinatrice
Marseille. Institut Paoli-Calmettes Fondation ARC	<u>Patrice Dubreuil</u> CRCM, Inserm UMR106 U105	Examinateur 58, Aix Marseille Université
Société française d'hématologie (SFH).	<u>Michel Aurrand-lions</u> CRCM, Inserm UMR106 U105	Directeur de thèse 58, Aix Marseille Université









AFFIDAVIT

Je soussigné, Julien Grenier, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Michel Aurrand-lions, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 15 juin 2021

RESUME

La leucémie aigüe myéloïde (LAM) est un cancer résultant de la prolifération de blastes qui sont issus des cellules souches leucémiques (CSL). Récemment, nous avons prouvé que JAM-C permet d'identifier une population de CSL présentant une activité d'initiation leucémique et une activité Src kinase exacerbée. Mon projet de thèse consistait à identifier les voies de signalisations en aval de JAM-C qui contribuent à l'initiation leucémique. En utilisant un modèle murin de LAM nous avons pu démontrer que JAM-C est impliqué dans les phénomènes précoces d'initiation leucémique. De façon similaire, dans la LAM humaine l'expression de JAM-C est corrélée à l'expression du marqueur de cellules souches GPR56 et à une activité exacerbée d'initiation leucémique. De façon surprenante, nous avons montré que JAM-C pourrait interragir avec la machinerie d'épissage des CSLs par l'intermédiare du clivage et de la libération de son domaine intra-cellulaire. Cette hypothèse a été corroborée par l'existence d'une signature d'épissage associée à l'expression de JAM-C. Cette découverte nous a permis d'élaborer un score pronostic reposant sur l'épissage alternatif (SPL9) et prédisant la réponse aux traitements. Nous espérons que dans un futur proche ce score pourra être utilisé en routine clinique comme une aide à la décision thérapeutique afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de LAM.

Mots clés : JAM-C, Leucémies aigue myéloïdes, Cellules souche leucémiques et épissage

ABSTRACT

Acute myeloid leukaemia (AML) is a cancer resulting from blasts proliferation emerging from leukemic stem cells (LSCs). Recently, we have shown that JAM-C identifies a population of LSCs with leukemic initiation activity and exacerbated Src kinase activity. My thesis project consisted to uncover the signaling pathways downstream of JAM-C that contribute to leukemic initiation. Using a mouse model of AML, we were able to demonstrate that JAM-C is involved in early steps of leukemic initiation. Similarly, in Human AML, JAM-C expression is associated with stemness activity and the LSC marker GPR56. Surprisingly, we fiound that JAM-C could interact with the spliceossome through cleavage and release of its intracellular domain. This hypothesis was supported by the existence of a splicing signature correlated with JAM-C expression. This discovery allowed us to develop a prognostic score based on alternative splicing (SPL9) that predicts treatment response. We hope that in the near future this score can be used in clinical routine to help therapeutic decision and improve the management of AML patients.

Key words: JAM-C, Acute myeloid leukemia, Leukemic stem cells and splicing

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Dr **Françoise Porteu** et le Dr **Cyril Broccardo** d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse. Je remercie également le Dr **Marion Espeli** et le Dr **Patrice Dubreuil** de participer à ma thèse en tant qu'examinateurs. Je suis honoré de votre présence dans mon jury de thèse et merci de tous participer à cette aventure.

Merci à mon directeur de thèse, **Michel** merci d'avoir cru en moi, même lorsque moi je n'y croyais pas vraiment... Merci de m'avoir donné la passion pour la science et d'avoir su aiguiser ma curiosité. Mes parents en sont témoins, me supporter pendant presque 7 ans ça peut être compliqué... Merci d'avoir été là, de m'avoir aidé au quotidien, d'avoir répondu à mes questions et à mes incertitudes. Je pars la tête remplie de formidables souvenirs et fier de vous avoir eu comme directeur de thèse. J'espère que nos chemins se recroiseront, professionnellement ou même pour vous battre au squash parce qu'un jour j'y arriverai !!

Merci à **Patrice** qui en plus d'être mon examinateur a été un excellent parrain de thèse, merci pour tous les bons conseils que vous avez pu me donner et pour cela je vous en suis reconnaissant.

A **Florence** notre maman du labo, tu vas me manquer, jamais dans un autre laboratoire je ne retrouverai quelqu'un comme toi. Merci de m'avoir aidé pour les manips, d'avoir été là quand les expériences ne marchaient pas et d'avoir pris du temps pour m'écouter. Sans toi ces années dans l'équipe n'auraient pas été les mêmes.

Merci à toi **Patricia** pour toutes nos discussions même si nous n'étions pas toujours d'accord, discuter avec toi était et restera toujours un immense plaisir. Profite de ta maison, de ta fille et de tes amies tu l'as bien mérité et j'espère que nos chemins se recroiseront un jour.

Marjorie et Céline la nouvelle génération (on dirait un titre de série non ?) merci d'être vous, de m'avoir fait rire et surtout d'avoir ri à mes blagues, pas toujours drôles...
Marjorie je garderai en mémoire ta bonne humeur, ton humour et ton accent du sudouest. Juste par pitié, essaie d'apprendre à viser, ça pourrait être utile, en 2 ans tu n'as

REMERCIEMENTS

jamais réussi à m'atteindre avec tes boulettes de papier. J'espère qu'un jour tu auras la force de me pardonner le fameux « headshot gate » avec mon gant. **Céline** je t'ai vu grandir (pas littéralement étant donné que ta phase de croissance s'est probablement arrêtée très tôt) je suis sûr que tu feras de grandes choses dans cette équipe, la digne héritière des thésards MAL (c'est une analogie à Star wars). Je suis fier de compter en vous des amies avec qui je garderai des souvenirs impérissables et nous nous reverrons (sauf si vous commencez à supporter le PSG !!).

Merci à **Insaf** pour toutes nos discussions et tes conseils avisés j'espère que l'avenir t'apportera tout ce que tu souhaites.

Merci à **Stéphane et Cyril**, pour faire une analogie footballistique, cette année a été marquée par un mercato agité. Merci pour vos conseils, bienvenue à **Cyril** dans l'équipe bien que tu sois déjà à la maison et **Stéphane** je te souhaite le meilleur à Rennes.

Une pensée à tous les membres passés par l'équipe qui ont fait de moi le scientifique que je suis maintenant je pense à **Arnauld, Chama, Byia, Jordan, Virginie, Jessica, Jean-Charles, Jeoffrey, Vincent, Oksana**. Mention spéciale à **Greg**, merci de m'avoir aidé avec les souris, sans toi j'aurais grave galéré !! Je te souhaite à toi et à tes femmes le meilleur pour la suite.

A mes grandes sœurs du labo, **Maria, Anne-laure, Amandine et Marielle,** vous m'avez accueilli lorsque j'étais encore un jeune Master 1. Chacune, vous m'avez terriblement manqué, sans vous l'équipe n'avait plus tout à fait la même saveur. **Maria** merci d'avoir été là, à mes débuts et encore maintenant. **Marielle,** finalement avec le recul j'ai bien fait de faire une thèse, merci de m'avoir prévenu de la galère dans laquelle je m'étais engagé. **Amandine,** je me rappellerai toujours de ta bienveillance et de ta gentillesse, si maintenant je fais des blots de folie c'est grâce à toi ! **Anne-Laure,** tu es la dernière à être réellement partie du labo, nos discussions me manquent, merci d'avoir été là, d'être restée avec moi à des heures impossibles à m'aider encore et toujours. Tu as été pour moi un modèle, tu es la preuve qu'en faisant preuve de gentillesse nous pouvons y arriver même dans un monde aussi difficile soit-il. Il y aurait tant à dire alors je te dirai simplement « merci ».

Sébastien, le pilier des DUB/PdS que dis-je du CRCM !! Tu m'as vu grandir et c'est en grande partie grâce à toi ! Je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée au quotidien, tu aurais pu être mon co-directeur de thèse ! Merci pour toutes nos discussions, tous tes conseils, ton humour, nous aurons bien rigolé ! J'espère qu'après mon départ nous continuerons à nous voir au labo ou dans un lieu plus propice aux échanges scientifiques : le BLACKSTONE !!

Lise et Mathieu, qui l'eut cru, je remercie une lyonnaise (tourangelle avant tout !) et un bordelais dans ma thèse, incroyable !! Mais je dépasse nos différences footballistiques car j'ai découvert en vous de vrais amis ! Nos soirées vont me manquer, les Jägger n'auront plus la même saveur sans vous ! Mais s'il y a bien quelque chose que **Mathieu** m'a appris le premier est toujours cul-sec et on ne peut pas payer de conso avec sa carte vitale ! Lise, les soirs d'élimination du FC Lyon en champions league vont me manquer de qui vais-je bien pouvoir me moquer !! Je reviendrai à Marseille, conscient du fait que vous aurez enfin retrouvé la raison en vous mettant à supporter l'OM (c'est inéluctable !). Trèves de bêtises (oui c'est possible OK !!!) je vous souhaite le meilleur pour la suite vous êtes tous les deux géniaux et je ne me fais pas de soucis pour vous ! Vous allez déchirer !!!

J'ai également une pensée pour **Julie** à qui j'ai gratté un nombre incalculable de portoir et à qui j'ai fait profiter de mon délicieux humour et qui pourtant a continué à me prêter ses affaires !!

Je remercie l'ensemble de l'équipe de **Paulo** ma deuxième équipe d'adoption, **Edwige**, **Eric**, **Sophie**, **Sophie** (aka Sophie Nakamura), **Fabienne** et **Paulo**. Promis après mon départ l'aile retrouvera sa quiétude d'antan (enfin presque).

A ma troisième équipe d'adoption (promis j'arrête après) l'équipe DB/EM, là encore mon départ vous permettra de redécouvrir les joies du silence. Je remercie **Claire**, **Emilie et Marc** de pas m'avoir foutu dehors plus souvent malgré ma non discrétion légendaire. Je remercie également **Olivier C** pour sa bienveillance, sa bonne humeur et ses conseils mais pas pour son appétit avide pour les Haribos !

Je voulais remercier **Anaïs**, je suis heureux de t'avoir connu tu as toujours été bienveillante avec moi presque comme une grande sœur. Même si nous ne sommes pas toujours d'accord (et c'est un euphémisme) j'ai adoré te connaitre et j'espère de tout cœur qu'à mon retour tu seras CR car tu le mérites.

REMERCIEMENTS

A mes deux Belges préférés (à vrai dire je connais que vous et Benoit Poelvoorde) **Emerence et Ludovic.** Grace à vous j'ai appris le sens du mot « mitraillette » et « essuie » j'ai appris que la langue « française » pouvait receler bien des mystères. **Ludovic,** merci pour tous les aimants de ma carte si un jour je complète la France je ne manquerais pas de dire à mes enfants d'où proviennent ces aimants. Plus sérieusement merci pour ta bonne humeur et ton humour, reste comme tu es !! **Emerence,** merci pour ta bonne humeur, ton accent et ta manie de m'engueuler quand je prends une barquette en plastique pour mettre mon ketchup ! Grâce à toi mon CrompotScore™ (je dépose la marque ici au cas où) s'est nettement amélioré !! Merci d'être qui tu es, une personne formidable et je suis fier de te compter parmi mes amis. Et maintenant je peux clamer haut et fort que je suis presque bilingue « belge » comme démontré par ces phrases : « tu saurais me passer l'essuie, y a la clenche qui est mouillée une foé ! » ou encore « tu saurais descendre le carreau de l'auto je dois commander mes houit mitraillettes au drive ! ». Et pour cet apprentissage MERCI !!! Mais on est quand même champions du monde (2 étoiles et je ne parle pas de P value)

Je souhaiterai également remercier mes trois drôle de dames : **Violette, Camille et Sara** ! on en aura vécu des soirées ensemble dont certaines resteront mémorables ! Ces années au CRCM n'auraient pas été les mêmes sans vous et je tiens à vous remercier de m'avoir supporté moi et mes blagues pas toujours de très bon goût. Je vous souhaite le meilleur pour la suite et j'espère que nos chemins se recroiseront un jour et le plus tôt sera le mieux ! Et pour rester dans l'analogie télévisuelle je tiens à remercier **Charlie Aka Jéremy**, merci pour toutes ces soirées et pour tous ces bons moments ! Pharma RPZ !!

Merci à toi **Mary-loup**, mon binôme de la galère... euh pardon représentants étudiants (c'est un synonyme) je me suis régalé avec toi et je ne pouvais pas souhaiter un meilleur binôme, du fond du cœur merci ! Mine de rien on aura tout fait ensemble même passer notre thèse. Je te souhaite le meilleur pour la suite en commençant par te féliciter pour ton mariage !

Je remercie les sportifs du dimanche (littéralement !), **Rémi, Vincent, Julien, Yohan et Sébastien** ! Merci pour ces bons moments sportifs, j'espère juste que vous finirez par progresser au padel ! (Je ne rentrerai pas dans le détail des autres sports ou je suis comment dirais-je : NUL !) Merci au groupe MPG, **Geoffrey** (le grand manitou), **Eddy, Avais, Quentin, Kendall, Stéphane, Christophe L, Christophe G, Julien W, Fred et Remy**. Franchement j'ai eu beau tout essayé j'ai fini en ligue 2 la ligue des loosers !! Merci pour votre bonne humeur et vos blagues, j'en aurais appris des choses sur le CRCM grâce à vous ! Merci pour toutes les discussions qu'on a pu avoir au fil des années. Mention spéciale à **Christophe L** qui en plus de m'avoir battu à MPG a été un membre de mon comité de thèse et je t'en remercie.

Difficile à le croire mais je vais remercier un troisième lyonnais, **Raphaël**, comme quoi on peut supporter le FC Lyon et être un gars sûr ! Je me remémore mes nombreuses victoires au squash (spoilert alert : il y en a eu aucune !). Merci d'avoir été un super pote et d'avoir toujours été de bons conseils avec moi ! J'espère que tu arriveras à atteindre tes objectifs et je pense aussi que tu devrais arrêter de supporter le FC Lyon !

Je remercie toutes les plateformes qui m'ont aidé au cours de ma thèse, la plateforme protéomique : Merci à **Stéphane, Luc et Emilie** pour tous vos conseils et votre bienveillance. Merci à ICEP, **Christine, Anne et Emilie** pour votre aide au Nanostring et pour votre patience et votre écoute. Un énorme merci à la plateforme de cytométrie à **Françoise et Manon**, sans vous je n'y serais jamais arrivé, merci pour votre patience malgré mes incessantes questions. Enfin vous vous êtes débarrassées de moi !! Mais j'espère que nous serons amenés à nous revoir dans le futur ! J'ai également une pensée pour **Marie-Laure** avec qui j'ai commencé, j'ai découvert le monde « fabuleux » de la cytométrie. Enfin un grand merci aux animaliers, **Jean-Christophe**, **Cyril, Jean-Baptiste et Arnaud**. Merci à **Cyril** pour nos discussions et merci de m'avoir fait partager ta passion pour les tatouages et la musique. Merci à vous, **JB et Arnaud**, les soirs de match au stade vont me manquer j'espère qu'on pourra y retourner un jour ensemble avec l'espoir de gagner la champions League !

Merci à tous ceux qui m'ont permis de passer de supers moments dans ce laboratoire, Alexandra, Laeticia, Emilie D, Rania, Manon, Mathilde, Yona, Lara, Alexane, Mauro, Louciné, Armelle, Emmanuelle, Mathilde, Michel B, Julie R, Nathalie (Merci pour les magnets) et Laurent G. Je pense également à Berna, merci d'avoir été là dans les moments difficiles et j'espère qu'on s'en sortira ! Au pire on pourra toujours vendre du houmous à la betterave, ça cartonne outre-manche ! Je souhaiterais remercier tous les membres de la famille CRCM je pourrais écrire des dizaines de pages sur vous tous donc en un seul mot MERCI !

Comment ne pas remercier mes deux canards favoris **Fred et Adri**, les gars vous m'avez régalé tout au long de ma thèse ! Je suis le dernier du trio infernal à quitter le navire ! je vous rejoins, je serai bientôt Docteur à mon tour ! un docteur pour les gouverner tous et dans la bière les noyer ! Merci les gars pour tout, nos discussions, nos parties de Play endiablées (je regrette même le rire de mouette de Fred !) et surtout pour tous ces moments passés ensemble. Finalement même si vous n'êtes plus au labo et que Fred est à l'autre bout du monde vous êtes toujours là et vous le serez pour toujours ! je terminerai par une citation de notre maître à tous : « coin-coin coiiin ! »

Alexia même si pour toi la farine est une arme de destruction massive l'humour et la bonne humeur ne le sont pas ! Même si j'ai pu être un poil lourd (en atteste certaine de tes expressions) tu as toujours été pour moi le rayon de soleil de ce laboratoire même si quand t'es vénère le soleil ressemble plutôt à un (petit) orage !! Merci pour tous ces moments passés ensemble et pour tous ces fou-rire. Qui aurait cru quand on s'est rencontré à cette fameuse retraite qu'on aurait vécu autant de choses ensemble (Jeff je te vois, ne sois pas jaloux !!!). Surtout ne change jamais, reste égale à toi-même et le monde t'appartiendra ! Je suis fier de te compter parmi mes amies les plus proches et impressionné par le chemin que tu as parcouru. Je te souhaite tout le bonheur du monde à toi et à ta famille Jeff et Chiara. Jeff on en a gros !! Merci d'être un burgonde phosphorescent et péremptoire ! D'ailleurs qu'est-ce qui est petit et marron ? (Normalement tu connais la réponse) j'espère qu'on pourra jouer au cul de chouette en faisant un triple sloubi !!!

Aurélie, la fille à l'accent de Pau (moinsse) pas de pot (haha quel jeu de mots) ! Presque 6 ans qu'on se connait maintenant et tu es toujours aussi géniale ! Nous avons aussi partagé tellement de moments forts ensemble, merci de m'avoir fait confiance, notre amitié est pour moi inestimable. Je me rappellerai toujours nos soirées toujours au top car oui tu sais mettre l'ambiance ! Tu es pour moi un modèle de courage et d'abnégation et je t'admire pour ça et en plus tu es une maman super, que des qualités ! Et maintenant **Olivier** veille sur toi (ou c'est peut-être l'inverse) et je vous souhaite un avenir radieux ! Vous penserez à moi pour boire quelques bières parce que j'ai CHAUD !!!

Analogie cinématographique oblige notre communauté s'est dissoute mais nos souvenirs restent. Je pars le cœur lourd mais la tête remplie de vos souvenirs. Ce n'est qu'un aurevoir et je sais que nos routes se recroiseront toujours car notre amitié est plus forte que la distance !

J'ai une pensée pour ma chtimi préféré **Marion**, sans toi je n'aurais probablement jamais connu le Welsch ! Merci d'avoir été là et de m'avoir fait dormir sur ton canapé, sans toi je n'écrirais peut-être pas ces lignes ! J'espère qu'on retournera skier ensemble et puis on a prévu d'aller voir un canadien bientôt !!!

A mes anciennes camarades de promos, **Sarah, Lise, Julie et Caroline :** survivre au M2 n'est pas une sinécure. Merci à toi **Caro** pour tous ces moments incroyables passés ensemble au black. Le temps passe et te voilà maman je te souhaite tout le bonheur du monde à toi, **Gaël et** la petite **Anaëlle**.

A mes amis de toujours Scott, Alexandre, Cyril, Matthieu et Swan, plus de 10 ans que l'on se connait et que vous me supportez, incroyable !!! Merci de m'avoir écouté me plaindre de ma thèse même si, soyons honnêtes, ce n'était pas toujours très clair ! On a bien changé depuis le lycée enfin sauf pour notre appétit vidéoludique ! Merci d'avoir été présents toutes ces années dans les bons et dans les moins bons moments. Vous allez devoir me supporter pour toujours (je vois une larme sur ta joue Cyril !!). Alex merci d'être toi toujours aussi au taquet et surtout toujours aussi drôle ! Matthieu merci pour tous ces bons moments passés ensemble et surtout cette fameuse partie de mille-bornes ! Scott merci pour toutes ces soirées c'est aussi grâce à toi que je suis moins timide et que je me suis affirmé pour ça je te remercie ! Cyril même si parfois tu ne ris pas je sais que toutes mes blagues sont drôles ! Merci pour toutes ces années mon petit Praguois ! Swan aka Moundir le boulanger, merci de me faire rire peu importe la situation même si parfois tu te fous un peu de ma gueule ! Bravo pour tout ce que tu as accompli et je te souhaite, je vous souhaite le meilleur. J'espère qu'on pourra tous se retrouver bientôt, les années lycée me manquent mais je vois que nous avons tous réussi malgré ce qu'en disaient nos profs !! Merci d'être vous ! A notre amitié !

REMERCIEMENTS

A ma famille qui a fait de moi ce que je suis et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui à écrire ces lignes. A mes oncles et mes tantes Isabelle, Pierre, Sylvie et Jean-Charles merci d'être là au quotidien et aussi de me faire rire surtout Pierre, mon parrain et ses multiples blagues ! A mes cousines Pauline, Marie et Annabelle merci pour tous ces souvenirs d'enfances à S^t Martin à Fuveau et sur la côte d'Azur !! Maintenant vous êtes grandes mais pour moi vous serez toujours mes petites cousines ! Bientôt à votre tour de finir vos études. A mon cousin Fabien, tu es comme un frère pour moi je repense à tous nos moments passés ensemble tellement de souvenirs ! Le temps a passé depuis nos (innombrables) bêtises maintenant nous voilà grands et matures (enfin presque !). A mes trois sœurs d'amour Isabelle, Christelle et Stéphanie merci de m'avoir gardé pendant mon enfance, le magnétoscope s'en rappelle encore !! Grace à vous j'ai passé une enfance géniale, merci pour tout ! Merci également à Nicolas de m'aider pour les vélos, pour le bricolage (je suis un inadapté de la bricole !!) merci pour tous ces bons moments ! A Mathilde, Nina, Louise et mon filleul Victor la nouvelle génération ! Merci pour toute la joie et la bonne humeur que vous avez ramené dans la famille (même si parfois vous êtes infernaux !!!). Grâce à vous je suis devenu plus mature et je suis fier d'être votre oncle ! Enfin merci à ceux sans qui je ne serais pas là à écrire cette thèse mes parents ! Même si je vous en ai fait voir de toutes les couleurs, vous m'avez toujours soutenu tout au long de ma vie ! Merci de m'avoir donné l'enfance que j'ai eue, si j'en suis là c'est essentiellement grâce à vous ! J'ai aussi une pensée pour mes grands- parents qui me regardent de là-haut et qui j'espère sont fiers de moi ! A toute ma famille je vous aime !

Giulia, mon amour, j'aurais aimé écrire ce paragraphe en italien mais bon avec google trad il y aurait eu des fautes... Promis cet été j'apprends l'italien ! Tu es la raison pour laquelle je ne regretterai jamais d'avoir choisi de faire une thèse car je ne t'aurais jamais connu autrement. Comment oublier la première fois où je t'ai vue au labo, je crois que je suis de suite tombé amoureux de toi et le destin à rempli son rôle. Qui aurait cru après cette soirée à Callelongue que nous allions vivre une telle aventure ! Tu es une femme courageuse et pleine de ressources et d'ailleurs heureusement que tu as fait le premier pas (la fameuse lettre). Merci de m'avoir rendu meilleur, grâce à toi je suis devenu un homme (même si parfois j'ai des résurgences infantiles). Merci d'être là dans les bons et les mauvais moments, même si parfois (voire souvent) je t'exaspère (surtout avec le ménage et mes chaussettes qui traînent) Je n'aurais pas réussi ma thèse sans toi et ma vie serait fade car tu en es le soleil ! Tu es la femme de ma vie et bientôt tu le seras officiellement (enfin si tu dis oui) ! Je vois notre avenir, toi moi et nos enfants. Je t'aime à jamais et nous continuerons à vivre l'aventure de nos vies ensemble et pour toujours !

TABLE DES MATIERES

AFFIDAVIT	1
RESUME	2
ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	- 13
LISTE DES ABREVIATIONS	- 17
LISTE DES FIGURES	- 21
LISTE DES TABLES	- 22
	- 23
	20
Chapitre 1 L'hematopolese normale	· 23
De la cellule souche hemalopoletique aux elements ligures du sang	· 23
Definition et historique de la souche nematopoletique	· 23
2 Les modeles de differenciation nematopoletique	· 25
A Le modèle LMPP/MPP :	· 27
C Le modèle ce bypass-myeloide	· 20
C Le modèle continu :	20 20
1 CSH chez la Souris	- 30
2 CSH chez l'Homme	- 32
III le maintien des cellules souches hématopoïétiques	- 34
1 Le concept de niche bématopoïétique	- 34
A La niche endostéale	- 35
B La niche vasculaire	- 35
2 La dynamique de migration des CSHs vers et en dehors de la moelle	00
	- 36
3 Facteurs extrinsèques et maintien des cellules souches hématopoïétiq	ues
38	
A Les molécules d'adhérence	- 38
a Les intégrines	- 38
b Les cadhérines	- 40
c Les molécules de la superfamille des immunoglobulines	- 41
d La famille des JAMs	- 42
B Les facteurs solubles	- 43
a L'axe CXCR4/CXCL12	- 43
b L'axe c-kit/SCF	- 44
c L'axe Tie2/Angiopoietin1	- 44

4	1	La protéine JAM-C dans et au-delà ses fonctions hématopoïétiques	45
Į	5	Facteurs intrinsèques et maintien des cellules souches hématopoïétiqu	es
		48	
	A	Les facteurs de transcription	48
		a La famille GATA :	49
		b La famille Hox :	49
		c La famille Runx :	49
	В	Le rythme circadien	50
IV	A	pport des modèles souris à l'étude de l'hématopoïèse	51
-	1	Prélude sur les Knock-Out	51
	2	Les modèles murins pour l'étude de l'hématopoïèse	52
	A	Le modèle Mx1 Cre	53
	В	Le modèle Vav Cre	54
	С	Le modèle CSH-SCL-Cre-ERT	54
	D	Le modèle Tie2 Cre	55
	Ε	Le modèle Col1α1-Cre	55
:	3	Adhésion et hématopoïèse : leçons des Knock-Out	55
	A	Les selectines	55
	В	Les intégrines	56
	С	Les cadhérines	56
	D	Les molécules de la superfamille des immunoglobulines	56
Chap	oitro	e 2 L'hématopoïèse pathologique	58
Ι	L	es Hémopathies myéloïdes	58
-	1	Généralités	58
2	2	Leucémies Aigues myéloïdes (LAM)	58
	Α	Diagnostic, facteurs de risques, incidence et survie	59
	В	Outils de diagnostic et stratification des patients	62
	С	Les mutations associées à la LAM	64
	D	Les oncogènes dans la LAM	67
		a Les fusions MLL :	68
		b C-myc :	69
		c Mecom/EVI1 :	70
	Е	Traitements	70
		a Les traitements historiques de la LAM	70
		b Les traitements ciblés de nouvelle génération	71
	F	Les LAMs secondaires	74
(3	Les néoplasmes myéloprolifératifs	75
4	1	Les syndromes myélodysplasiques	76
П	L	es modèles souris pour comprendre et étudier la LAM	77
-	1	La souris comme modèle d'étude de la LAM	77
	А	Les techniques historiques	78
	В	Les souris transgéniques	80

	2	Le modèle iMLL-AF9	84
	III	L'Hématopoïèse clonale, un état pré-leucémique ?	86
	1	Le concept de l'hématopoïèse clonale liée à l'âge (ARCH)	86
	2	A l'origine de la leucémogénèse	88
C	hani	tre 3 La cellule souche leucómique et l'initiation de la leucómie	۹N
		La cellule souche leucémique	30
	П	La cellule souche leucémique: une entité phénotypique à part entière?	01
	1	Las CSLs dans la LAM	01
	י 2	Les CSLs dans la LAM	02
	2	Mesure de l'activité des CSLs	92
		Les mécanismes d'adhésions des CSLs à la moelle osseuse	94
		Les medamismes d'adriesions des CSLS à la moeile osseuse.	90
	ו ס		90
	2		97
	د ۸		90
	4		
	5 6		
	07		102
	/ N/	Les lacieurs solubles	104
	1V -1	Epissage et initiation leucemique	105
	ו ס	L'énigence alternatif	
	2		
	3	Le ciblege théreneutique de l'éniceage	109
	4	Le ciblage merapeutique de l'epissage	112
OB	JEC	TIFS DE THESE1	13
RE	SUL	TATS	116
^	DTIC	NE1, CRACREE la Diananachla far Normal Hamatanaiacia hut	
4 N		CLE 1: GRASP55 IS Dispensable for Normal Hematopolesis but	116
N	ieces	ssary for myc-Dependent Leukennic Growth	110
A	RTIC	CLE 2 : JAM-C intracellular domain interacts with spliceosome and	
а	Iters	transcriptional networks in Acute Myeloid Leukemia initiating cells.	17
DIS	cus	SION	118
		Les fonctions moléculaires de JAM-C dans l'initiation leucémique	118
	1	JAM-C est associé à l'activité souche dans la LAM.	118
	2	Le clivage de JAM-C ^{ICD} en tant que régulateur de l'activité du	
	SI		119
	3	Les mécanismes d'adhésion JAM-C dépendant dans l'initiation	
	le	ucémique	121
	4	Le clivage du domaine intracellulaire de JAM-C : un nouveau mécanism	ne
		AM-C-dépendant ?	24
	J <i>i</i> II	AM-C-dépendant ?	24 27
	J/ II 1	AM-C-dépendant ? L'épissage alternatif, une nouvelle caractéristique de la CSL de LAM ? L'épissage alternatif est une valeur pronostique dans la LAM	24 27 27
	J/ II 1 2	AM-C-dépendant ? L'épissage alternatif, une nouvelle caractéristique de la CSL de LAM ? L'épissage alternatif est une valeur pronostique dans la LAM L'épissage alternatif est-il associé à un état pré-leucémique ?	24 27 27 28

II	La place des CSLs et des signatures pronostiques dans la pratique clinique 129
CONC	LUSION132
BIBLI	OGRAPHIE133
ANNE	XES168
AR ⁻ Line	FICLE ANNEXE 1: Circadian Expression of Migratory Factors Establishes eage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to

Tissues ------168 ARTICLE ANNEXE 2: Flow cytometry analysis of mouse hematopoietic stem and multipotent progenitor cells ------169

LISTE DES ABREVIATIONS

2-HG : D-2-Hydroxyglutarate ADAM : Disintegrin and metalloproteinase domain-containing APP : Amyloid-beta precursor protein ARCH : Hématopoïèse clonale liée à l'âge AREB : Anémie réfractaire avec excès de blastes ASXL1 : Polycomb group protein ASXL1 **AVC** : Accident vasculaire cérébral BACE-2 : Beta-secretase 2 **BCL-2** : Apoptosis regulator Bcl-2 BMAL1 : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 **BP** : Point de branchement **CALR** : Calreticulin CCL3 : C-C motif chemokine 3 **CFU-S** : Colony Forming Unit – Spleen Chr : Chromosome CLP : Progéniteur lymphoïde commun **CMF** : Cytométrie en flux CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité CMP : Progéniteur myéloïde commun CS : Cellule de Schwann CSH : Cellule souche hématopoïétique **CSL** : Cellule souche leucémique CSNK1e : Casein kinase I isoform epsilon CXCL12/SDF-1 : Stroma derived factor 1 **CXCR4** : C-X-C chemokine receptor type 4 **DLA** : Dilution limite DNMT3A : DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A DOT1L : Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific **DOX** : Doxycycline DSA : Analyse d'épissage différentielle ECp : Progéniteurs endothéliaux EFS : Survie sans évènements **ELN** : European Leukemia Net **EMT** : Transition épithélio-mésenchymateuse **EPCR** : Endothelial protein C receptor ERT2 : Tamoxifen-inducible estrogen receptor **ES** : Cellules souches embryonnaires ESAM : Endothelial cell-selective adhesion molecule **ESE** : Séquences exoniques activatrices **ESS** : Séquences exoniques répressives **EVI1** : Histone-lysine N-methyltransferase MECOM EZH2 : Histone-lysine N-methyltransferase EZH2 FAB : Système franco-américano-britannique FDA : Food and drug administration FISH : L'hybridation in situ en fluorescence FLT3 : Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3

FOS : Proto-oncogene c-Fos **GAGs** : Glycosaminoglycanes **GATA**: Transcription factor GATA **G-CSF** : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes GMP : Progéniteurs granulocytes macrophages GO: Gemtuzumab ozogamicine GPR56 : Adhesion G-protein coupled receptor G1 **GRASP55** : Golgi reassembly-stacking protein 2 **GSK3β** : Glycogen synthase kinase-3 beta HA: Acide hyaluronique HCT : Greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques HnRNP : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein HOX : Homeobox protein HPC : Cellule souche et progéniteur hématopoïétique **ICAM** : Intercellular adhesion molecule **ICD** : Domaine intra-cellulaire **IDH1/2** : Isocitrate dehydrogenase ¹/₂ **IFN** : Interféron Iq SF CAMs : Molécule d'adhésions de la superfamille des immunoglobulines IgH : Chaine lourde des immunoglobulines **ISE** : Séquences introniques activatrices **ISS** : Séquences introniques répressives **IT**GA6 : Intégrine α6 JAK2 : Tyrosine-protein kinase JAK2 JAM-4 : Junctional adhesion molecule 4 JAM-A : Junctional adhesion molecule A JAM-B : Junctional adhesion molecule B JAM-C : Junctional adhesion molecule C JAM-L : Junctional adhesion molecule-like JUN : Transcription factor AP-1 LAL : Leucémie aigüe lymphoblastique LAM : Leucémie aigüe myéloïde LMC : Leucémie myéloïde chronique LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique LMPP : Lymphoid primed MPP LSK : Compartiment Lin⁻ Sca⁺ c-kit⁺ Lt-CSH : Long-term CSH **MBNL** : Muscleblind-like protein **MEP**: Progéniteurs mégacaryocytes/érythrocytes MLL : Mixed lignage leukemia **MP** : Myélofibrose primitive **MPL** : Thrombopoietin receptor **MPP** : Progéniteur multipotents MRD : Maladie résiduelle minimale MultiRP : Repopulating progenitor multiple **MuLV** : Murine leukemia viruses **MUPP1** : Multiple PDZ domain protein MyRP : Repopulating progenitors restraint myéloïde MySC : CSH restreinte myéloïde **NFS** : Numération formule sanguine

NGS : Séquençage à haut débit de nouvelle génération NICD : Domaine intracellulaire de NOTCH NK : Cellule natural killer **NMD** : Non sense mediated decay **NMP** : Néoplasmes myéloprolifératifs NOVA-1 : Neuro-oncological ventral antigen 1 **NPM1**: Nucleophosmin OMS : Organisation mondiale de la santé **OPN** : Osteopontine **OS** : Survie globale PAR3 : Partitioning defective 3 homolog PDZ : PSD-95 Dlg ZO-1 **PECAM** : Platelet endothelial cell adhesion molecule **PER** : Period circadian protein homolog PI3k : Phosphoinositide 3-kinase **Poly I:C** : Acide polyinosinique-polycytidylique **PRMT5**: Protein arginine N-methyltransferase 5 **PSGL-1**: P-selectin glycoprotein ligand 1 PSS : Cellule stromale péri-sinusoïdale **PTH** : Hormone parathyroïdienne PTPRC/CD45 : Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C **PV** : Polyglobulie de Vaguez RBM39 : RNA-binding protein 39 RC : Rémission complète RFS : Survie sans rechute **RI**: Rayonnement ionisants rPTH : Récepteur de l'hormone parathyroïdienne rtTA : Reverse tetracycline transactivator SCF : Stem cell factor SCL : Stem cell leukemia SETD1A : Histone-lysine N-methyltransferase SETD1A SF3B1 : Splicing factor 3B subunit 1 SFPI1 : Transcription factor PU.1 shRNA : Small hairpin RNA sLAM : LAM secondaire **SMD** : Syndrome myélodysplasique **SNC** : Noyau suprachiasmatique **SNO**: Spindle-shaped Ncadherin⁺ CD45⁻ osteoblastic cells SnRNP : Small nuclear ribonucleoprotein SPF : Santé publique France SR : Serin rich protein St-CSH : Short-term CSH **TCGA** : The Cancer Genome Atlas Program **TE** : Thrombocytose essentielle **TET** : Tétracycline **TET2** : Methylcytosine dioxygenase TET2 TMEM27 : Transmembrane protein 27 **TNF**α : Tumor Necrosis Factor α **TRE** : Tetracycline responsive element tTA : Tetracycline transactivator

 $\begin{array}{l} \textbf{U2AF}: Splicing \ factor \ U2AF\\ \textbf{VCAM}: Vascular \ cell \ adhesion \ protein\\ \textbf{ZO-1}: Tight \ junction \ protein \ ZO-1\\ \textbf{\alpha KG}: \ \alpha\text{-cétoglutarate} \end{array}$

LISTE DES FIGURES

Figure 1 l'Hématopoïèse de Pappenheim (1905)	24
Figure 2 Schéma classique de l'hématopoïèse normale :	26
Figure 3 Les potentiels de lignages différentiels des CSHs :	27
Figure 4 Le modèle de différenciation MPP4/LMPP :	28
Figure 5 Le modèle de bypass myéloïde :	29
Figure 6 Le modèle de différenciation continue :	30
Figure 7 Stratégie de fenêtrage des CSHs et des progéniteurs murins (Grenier et al. 2021)	32
Figure 8 La diapédèse leucocytaire :	37
Figure 9 Les intégrines :	39
Figure 10 Les CSHs dans leur niche :	40
Figure 11 La famille des JAMs :	43
Figure 12 Les facteurs solubles impliqués dans le maintien des CSHs dans la moelle osseu	se :
	45
Figure 13 Le système Cre LoxP :	53
Figure 14 Fréquence des mutations somatiques observées dans la LAM comparée aux au cancers :	tres 66
Figure 15 Les principales mutations dans la LAM.	67
Figure 16 Les traitements anti-leucémiques de nouvelle génération	74
Figure 17 Représentation schématique de la translocation conduisant au gène de fusion B	CR-
ABL.	76
Figure 18 Les méthodes pour générer des modèles murins de LAM.	81
Figure 19 le système inductible TET.	83
Figure 20 le modèle de fusion interchromosomique MLL-AF9.	85
Figure 21 Le modèle iMLL-AF9.	86
Figure 22 L'hématopoïèse clonale liée à l'âge (ARCH)	87
Figure 23 Evolution de l'ARCH à la LAM	89
Figure 24 modèle d'évolution de la LMC en sLAM	92
Figure 25 Les modèles d'évolution de la SMD vers la sLAM.	94
Figure 26 les CSLs dans les niches de la moelle osseuse.	96
Figure 27 représentation schématique des isoformes de CD44	97
Figure 28 fonctions moléculaires des intégrines dans les CSLs.	99
Figure 29 mécanismes moléculaires induits par l'interaction entre les CSLs et l'E-selectine.	101
Figure 30 Fonctions moléculaires de CD98 dans les CSLs.	102
Figure 31 Fonctions moléculaires de JAM-C dans les CSLs	103
Figure 32 Représentation schématique des différentes étapes de l'épissage	107
Figure 33 L'épissage alternatif et sa régulation	109
Figure 34 Mécanismes moléculaires induit par l'épissage alternatif impliqués dans la survie	ə, la
quiescence, la prolifération et la transformation des CSLs	111
Figure 35 Résultats préliminaires	114
Figure 36 nouveau modèle hypothétique de signalisation par JAM-C dans les CSLs	121
Figure 37 Le site de clivage potentiel de JAM-C par BACE-2	125

LISTE DES TABLES

Tableau 1 récapitulatif des marqueurs souches hématopoïétiques humain et murin34
Tableau 2 Classification des LAM d'après la FAB
Tableau 3 Classification des LAM d'après l'OMS en 201661
Tableau 4 Classification ELN2017 des LAM selon leurs anomalies génétiques64
Tableau 5 Voies de signalisation les plus fréquemment mutées dans la LAM avec la
fréquence d'occurrence et les gènes impliqués66
Tableau 6 les principaux réarrangement MLL dans la LAM69
Tableau 7 Classification des SMD/NMP et SMD d'après l'OMS en 201677
Tableau 8 les modèles de souris leucémiques radio-induits
Tableau 9 les modèles transgéniques de souris leucémiques82
Tableau 10 les marqueurs des cellules souches leucémiques91
Tableau 11 Liste des essais cliniques ciblant les mécanismes adhésifs dans la LAM

INTRODUCTION

Chapitre 1 L'hématopoïèse normale

I De la cellule souche hématopoïétique aux éléments figurés du sang

1 Définition et historique de la souche hématopoïétique

L'hématopoïèse est le processus physiologique conduisant à la formation de tous les éléments figurés du sang tout au long de la vie. L'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse des mammifères adultes et consiste en la différenciation et l'expansion des éléments figurés à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH s'engagent dans des voies de différenciation soit vers le bras myéloïde, soit vers le bras lymphoïde. L'engagement vers ces voies de différenciation est très finement régulé par des signaux intrinsègues et extrinsègues contrôlant le devenir des CSH. J'aborderai ces concepts ultérieurement dans mon introduction. Sous l'influence d'un stress myéloablatif (infection, radiation etc...) l'hématopoïèse est délocalisée vers des sites extra-médullaires que sont le foie et la rate (Kim 2010). Toutefois je n'aborderai pas ces concepts dans mon manuscrit de thèse. Par définition, une cellule souche est une cellule indifférenciée capable d'auto-renouvellement pouvant se différencier en un ou plusieurs types cellulaires. On distingue les cellules souches totipotentes capables de former un organisme complet, les cellules pluripotentes capables de se différencier en plusieurs types cellulaires (environ 200) représentatifs de tous les organes, les cellules multipotentes, dont font partie les CSH capables de former tous les types cellulaires du tissu auquel elles appartiennent et enfin les cellules unipotentes capables de ne fournir qu'un seul type cellulaire. Historiquement, la première mention des CSH remonte à la fin du 19^{ème} siècle avec les travaux de Neumann. Il proposait que la moelle osseuse représente l'organe à l'origine des cellules sanguines et que tout démarre à partir d'une cellule unique. Cette théorie, largement discutée à l'époque trouva un écho avec Arthur Pappeinheim qui, grâce à des études morphologiques sur des cellules sanguines (coloration de Pappenheim), schématisa pour la première fois l'hématopoïèse démarrant d'une cellule souche unique (Figure 1). Il faudra attendre la fin de la seconde guerre mondiale et une étude parue dans la revue Nature pour voir la première démonstration fonctionnelle de l'existence des CSH chez la souris.

INTRODUCTION

Les auteurs de cette étude montraient qu'une insuffisance médullaire causée par l'irradiation pouvait être « traitée » grâce à l'injection d'une suspension cellulaire obtenue à partir de la rate de donneurs sains (Ford et al. 1956). Cette étude a permis en 1961 à Till et McCulloch de mettre au point une technique pour quantifier le pouvoir clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques. Ces auteurs considérés comme « les pères de la science des cellules souches » ont montré que la clonogénicité des progéniteurs hématopoïétiques pouvait être mesurée par leur capacité à former des colonies dans la rate (CFU-S) (Till and McCulloch 1961). Cette étude marqua un tournant dans l'étude des CSH et de leur purification. C'est ainsi qu'en 1986 l'équipe de I.Weissman fut la première à caractériser des CSH murines en combinant des expériences de dilutions limites et de CFU-S (Muller-Sieburg, Whitlock, and Weissman 1986).



Figure 1 l'Hématopoïèse de Pappenheim (1905).

La cellule centrale est le progéniteur hypothétique de tous les éléments figurés du sang. Elle est à l'origine d'une branche "myéloleucoplastique" (à gauche), d'une branche "érythroplastique" à droite d'une branche "lymphoplastique" (milieu haut) et d'une branche "splénoplastique" (milieu bas). (Staatsbibliothek zu Berlin, Signatur: 400Kv 1955.)

2 Les modèles de différenciation hématopoïétique

L'hématopoïèse est un processus cellulaire hiérarchisé au sommet duquel les CSH se situent. Pendant plusieurs décennies, les CSHs ont été représentées au sommet de « l'arbre hématopoïétique » capables de se diviser en progéniteurs qui eux même se divisent en deux branches : la branche lymphoïde et la branche myéloïde (Till and McCulloch 1980). Cette vision dichotomique de l'hématopoïèse a été largement diffusée grâce notamment aux travaux de I.Weissman qui identifia les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) et les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) (Akashi et al. 2000; Kondo, Weissman, and Akashi 1997). Dans ce modèle historique, les CSH sont divisées en long-term CSH (lt-CSH) et short-term CSH (st-CSH) qui se différencient par leur capacité de reconstitution hématopoïétique. Les lt-CSHs sont des cellules ultra quiescentes avant des propriétés de repopulation médullaire à long terme (supérieure à 3 mois) alors que les st-CSHs sont disponibles immédiatement pour la différenciation et ont une capacité de repopulation médullaire à court terme (8-12 semaines). Les It-CSHs se différencient en st-CSHs qui se différencient en progéniteurs multipotents (MPP). Les MPP ne possèdent plus de capacité d'autorenouvellement et se différencient soit en CMP soit en CLP. La seconde bifurcation se fait au niveau des CMP qui peuvent se différencier en progéniteurs granulocytes macrophages (GMP) ou en progéniteurs mégacaryocytes/érythrocytes (MEP). Les CLP se différencient en cellules B, T, NK et dendritiques tandis que les GMP se différencient en granulocytes/monocytes et les MEP en mégacaryocytes et érythrocytes. (Kondo, Weissman, and Akashi 1997; Cheng, Zheng, and Cheng 2020) (Figure 2)

INTRODUCTION



Figure 2 Schéma classique de l'hématopoïèse normale :

CSH: Cellules souches hématopoïétiques; MPP: Progéniteurs multipotents; CMP: Progéniteurs myéloïdes communs; CLP: progéniteurs lymphoïdes communs; MEP: progéniteurs mégacaryocytes/érythrocytes; GMP: progéniteurs granulocytes macrophages; NK: Cellules Natural Killer; Ly: Lymphocytes

Toutefois ce modèle de différenciation hématopoïétique vole en éclat au début des années 2000 avec la découverte des potentiels de lignages différentiels appelés biais myéloïdes ou biais lymphoïdes. Plusieurs études suggèrent que le devenir des CSHs n'est pas aléatoire mais que leur destin cellulaire est prédéfini. En ce sens, les travaux de Muller-Sieburg et de Eaves ont démontré l'existence de CSHs biaisées myéloïdes (cellule α), biaisées lymphoïdes (cellules γ/δ) et balancées (cellules β) (Müller-Sieburg et al. 2002; Dykstra et al. 2007). Ces observations ont ouvert la voie à la description de différents modèles de différenciation hématopoïétique (**Figure 3**).



Figure 3 Les potentiels de lignages différentiels des CSHs :

A: Par des approches de transplantation clonale, les auteurs ont démontré que les CSHs ont un potentiel de lignage différent. La transplantation d'un clone dans une souris ne produisait pas un chimérisme homogène entre la lignée lymphoïde et myéloïde suggérant que le clone transplanté a un potentiel de reconstitution non-balancé. MyBi= Biaisé myéloïde ; LyBi = Biaisé lymphoïde. **B**: Par des approches de transplantation en cellule unique, les auteurs ont décrit 4 profils différents de reconstitution hématopoïétique chez les souris nommés α , β , γ et δ .

A Le modèle LMPP/MPP :

Dans ce modèle, les auteurs ont identifié un progéniteur biaisé lymphoïde (Lymphoid primed MPP) capable de se différencier en cellules B et T mais n'ayant pas la capacité de générer des mégacaryocytes et des érythrocytes. Les auteurs proposent que les lt-CSH se différencient en st-CSH qui se différencient en CMP ou en LMPPs. Les LMPPs peuvent elles se différencier en CLP ou en GMP (Adolfsson et al. 2005). Ce modèle a été raffiné par les travaux de Wilson et de Pietras qui identifient plusieurs MPPs (1-4). Dans ce modèle les LMPPs sont remplacés par les MPP4, alors que les MPP2 sont des progéniteurs mégacaryocytes et les MPP3 sont des progéniteurs GMPs (Pietras et al. 2015 ; Wilson et al. 2008) **(Figure 4)**



Figure 4 Le modèle de différenciation MPP4/LMPP :

CSH : Cellules souches hématopoïétiques ; MPP : Progéniteurs multipotents ; LMPP : lymphoid primed MPP ; CLP : progéniteurs lymphoïdes communs ; MEP : progéniteurs mégacaryocytes/érythrocytes ; GMP : progéniteurs granulocytes macrophages. Adapté de Pietras 2015.

B Le modèle de bypass-myeloïde :

Dans ce modèle, il est suggéré que la branche myéloïde provient directement des CSHs qui se différencient soit en st-CSH soit en rCMP. Les rCMP ont à la différence des CMPs « classiques » une capacité de repopulation. Les st-CSHs se différencient en progéniteurs lymphoïdes (B et T) (Ema, Morita, and Suda 2014). Ce modèle a été raffiné en 2018. Ainsi, les CSHs peuvent être multi potentes ou restreintes myéloïdes via la voie du bypass myéloïde (MySC). Les CSHs peuvent ainsi se diviser en multiRP (repopulating progenitors multiples) ou myRP (repopulating progenitors restreins myéloïdes). Les multiRP se différencient en MPP donnant le versant lymphoïde tandis que les myRP donnent le versant myéloïde (Yamamoto, Wilkinson, and Nakauchi 2018) **(Figure 5).**



Figure 5 Le modèle de bypass myéloïde :

CSH : Cellules souches hématopoïétiques ; MySC : restreintes myéloïdes ; MyRP : repopulating progenitors restreins myéloïdes, MultiRP : repopulating progenitors multiples MPP : Progéniteurs multipotents ; LMPP : lymphoid primed MPP ; CLP : progéniteurs lymphoïdes communs ; MEP : progéniteurs mégacaryocytes/érythrocytes ; GMP : progéniteurs granulocytes macrophages. Adapté de Yamamoto, 2018

C Le modèle continu :

Jusqu'à présent les différents modèles de différenciation hématopoïétique sont représentés tels des arbres où les CSHs acquièrent des biais de lignage étape par étape. Tous ces modèles ont été définis grâce au phénotypage des différentes fractions cellulaires par cytométrie en flux. Toutefois ces approches ne permettent d'observer que des sous-populations prédéfinies par l'utilisation d'un nombre limité de marqueurs. Ainsi, ces techniques peuvent produire une fausse impression d'apparente homogénéité des populations cellulaires alors que ce n'est pas le cas. L'évolution des techniques et des méthodologies a rendu possible l'étude des CSHs et des progéniteurs à l'échelle de la cellule unique par séquençage d'ARN en cellule unique (scRNAseq) (Povinelli, Rodriguez-Meira, and Mead 2018). Dans une étude de référence, l'équipe de Ido Amit a mis en évidence l'hétérogénéité du compartiment CMP (Paul et al. 2015). Ce travail a été suivi par d'autres qui ont permis de démontrer que les CSHs sont sous le contrôle de programmes biologiques présentant une certaine plasticité et régulant le caractère souche. Grâce à ces approches il a été

montré que l'hématopoïèse n'est pas un processus se déroulant en plusieurs étapes mais est mieux représenté par un modèle de différenciation continue.(Velten et al. 2017) **(Figure 6)**



Figure 6 Le modèle de différenciation continue :

Ce modèle montre que l'hématopoïèse n'est pas un processus à étapes. Les CSHs et les MPP sont plastiques et les biais de lignages s'acquièrent loin dans la différenciation. CSH : Cellule souche hématopoïétique ; MPP : progéniteur multipotent ; Meg : Mégacaryocyte. Adapté de Cheng 2020

Il Caractérisation phénotypique des cellules souches hématopoïétiques

1 CSH chez la Souris

L'avènement dans les années 80 de la cytométrie en flux et des anticorps monoclonaux a permis de franchir un cap majeur dans la découverte de marqueurs phénotypiques exclusifs des CSHs dans le but de les purifier. En 1986, il a été démontré que les CSHs expriment faiblement Thy1 et n'expriment pas les marqueurs granulocytaires, monocytaires et des cellules B et T (Lignage négatif ou Lin-) (Muller-Sieburg, Whitlock, and Weissman 1986). Deux ans plus tard, GJ Sprangrude ajoute le marqueur Sca1 pour purifier les cellules Thy1lo/Lin-/Sca1+ possédant une activité souche capable de reconstituer les lignages myéloïdes, érythroïdes et lymphoïdes

(Spangrude, Heimfeld, and Weissman 1988). En 1994, S.Morisson établit que l'activité de reconstitution multi-lignage à long terme est située dans le compartiment Lin-/Thy1lo/Sca1+/cKit+ donnant naissance au compartiment LSK (Morrison and Weissman 1994) (Figure 7). Dans le même temps Osawa rapporte que les CSHs sont CD34- (Osawa et al. 1996). À la suite de ces travaux il a été montré que les cellules Flt3+ (Flk2 ou CD135) comprises dans le compartiment LSK présentent une perte d'activité d'auto-renouvellement et sont biaisées lymphoïdes suggérant que ces cellules sont des progéniteurs plus matures que les cellules Flt3- (Adolfsson et al. 2005; Sitnicka et al. 2002). Ces données ont été confirmées par une étude prouvant que les CSHs Flt3- permettent une reconstitution multi-lignage à long terme (plus de 16 semaines) dans des récipients irradiés contrairement aux CSHs Flt3+ (Christensen and Weissman 2001). L'utilisation des marqueurs de la famille des SLAM au début des années 2000 a permis de distinguer les CSHs des progéniteurs multipotents (MPP) qui sont retrouvés respectivement dans le compartiment LSK "CD150+/CD48-/CD244-" et le compartiment "CD150-/CD48-/CD244+" (Kiel et al. 2005). Dès lors, de nombreux autres marqueurs ont été décrits pour raffiner la classification des CSHs et des MPPs tels que les protéines de la famille des JAMs, ESAM ou EPCR (Nagamatsu et al. 2006; Sugano et al. 2008; Praetor et al. 2009; Yokota et al. 2009; Kent et al. 2009). Etant donné le nombre de marqueurs disponibles au milieu des années 2000, il a été possible pour la première fois de recréer le modèle de différenciation hématopoïétique chez la souris à partir des cellules souches les plus dormantes jusqu'au différentes sous-catégories de MPPs. L'utilisation du margueur CD34 permet de distinguer les CSHs plus dormantes (CD34-) des MPP1 (CD34+) disponibles pour la différenciation. Dorénavant on distingue les CSHs (CD34- CD150+ CD48- CD135-), MPP1 (CD34+ CD150+ CD48- CD135-), MPP2 (CD34+ CD48- CD150+ CD135-), MPP3 (CD34+ CD48+ CD150- CD135-) et MPP4 (CD34+ CD48+ CD150- CD135+) (Wilson et al. 2008). En 2015, le groupe de E. Passegue a remis de l'ordre dans le domaine de la caractérisation des CSHs murines en supprimant l'utilisation du CD34 (tout en confirmant son expression sur les CSHs) et en regroupant les MPP1 et CSHs de Wilson en long-term CSH (CD150+ CD48- CD135-), en ré-introduisant le compartiment des short-term CSH (CD150- CD48- CD135-) tout en gardant les MPP2 (CD48- CD150+ CD135-), MPP3 (CD48+ CD150- CD135-) et MPP4 (CD48+ CD150-CD135+) (Pietras et al. 2015) (Tableau 1) (Figure 7).



Figure 7 Stratégie de fenêtrage des CSHs et des progéniteurs murins (Grenier et al. 2021).

2 CSH chez l'Homme

Les premières approches pour l'étude des CSHs humaines furent conduites in vitro sur des lignées cellulaires ou du sang de cordon. De la même façon que pour la souris, l'activité souche d'une cellule peut être mesurée par sa capacité à former des colonies en culture. Ainsi en 1986 le groupe de I. Bernstein identifie la molécule CD34 (l'antigène 12-8) comme marqueur des CSHs (Andrews, Singer, and Bernstein 1986). L'élaboration en 1988 du modèle de souris huSCIDs par le groupe de I. Weissmann a permis de franchir un cap dans l'étude des CSHs humaines. En effet ces souris immunodéficientes sont capables de supporter partiellement l'hématopoïèse humaine
(McCune et al. 1988). Dès lors, en 1992, par des approches de dilution limite il a été démontré que les CSH sont retrouvées dans le compartiment Lin-/Thy1+/CD34+. A l'instar de la souris, le compartiment lin- correspond à l'exclusion des lymphocytes B et T, des monocytes, des granulocytes et des macrophages (Baum et al. 1992). Peu de temps après cette étude le groupe de J.Dick démontre que le compartiment Lin-/CD34+ contient des CSHs ainsi que des progéniteurs engagés. Basé sur l'expression du marqueur CD38, le compartiment Lin-/CD34+/CD38- est plus enrichi en CSHs (Bhatia et al. 1997). Par ailleurs, des essais cliniques conduits au début des années 2000 avec des transplantations autologues ont confirmé la capacité de greffe à long terme du compartiment Thy1+/CD34+/CD38- (Negrin et al. 2000; Vose et al. 2001; Michallet et al. 2000). Les applications possibles de l'utilisation des CSHs en médecine régénérative a conduit les chercheurs à poursuivre leurs travaux dans le but de purifier au maximum les CSHs. En 2007 le groupe de I. Weismann identifie le compartiment CD45RA-/Thy1+/CD34+/CD38- comme enrichi en CSHs, alors que le compartiment CD45RA-/Thy1-/CD34+/CD38- contient plutôt des progéniteurs multipotents (Majeti, Park, and Weissman 2007). Néanmoins, une étude du groupe de J.Dick en 2011 confirme que les CSHs sont enrichies dans le compartiment Thy1+, mais également présentes dans le compartiment Thy1-. Ces résultats suggèrent donc que l'expression seule de Thy1 n'est pas suffisante pour purifier totalement les CSHs. Il apparaît en réalité que la chaine intégrine α6 (CD49f ou ITGA6) est un marqueur spécifique des CSHs humaines les distinguant des progéniteurs multipotents (Notta et al. 2011). En 2016, le groupe de J.Dick sort un papier de référence raffinant toutes les connaissances obtenues sur la caractérisation des CSHs et des progéniteurs. Les CSHs sont définies comme CD34+/CD38-/CD45RA-/Thy1+/CD49f+ tandis que les MPPs sont CD34+/CD38-/CD45RA-/Thy1-/CD49f-. Les progéniteurs sont eux enrichis dans le compartiment CD34+/CD38+, on distingue ainsi les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) CD7-/CD10-/FLT3+/CD45RA-, les progéniteurs macrophages granulocytes (GMP) CD7-/CD10-/FLT3+/CD45RA+/CD19- et les progéniteurs mégacaryocytes érythroïdes (MEP) CD7-/CD10-/FLT3-/CD45RA-. La réelle nouveauté de cette étude réside dans l'utilisation du marqueur BAH-1 et CD71 et la découverte d'une hétérogénéité au sein des MPPs et des progéniteurs CD34+/CD38+. Ces fractions sont nommées F1 (BAH-1-/CD71-), F2 (BAH-1+/CD71-) et F3 (BAH-1+/CD71+). Par des approches en cellule unique les auteurs ont découvert que ces sous fractions possèdent des propriétés de lignage spécifique. Prises ensembles ces données ont permis de repenser le schéma classique de l'arbre hématopoïétique humain (Notta et al. 2016) (Tableau 1).

Homme		Souris	
Population	Phénotype	Population	Phénotype
CSH	CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁻ Thy1 ⁺ CD49f ⁺	CSH-lt	Lin ⁻ Sca ⁺ c-kit ⁺ CD150 ⁺ CD48 ⁻ CD135 ⁻
		CSH-st	Lin ⁻ Sca ⁺ c-kit ⁺ CD150 ⁻ CD48 ⁻ CD135 ⁻
		MPP2	Lin ⁻ Sca ⁺ c-kit ⁺ CD48 ⁻ CD150 ⁺ CD135 ⁻
MPP	CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ Thy1⁻ CD49f⁻	MPP3	Lin ⁻ Sca ⁺ c-kit ⁺ CD48 ⁺ CD150 ⁻ CD135 ⁻
		MPP4	Lin ⁻ Sca ⁺ c-kit ⁺ CD48 ⁺ CD150 ⁻ CD135 ⁺
CMP	CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD7 ⁻ CD10 ⁻ FLT3 ⁺ CD45RA ⁻	CMP	Lin ⁻ c-kit ⁺ CD34 ⁺ CD16/32 ⁻ CD127 ⁻
GMP	CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD7 ⁻ CD10 ⁻ FLT3 ⁺ CD45RA ⁺ CD19 ⁻	GMP	Lin ⁻ c-kit ⁺ CD34 ⁺ CD16/32 ⁺ CD127 ⁻
MEP	CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD7 ⁻ CD10 ⁻ FLT3 ⁻ CD45RA ⁻	MEP	Lin ⁻ c-kit ⁺ CD34 ⁻ CD16/32 ⁻ CD127 ⁻
CLP	CD34+ CD38+ CD10+ CD127+	CLP	Lin- c-kit ⁺ CD127 ⁺

						-
I ahloali 1 roc	anitiilatit dae n	naramanire enner	nde homator	2011D11D11D1	humain of	murin
Tableau I ICC	apitulatii uco ii	lai queui 3 30uci	ies nemator	Joieligues	numani ci	maimi

III Le maintien des cellules souches hématopoïétiques

1 Le concept de niche hématopoïétique

Historiquement, l'idée selon laquelle les os contiennent toutes les cellules suffisantes pour supporter l'hématopoïèse provient d'une étude de 1968. En transplantant des fragments d'os (tibias) dans des sites extra médullaires, les auteurs se sont aperçus de la formation d'un réseau de cellules ostéoblastiques suivie d'une phase de vascularisation juste avant que l'hématopoïèse commence (Tavassoli and Crosby 1968). Dix ans plus tard, une étude a confirmé par des approches de CFU-S que

l'activité souche est localisée dans la fraction endostéale de la moelle osseuse suggérant que les CSHs sont localisées dans l'endoste (Gong 1978). Cette même année, R. Schofield formule pour la première fois le concept de niche hématopoïétique. Ce dernier suggère que l'interaction entre les cellules souches et leur microenvironnement permet de les maintenir en quiescence tandis que les cellules filles prolifèrent et se différencient (Schofield 1978). Bien que ce concept date de la fin des années 70 il faudra attendre le début des années 2000 pour enfin disposer des technologies nécessaires pour pouvoir étudier les CSHs dans leurs niches.

A La niche endostéale

La niche endostéale à proprement parler fut décrite pour la première fois en 2003 par le groupe de D. Scadden. Dans cette étude les auteurs ont généré un modèle de souris dans lequel le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (rPTH) est constitutivement actif dans les ostéoblastes. Dans ce modèle les souris présentaient une augmentation du nombre de trabécules osseuses s'accompagnant d'une augmentation du nombre de CSHs (Calvi et al. 2003). De façon concomitante, l'injection de PTH induit une augmentation du nombre d'ostéoblastes ayant pour conséquence d'augmenter la synthèse de Jagged1 qui en activant la voie Notch permet d'expandre les CSHs in vivo (Calvi et al. 2003). La même année il a été également décrit que l'augmentation des SNO (spindle-shaped Ncadherin+ CD45- osteoblastic cells) est corrélée à une augmentation du pool de CSHs (J. Zhang et al. 2003). Bien que ces études montrent une corrélation entre la taille du pool ostéoblastique et une augmentation du nombre et de la fréquence des CSHs, elles ne démontrent pas que la niche endostéale est le support de l'hématopoïèse dans des modèles non manipulés génétiquement.

B La niche vasculaire

Par une approche immunohistochimique le groupe de S. Morisson a démontré en 2005 que des CSHs pouvaient être retrouvées proches de l'endothélium dans la rate (principal site de l'hématopoïèse extra médullaire) après mobilisation au G-CSF. Par ailleurs, ils ont également mis en évidence que 60% des CSHs sont associées aux vaisseaux dans la moelle osseuse suggérant l'existence d'une niche périvasculaire (Kiel et al. 2005). Cette découverte a marqué un tournant dans l'étude de la niche hématopoïétique. Certaines études suggèrent que la niche endostéale supporte des CSH ultra-quiescentes tandis que la niche vasculaire supporte les cellules quiescentes

et les progéniteurs (Kopp et al. 2005). Ce domaine d'étude a été grandement débattu au cours de ces dernières années, et je n'entrerai pas dans les détails ici (Michel Aurrand-Lions and Mancini 2018; Wilson and Trumpp 2006).

2 La dynamique de migration des CSHs vers et en dehors de la moelle osseuse

L'immense majorité des CSHs réside dans les niches de la moelle osseuse, néanmoins un faible nombre d'entre elles circule dans le sang périphérique (Wright et al. 2001). Les CSHs circulantes sont également capables soit de rentrer à nouveau dans la moelle soit de coloniser des sites extra médullaires tels que la rate ou le foie (Wright et al. 2001; Cardier and Barberá-Guillem 1997). Le phénomène de migration des CSHs vers la circulation sanguine s'appelle la mobilisation, tandis que le mouvement inverse se nomme le homing (Figure 10). Il a été spéculé que ce turnover permettrait de maintenir l'homéostasie hématopoïétique en s'assurant que les niches ne restent pas inoccupées après la différenciation ou la mort des CSHs (Wright et al. 2001). Le nombre de CSHs circulantes augmente drastiquement en réponse à l'inflammation. Il a été proposé que les CSHs participent à la réponse immunitaire en délocalisant l'hématopoïèse sur les sites d'inflammations (King and Goodell 2011). Par ailleurs, il a également été montré que les CSHs sont capables de se différencier en hépatocytes en réponse à l'inflammation (Lagasse et al. 2000). Ces données démontrent que la migration des CSH n'est pas un épiphénomène mais est essentielle pour l'homéostasie tissulaire. La migration cellulaire repose sur un phénomène bien connu et décrit depuis le 19^{ème} siècle: la transmigration cellulaire ou diapédèse.

Le processus biologique qui décrit le mieux la diapédèse est le recrutement leucocytaire sur les sites d'inflammation. Physiologiquement, les leucocytes circulent dans le flux sanguin et sont capables de rentrer dans les tissus pour devenir des cellules résidentes (macrophage, mastocytes) qui forment la première ligne de réponse à l'inflammation. Lors de l'inflammation, ces cellules libérent des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires (Interleukine-1, TNF- α) (Springer 1994; Galli 1993). La conséquence immédiate à la libération de ces cytokines est la vasodilatation des vaisseaux proximaux du site d'inflammation. Cette vasodilatation entraine une diminution du flux sanguin et un rapprochement des leucocytes de l'endothélium vasculaire. Les cytokines pro-inflammatoires activent également l'endothélium vasculaire qui va surexprimer les molécules d'adhésion E-, P- et L-selectines. La

première étape de la diapédèse ou « rolling », est initiée par l'interaction entre les sélectines et leur ligands exprimés par les leucocytes. Les leucocytes roulent le long de l'endothélium vasculaire avant de s'arrêter marquant la deuxième étape de la diapédèse : l'adhésion ferme. L'adhésion ferme est médiée par les intégrines leucocytaires (α L β 2, α 4 β 1) qui interagissent avec ICAM-1 et VCAM-1 exprimées par les cellules endothéliales. Enfin la dernière étape de la diapédèse est la transmigration qui fait intervenir notamment les molécules d'adhésion JAM-C, PECAM-1 et ESAM (**Figure 8**) (Ley et al. 2007; Nourshargh and Alon 2014).



Figure 8 La diapédèse leucocytaire :

Les 3 étapes clés de la transmigration : Le rolling, l'adhésion ferme et la transmigration. Les principales molécules d'adhésion impliquées dans ce phénomène sont représentées dans ce schéma. PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1 ; ICAM-1 : Inter Cellular Adhesion Molecule-1 ; VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1 ; JAM-C : Junctionnal Adhesion Molecule C ; PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule ; ESAM : Endothelial cell-selective adhesion molecule.

La transmigration des CSHs repose également sur ces trois étapes clés mais fait intervenir d'autres circuits adhésifs. D'un point de vue clinique, il est crucial de connaitre les mécanismes adhésifs qui régulent la mobilisation et le homing des CSHs. En effet, la mobilisation des CSHs est couramment réalisée en clinique dans le but de les prélever par cytaphérèse avant de les greffer chez un patient ayant reçu une

chimiothérapie. Dans la suite de mon texte, je vais décrire les différents circuits impliqués dans le maintien des CSHs

3 Facteurs extrinsèques et maintien des cellules souches hématopoïétiques

A Les molécules d'adhérence

L'adhésion joue un rôle fondamental dans l'homéostasie des CSHs. De nombreuses molécules d'adhésion sont exprimées à la surface des CSHs. Ces molécules d'adhésion appartiennent aux familles des immunoglobulines, des intégrines, des selectines ou encore des cadhérines (De Grandis et al. 2016). Elles sont capables de s'associer avec leurs ligands exprimés par le microenvironnement de la moelle osseuse promouvant des interactions cellule/cellule ou cellule/matrice extracellulaire. Réciproquement, les cellules stromales expriment elles aussi des molécules d'adhésion capables d'interagir avec les CSHs.

a <u>Les intégrines</u>

Les intégrines sont des hétérodimères non covalents formés par des chaines α et β . Les intégrines sont exprimées par quasiment tous les types cellulaires (Kadry and Calderwood 2020). Il existe 18 sous unités α et 8 sous unités β formant ainsi 24 hétérodimères impliqués dans de nombreux processus biologiques dont l'hématopoïèse fait partie (Figure 9 A) (Richard O. Hynes 2002). Les intégrines interagissent avec des protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène, la fibronectine, la laminine ou encore l'ostéopontine. Elles interagissent également avec des molécules de la superfamille des immunoglobulines telles que VCAM-1. ICAM-1, ICAM-2, JAM-A, JAM-B ou JAM-C (S. K. Nilsson et al. 2005; R. O. Hynes 1992; Langer et al. 2007; Dustin and Springer 1988). L'affinité des intégrines pour leurs ligands est régulée de deux façons différentes : par la voie dite « inside-out » et celle « inside-in » (Figure 9 B). Dans le premier cas, le signal d'activation vient de l'intérieur de la cellule via une signalisation indépendante des intégrines (comme par exemple d'un récepteur aux chimiokines), alors que dans le deuxième cas il provient de l'engagement du ligand de l'intégrine qui induit son changement conformationnel en récepteur de haute affinité (Richard O. Hynes 2002).



Figure 9 Les intégrines :

A : Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous unité α et d'une sous unité β . **B** : Représentation schématique des deux modes de signalisation des intégrines.

Les intégrines sont exprimées par toutes les cellules composant le système hématopoïétique des CSHs en passant par les progéniteurs jusqu'aux cellules de la niche (Soligo et al. 1990). En 1996 le groupe de R. Hynes, démontre que l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ est essentielle pour le développement post-natal des cellules B et T alors qu'elle n'est pas essentielle lors de l'hématopoïèse fœtale (Arroyo et al. 1996). Plus récemment, il a été montré que les souris déficientes pour l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ présentaient un nombre de CSHs comparables aux souris contrôles. Néanmoins, on observe une augmentation des progéniteurs circulant suggérant un défaut de rétention des cellules dans la moelle osseuse (Priestley, Ulyanova, and Papayannopoulou 2007). Ces données sont cohérentes dans le sens où il a été démontré que l'axe $\alpha_4\beta_1/VCAM_1$ joue un rôle dans la rétention des CSHs dans la moelle osseuse (Papayannopoulou et al. 1995). Par ailleurs, il a été rapporté que les macrophages patrouillant et exprimant VCAM-1 peuvent interagir avec les CSHs de

façon $\alpha_4\beta_1$ dépendante permettant de maintenir ces dernières proches de leurs niches (D. Li et al. 2018) (Figure10).



Figure 10 Les CSHs dans leur niche :

Représentation schématique des interactions leuco-stromales dans la moelle osseuse. HA : Acide Hyaluronique

b Les cadhérines

Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires avec des séquences répétées en tandem sur leur domaine extracellulaire leur permettant des interactions homophiliques de façon calcium-dépendante (Hatta et al. 1988; Shapiro et al. 1995). On distingue les N-, P-, E- et VE-cadhérines, initialement nommées ainsi car respectivement exprimées par les neurones (N-), les cellules myoépithéliales (P-), les cellules épithéliales (E-) et l'endothélium vasculaire (VE-). La N-cadhérine est également exprimée par les ostéoblastes et les CSHs suggérant qu'elle peut être responsable du maintien des CSHs dans la niche endostéale (J. Zhang et al. 2003). Une étude a d'ailleurs montré que le knock-out de la N-cadhérine dans les cellules LSK compromet le potentiel de greffe à long terme des CSH dans la moelle osseuse mais pas dans la rate (Hosokawa et al. 2010). Cependant, dans cette étude les auteurs

se sont restreints au compartiment LKS qui ne contient que 15% de lt-CSH. Le rôle de la N-cadhérine dans le maintien des CSHs a été remis en cause par plusieurs autres études. Premièrement, il a été démontré que la N-cadhérine n'est pas exprimée sur les CSHs, et que des souris déficientes en ostéoblastes ne présentent aucun défaut d'hématopoïèse (Kiel, Radice, and Morrison 2007). Deuxièmement, la délétion conditionnelle de la N-Cadhérine dans la CSHs ainsi que dans les ostéoblastes n'induit pas de défaut hématopoïétique (Kiel et al. 2009; Bromberg et al. 2012). D'autres études ont apporté des éléments de réponse sur la fonction de la N-cadhérine dans l'hématopoïèse. L'expression de la N-cadhérine est hétérogène au sein des CSHs. En effet, les CSHs exprimant la N-cadhérine représentent un réservoir de cellules dormantes disponibles pour l'hématopoïèse à la suite d'un stress myéloablatif (Haug et al. 2008) (Figure 10). D'ailleurs, il a récemment été établi que la délétion de la Ncadhérine compromet l'hématopoïèse des souris ayant subi une chimiothérapie (Zhao et al. 2019). Ces observations ne sont pas surprenantes car il est très commun chez les mammifères de trouver des cellules souches quiescentes et actives coexistant au sein d'une même niche.

c <u>Les molécules de la superfamille des immunoglobulines</u>

Les molécules capables d'adhérer de façon Ca2+ indépendante appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig SF CAMs). Ces protéines contiennent un ou plusieurs domaines « Ig-like » sur leur partie extracellulaire nommés V ou C en fonction de leur homologie avec les parties variables ou constantes des immunoglobulines. Les IgSF CAM présentent un seul domaine transmembranaire et domaine intracellulaire capable d'interagir avec plusieurs partenaires un intracellulaires (Aplin et al. 1998). Un grand nombre d'Ig SF CAMs sont exprimées par les CSHs telles que ALCAM (CD166), ICAM-1 et les JAMs dont je parlerai plus en détail ci-après. Cette famille de protéines joue un rôle fondamental dans l'hématopoïèse. L'interaction homophilique de CD166 avec lui-même est nécessaire pour maintenir le potentiel de greffe à long terme des CSHs humaines et murines (Chitteti et al. 2014). Récemment il a été montré que l'expression d'ICAM-1 est essentielle pour l'homéostasie de la moelle osseuse et la maintenance des CSHs. ICAM-1 interagit avec l'intégrine $\alpha_{L}\beta_{2}$ exprimée par les cellules hématopoïétiques. La délétion d'ICAM-1 dans des It-CSHs normales ne compromet pas leur potentiel de greffe suggérant que l'expression d'ICAM-1 sur les CSHs n'est pas essentielle pour l'hématopoïèse. Cependant, la transplantation de CSHs normales dans une souris déficiente pour ICAM-1 induit une diminution des CSHs suggérant que l'expression d'ICAM-1 dans la niche est essentielle pour l'hématopoïèse (Y.-F. Liu et al. 2018). Ceci est en accord avec une étude récente de notre équipe montrant que les cellules stromales péri-sinusoïdales (PSS) de la niche hématopoïétique peuvent être identifiées par l'expression de ICAM-1 (Balzano et al. 2019) **(Figure 10)**

d La famille des JAMs

Les molécules d'adhérence jonctionnelle (JAM) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Les JAMs sont caractérisées par la présence de deux domaines immunoglobulines extra cellulaires de type C2 et V. La famille des JAMs comprend trois membres « classiques » JAM-A, JAM-B et JAM-C partageant 35% d'identité et plus de 70% d'homologie (M. A. Aurrand-Lions et al. 2000) et quatre membres « non classiques » ESAM-1, JAML, CAR et JAM-4. Les membres classiques possèdent une séquence C-terminale très similaire de 40 à 50 acides aminés avec un domaine de liaison au domaine PDZ de classe II tandis que les membres non classiques présentent une partie cytoplasmique plus longue (de 100 à 120 acides aminés) ainsi qu'un motif PDZ de type 1 (Figure 11). Grace à ce domaine, les JAMs sont capables d'interagir avec plusieurs protéines contenant des domaines PDZ telles que GRASP55, ZO-1, PAR3 et MUPP1 (Cartier-Michaud et al. 2017; K. Ebnet et al. 2000; Klaus Ebnet et al. 2003; Hamazaki et al. 2002). Les protéines contenant des donmaines PDZ sont connues pour agir comme des « échafaudages » intracellulaires liant les molécules de surface cellulaire à la machinerie intracellulaire laquelle est impliquée dans la migration cellulaire, la polarisation ou la signalisation. Les JAMs sont impliquées dans la formation et le maintien des liaisons intercellulaires au niveau des jonctions serrées entre cellules endothéliales et épithéliales et jouent un rôle dans la migration de leucocytes vers les sites d'inflammation (Mandell and Parkos 2005). A l'instar des autres Ig CAMs les JAMs sont capables d'interagir de facon homophilique et hétérophilique. Dans le système hématopoïétique les JAMs sont à la fois exprimées par les CSHs et les cellules stromales de la niche (Praetor et al. 2009; Ooi et al. 2009; Sugano et al. 2008; Nagamatsu et al. 2006) (Figure 10).



Figure 11 La famille des JAMs :

Représentation schématique des membres classiques (JAM-A, B et C) et non-classiques (CAR, ESAM, JAM-4) des JAMs. Chaque membre possède deux domaines immunoglobuline V et C₂. Les membres classiques ont un domaine intracellulaire de 45 à 49 acides aminés et un motif de liaison PDZ de type II. Les membres non- classiques ont un domaine intracellulaire de 105 à 120 acides aminés et un motif de liaison PDZ de type I

B Les facteurs solubles

a <u>L'axe CXCR4/CXCL12</u>

CXCR4 est un récepteur exprimé à la surface des CSH, son ligand est la cytokine CXCL12 (SDF-1) sécrétée par les cellules stromales (Zou et al. 1998). La délétion conditionnelle de CXCL12 dans les ostéoblastes n'a aucun impact sur les CSHs, alors que sa délétion dans les progéniteurs mésenchymateux (et dans une moindre mesure dans les cellules endothéliales) entraine une diminution drastique de l'activité de repopulation, de la quiescence et du nombre de CSHs (Greenbaum et al. 2013). Ces résultats indiquent que la niche périvasculaire exprime CXCL12 et est le support des CSHs. Le rôle de CXCR4 dans le maintien des CSHs est sujet à controverse. Pour l'étudier, deux modèles murins de délétion inductible de CXCR4 ont été utilisés. Dans le premier modèle, la délétion de CXCR4 est induite par une Mx1-Cre tandis que la délétion est induite par une ROSA Cre ERT2 dans le second. Dans les deux modèles la délétion de CXCR4 entraine une augmentation des progéniteurs circulants. Cependant, la délétion de CXCR4 induite par le Poly IC dans le modèle Mx1 entraine

une diminution drastique du nombre CSHs (Sugiyama et al. 2006), tandis que la délétion induite par le tamoxifène dans le modèle ROSA Cre ERT2 entraine une expansion des CSHs (Nie, Han, and Zou 2008). Cet effet est probablement dû à une modification conformationnelle de CXCR4 médié par les RhoGTPases en réponse au Poly IC entrainant une modification de la voie CXR4/CXCL12 (Zoughlami et al. 2012; De Grandis et al. 2016)(**Figure 12**)

b <u>L'axe c-kit/SCF</u>

Le Stem cell factor ou SCF est une cytokine hématopoïétique qui interagit avec le récepteur tyrosine kinase c-kit (CD117) exprimé par les CSH (Williams et al. 1990). Dès 1979, il a été rapporté que des mutations dans les locus SI (codant pour le SCF) et W (codant pour c-kit) entrainaient des anémies macrocytaires sévères suggérant un rôle de l'axe c-kit/SCF dans l'hématopoïèse (Russell 1979). Le SCF est exprimée par les cellules stromales de la moelle osseuses telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales, les ostéoblastes, les cellules mésenchymateuses et les cellules périvasculaires (Broudy 1997; Ding et al. 2012). Le SCF permet d'augmenter la survie des CSHs in vitro (C. L. Li and Johnson 1994). In vivo, il a été montré que l'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé contre c-kit permet de mobiliser les CSHs (Czechowicz et al. 2007). Par ailleurs il a été montré que l'interaction c-kit/SCF induit la prolifération et la différenciation des CSHs et les protège de l'apoptose (Domen and Weissman 2000). En utilisant des KO conditionnels du SCF, le groupe de S.Morisson a démontré que le SCF exprimé par les cellules endothéliales et périvasculaires est essentiel pour la prolifération et l'expansion des CSHs. Inversement, la délétion conditionnelle du SCF dans les ostéoblastes et les cellules mésenchymateuses n'a aucun effet sur les CSHs. Pris ensemble, ces résultats indique que l'axe c-kit/SCF est essentiel pour le maintien et l'expansion des CSHs dans la niche périvasculaire (Ding et al. 2012) (Figure 12).

c <u>L'axe Tie2/Angiopoietin1</u>

L'angiopoietine est sécrétée par les ostéoblastes de la moelle osseuse (Arai et al. 2002). L'angiopoietine interagit avec la tyrosine kinase Tie2 exprimée à la surface des CSH permettant à ces dernières d'interagir avec le collagène et la fibronectine de la matrice extra-cellulaire (Sato et al. 1998). En 2004 le groupe T.Suda démontre que l'axe Tie2/angiopoietine régule la quiescence des CSH dans la moelle osseuse.

L'interaction entre les CSH Tie2+ et l'angiopoietine induit une régulation positive de l'expression de l'intégrine β 1 permettant l'adhésion des CSH Tie2+ à la niche endostéale (Arai et al. 2004) (**Figure 12**).



Figure 12 Les facteurs solubles impliqués dans le maintien des CSHs dans la moelle osseuse :

Représentation schématique des principaux facteurs solubles impliqués dans la régulation des CSHs. Dans ce schéma les paires ligands récepteurs sont identifiées par un code couleur. Ang1 : Angiopoietine 1 ; SCF : Stem cell factor

4 La protéine JAM-C dans et au-delà ses fonctions hématopoïétiques

La protéine JAM-C, en plus d'être présente sur les CSH est également exprimée par les cellules endothéliales, les fibroblastes, les plaquettes, les muscles lisses, les neurones et les spermatogonies (Praetor et al. 2009; M. Aurrand-Lions et al. 2001). La protéine JAM-C s'engage dans des interactions homophiliques mais également hétérophiliques avec JAM B, l'intégrine leucocytaire α M β 2, l'intégrine α β 2 (Lamagna, Meda, et al. 2005; Santoso et al. 2002; Arrate et al. 2001). Par ailleurs il a été rapporté que JAM-C facilite l'interaction de JAM-B avec l'intégrine α 4 β 1 (Cunningham et al. 2002). Ces observations indiquent que JAM-C joue un rôle essentiel dans plusieurs

réseaux d'interactions adhésives impliqués dans de nombreux systèmes biologiques décrits ci-dessous.

Dans le système hématopoïétique, JAM-C est exprimée par les CSH et son expression diminue avec la différenciation (Praetor et al. 2009). Dans l'équipe nous avons démontré que les CSHs JAM-C⁺ interagissent avec les cellules stromales exprimant JAM-B (Arcangeli et al. 2011). Les souris n'exprimant pas JAM-B présentent un défaut de quiescence des CSHs qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de progéniteurs myéloïdes (Arcangeli et al. 2011). Ces résultats indiquent que l'interaction entre JAM-C et JAM-B régule la quiescence des CSHs (Arcangeli et al. 2011). En ce sens le blocage de l'axe JAM-C/JAM-B induit une mobilisation des CSHs suggérant le ciblage de cet axe dans le but de mobiliser les CSHs avant une transplantation (Arcangeli et al. 2014). Cependant chez l'Homme JAM-C est exprimée par les plaquettes et est impliquée dans l'activation plaquettaire (Erpenbeck et al. 2010). Dès lors l'utilisation chez l'homme d'un anticorps bloquant anti-JAM-C nécessite des études approfondies.

JAM-C est capable d'interagir avec les leucocytes via les intégrines α M β 2 et α x β 2 suggérant que JAM-C régule la migration leucocytaire. En ce sens le blocage de l'interaction entre JAM-C et α M β 2 induit une diminution de la transmigration des neutrophiles (Chavakis et al. 2004). Ces observations ont été confirmées par d'autres et montrent que JAM-C régule l'adhésion et la transmigration leucocytaire en réponse à l'inflammation (Michel Aurrand-Lions et al. 2005). L'inhibition de JAM-C soit par un anticorps bloquant ou par une forme soluble de JAM-C (Chavakis et al. 2004) réduit le recrutement des leucocytes aux sites d'inflammation (Michel Aurrand-Lions et al. 2005; Scheiermann et al. 2009). Inversement, l'utilisation d'un modèle transgénique de souris surexprimant JAM-C sur les cellules endothéliales induit une augmentation du recrutement leucocytaire inflammatoitre (Michel Aurrand-Lions et al. 2005).

Les souris mâles déficientes pour l'expression de JAM-C (Jam3^{KO}) présentent une azoospermie constitutive. JAM-C est exprimée par les spermatides rondes et s'accumule sur la face antérieure qui forme l'acrosome. La délétion de JAM-C entraine un défaut de polarisation des spermatides entrainant un blocage de différenciation. Lors de la différenciation des spermatides JAM-C recrute les protéines de polarité Par6 et PKCλ qui active la protéine Ccd42 essentielle à la formation de l'acrosome (Gliki et

al. 2004). Dans cette étude les auteurs proposent que l'engagement de JAM-C avec JAM-B exprimé par les cellules de Sertoli permet le recrutement du complexe de polarisation Par6–Cdc42–PKCλ. Cependant, les souris déficientes pour l'expression de JAM-B ne sont pas stériles. Récemment, une étude du laboratoire a démontré que les souris n'exprimant pas la protéine GRASP55 possèdent le même phénotype que les souris Jam3^{KO} (Cartier-Michaud et al. 2017). La protéine GRASP-55 est impliquée dans la formation de l'appareil de Golgi, dans l'autophagie et dans la voie de sécrétion non-conventionnelle (Ahat, Li, and Wang 2019). On distingue la voie de sécrétion dite conventionnelle, dans laquelle les protéines sont synthétisées par le réticulum endoplasmique et transitent par l'appareil de Golgi avant d'être adressées à la membrane, de la voie dite non-conventionnelle où les protéines sont sécrétées en contournant l'appareil de Golgi (Ahat, Li, and Wang 2019). Dans les spermatides, l'interaction entre JAM-C et GRASP-55 via un domaine PDZ induit la polarisation de JAM-C et la formation de l'acrosome dépendante du transport golgien. De plus, l'inhibition de l'interaction JAM-C/GRASP-55 avec un inhibiteur pharmacologique induit une stérilité réversible (Cartier-Michaud et al. 2017). Ces données suggèrent que GRASP-55 pourrait réguler le transport de JAM-C à la membrane des cellules via la voie de sécrétion non-conventionnelle. Cependant, la délétion de GRASP-55 n'induit aucun défaut hématopoïétique démontrant que l'adressage de JAM-C à la membrane des CSHs n'est pas régulé par la voie de sécrétion non conventionnelle (Bailly et al. 2020). En réalité, il apparait que GRASP55 et JAM-C ne sont pas exprimés en même temps au cours de la différentiation hématopoïétique. Au contraire de JAM-C, GRASP55 n'est pas exprimé par les CSHs et son expression augmente au cours de la différentiation hématopoïétique (Bailly et al. 2020).

JAM-C est exprimée par les cellules de Schwan (CS), dans le système nerveux périphérique les CS s'associent pour former la gaine de myéline essentielle à la conduction de l'influx nerveux (Scheiermann et al. 2007). Chez les souris, la délétion de JAM-C induit un défaut de formation de la gaine de myéline s'accompagnant d'un défaut de conduction nerveuse (Scheiermann et al. 2007). Plus précisément, JAM-C est exprimée par les fibres nerveuses motrices et sensorielles Aδ et aux jonctions des cellules péri neurales (Colom et al. 2012). En ce sens le « knock-out » conditionnel de JAM-C dans les CS murine induit des défaut sensoriels et moteurs (Colom et al. 2012). Chez l'homme JAM-C est également exprimée par les nerfs périphériques et son

expression est réduite chez les patients atteints de pathologies démyélinisantes confirmant le rôle de JAM-C dans l'homéostasie axonale (Scheiermann et al. 2007).

L'angiogenèse est un mécanisme de formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. D'un point de vue mécanistique l'angiogenèse repose sur le réarrangement de molécules de jonctions endothéliales conduisant à une modification de l'endothélium vasculaire. JAM-C est exprimée par l'endothélium vasculaire et participe à l'adhésion des cellules endothéliales entre-elles suggérant un rôle de JAM-C dans l'angiogenèse (M. A. Aurrand-Lions et al. 2000). In vitro, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti-JAM-C induit une diminution de l'angiogenèse. De façon concomitante, l'anticorps bloquant anti-JAM-C permet de réduire l'angiogenèse tumorale in vivo confirmant le rôle pro-angiogénique de JAM-C (Lamagna, Hodivala-Dilke, et al. 2005). Une étude récente a montré que JAM-C exprimée par les cellules endothéliales permet le recrutement des progéniteurs endothéliaux (ECp) via l'interaction homophilique JAM-C/JAM-C. Le recrutement des ECp initie l'angiogenèse notamment au cours du développement de tumeurs. L'utilisation d'un anticorps bloquant anti-JAM-C réduit le recrutement des ECp ayant pour conséquence de réduire l'angiogenèse tumorale (Czabanka et al. 2020). Une autre étude a montré que le clivage de JAM-C par les par les métalloprotéinases ADAM10 et 17 conduit à la génération d'une forme soluble de JAM-C (sJAM-C) (Rabquer et al. 2010). Le sJAM-C induit l'angiogenèse in vivo et in vitro en stimulant la phosphorylation de PI3k, de Src ainsi que de P38 dans les cellules endothéliales (Rabquer et al. 2010). Ces résultats montrent que JAM-C régule l'angiogenèse indépendamment de l'adhésion, suggérant que JAM-C peut réguler d'autre mécanismes biologiques en dehors de ses fonctions adhésives.

5 Facteurs intrinsèques et maintien des cellules souches hématopoïétiques

A Les facteurs de transcription

Outre l'adhésion, de nombreux facteurs de transcription sont essentiels au développement des CSHs. Les facteurs de transcription fonctionnent en se liant à l'ADN et/ou à l'ARN pour induire ou réprimer l'expression de certains gènes. Physiologiquement, ils sont indispensables pour le bon déroulé de tous les processus

développementaux dont l'hématopoïèse fait partie. Je vais décrire de façon nonexhaustive les principaux facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse.

a <u>La famille GATA :</u>

Cette famille de facteurs de transcription se lie à un motif WGATAR d'où leur nom GATA. Il existe 6 membres dans la famille des GATA allant de 1 à 6. Dans l'hématopoïèse GATA2 est exprimé par les CSHs, GATA1 est exprimé par les progéniteurs érythroïdes tandis que GATA3 est exprimé par les cellules T. La délétion de GATA 2 entraine une mortalité embryonnaire à E10 lié à des dommages hématopoïétiques sévères, soulignant le rôle de GATA2 dans la genèse des HSCs. Par ailleurs, la délétion ciblée du site +9.5 chez la souris induit la diminution du nombre de CSHs. D'un point de vue mécanistique GATA2 peut-être réprimé par GPR65 (Récepteur couplé à une protéine G) induisant un arrêt de l'hématopoïèse. Inversement GATA 2 peut être co-activé par GPR56, Runx1 et SCL (Katsumura, Bresnick, and GATA Factor Mechanisms Group 2017).

b <u>La famille Hox :</u>

La famille des Hox pour (homeobox gene) sont des facteurs de transcription très conservés dans le règne animal. Ils ont été identifiés initialement comme des régulateurs clés de l'identité cellulaire de l'axe antéro-postérieur de l'embryon de la drosophile (Lewis 1978). Il existe 39 Hox répartis en quatre clusters A-D. Il a été montré que les Hox (clusters A, B et C) sont préférentiellement exprimés dans les HSCs et dans les progéniteurs immatures suggérant un rôle important dans l'hématopoïèse. En effet la surexpression de certains Hox induit des blocages de différenciation ainsi que des leucémies. HOXA9 est l'un des gènes HOX les plus abondants dans les CSHs et son expression décroît avec la différenciation (Pineault et al. 2002). La délétion de HOXA9 induit un défaut de prolifération des CSHs qui s'accompagne d'une diminution de leur capacité de repopulation à long terme suggérant que HOXA9 influe sur les programmes d'auto-renouvellement des CSHs (H. J. Lawrence et al. 2005).

c <u>La famille Runx :</u>

La famille Runx est composée de trois membres Runx1, Runx2 et Runx3 impliqués dans la régulation de nombreux gènes. Initialement Runx1 a été décrit comme indispensable à l'hématopoïèse tandis que Runx2 est associé au développement des

os et Runx3 à la neurogénèse. Runx1 est exprimé dans toutes les cellules hématopoïétiques des CSHs aux cellules matures. La délétion conditionnelle de Runx1 entraine une augmentation des LSK suggérant que Runx1 contrôle le nombre de CSH dans la moelle osseuse. Toutefois, Runx1 n'a pas d'influence sur la capacité de repopulation des CSHs (de Bruijn and Dzierzak 2017). La délétion conditionnelle de Runx1 dans le système hématopoïétique entraine une expansion des CSHs s'accompagnant d'une augmentation des progéniteurs myéloïdes avec un biais vers la voie mégacaryocytaire (Lam et al. 2014; Behrens et al. 2016). Les auteurs ont établi une liste de 27 gènes dérégulés par la délétion de *Runx1* dont des gènes codant pour des protéines d'adhésion et notamment JAM-C (Lam et al. 2014). Chez les mammifères, l'expression de Runx1 est contrôlée par deux promoteurs distincts, le promoteur distal P1 codant pour l'isoforme RUNX1C et le promoteur proximal codant pour l'isoforme RUNX1B (Levanon and Groner 2004). Dans l'hématopoïèse adulte le promoteur P1 de RUNX1 est le plus actif tandis que l'activité du promoteur P2 est plus hétérogène suggérant que RUNX1C régule les CSHs (Draper et al. 2016). Pour explorer le rôle de RUNX1C dans l'hématopoïèse le groupe de C.Lacaud a développé un modèle de surexpression de Runx1b. Ce modèle repose sur un « knock-in » du promoteur P2 à la place du promoteur P1 ayant pour conséquence une perte d'expression de RUNX1C et une surexpression de RUNX1B (Draper et al. 2017). Les auteurs ont constaté une diminution des progéniteurs mégacaryocytaires liée à une augmentation de l'apoptose et donc d'une diminution du nombre de plaquettes (Draper et al. 2017). Par ailleurs, aucun autre défaut hématopoïétique n'a été observé suggérant que la perte de Runx1c est compensée par Runx1b sauf pour la génération des mégacaryocytes (Draper et al. 2017). Par ailleurs, la délétion de RUNX1C s'accompagne d'une augmentation de l'expression de JAM-C indiquant que RUNX1C régule négativement l'expression de JAM-C tandis que RUNX1B la régule positivement (Draper et al. 2017). Ces observations laissent suggérer que RUNX1 régule la myélopoïèse de façon cellulaire autonome et en modulant l'interaction des CSHs avec le microenvironnement.

B Le rythme circadien

Les rythmes circadiens sont un ensemble de processus extrêmement conservés dans le règne animal dictant l'activité cellulaire en fonction du jour ou de la nuit. On parle communément de « l'horloge biologique ». Les rythmes circadiens sont régulés à deux

niveaux, au niveau de l'organisme entier par le noyau suprachiasmatique (SCN) et au niveau cellulaire par un ensemble de gènes « horloge » (Dibner, Schibler, and Albrecht 2010). Le SNC se situe dans le cerveau et son activité est directement contrôlée par les yeux. En effet, les informations sur le cycle jour/nuit sont transmises par les yeux au SNC qui va en s'activant libérer des hormones telles que la sérotonine grâce au système nerveux parasympathique. Au niveau cellulaire il existe un ensemble de gènes (*Per, Bmal1, Csnk1e*) qui régule l'horloge interne de chaque cellule. Au niveau hématopoïétique, il a été montré que le nombre de CSHs circulantes oscille en fonction des rythmes circadiens (Scheiermann et al. 2012). De plus l'expression de CXCL12 dans la moelle osseuse oscille et, est anti corrélée au nombre de CSH circulantes (Méndez-Ferrer et al. 2008). Ces résultats suggèrent que les rythmes circadiens jouent un rôle clé dans le maintien des CSH dans leur niche. Dans la même idée un travail auquel j'ai participé au cours de ma thèse a montré que le homing des leucocytes vers les tissus périphériques oscille selon un cycle jour/nuit. En d'autres termes il existe des profils d'expression protéique différents en fonction des cycles jour/nuit. Par exemple chez la souris, le jour les leucocytes présentent un profil d'expression pro-circulant tandis que la nuit le profil d'expression est plutôt pro-migratoire (He et al. 2018). Ces données indiquent que les rythmes circadiens jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie de la niche et des CSHs. C'est pourquoi il parait important de prendre en compte ces rythmes pour l'étude de l'hématopoïèse. Notamment lors d'expériences de greffe il semblerait nécessaire de contrôler l'heure à laquelle l'expérience est planifiée dans le but d'exclure tout biais de homing lié aux rythmes circadiens. Il faut reconsidérer certains designs expérimentaux afin d'éviter de greffer des animaux tôt le matin ou tard le soir lorsque les oscillations circadiennes sont à leur maximum.

IV Apport des modèles souris à l'étude de l'hématopoïèse

1 Prélude sur les Knock-Out

Historiquement, 1987 marque un tournant dans l'étude du développement des mammifères : M. Evans, décrit la méthodologie consistant à cultiver des cellules souches embryonnaires (ES), à les modifier génétiquement avant de les réintroduire dans des mères porteuses afin de générer une descendance génétiquement modifiée (Kuehn et al. 1987). Parallèlement, Capecchi et Smithies décrivent la méthode pour cibler des gènes grâce à la recombinaison homologue (Smithies et al. 1985; K. R. Thomas, Folger, and Capecchi 1986). Les travaux de ces trois chercheurs ont permis

l'émergence des animaux transgéniques ce qui leur vaudra en 2007 le prix Nobel de médecine Dès lors, de nombreuses équipes à travers le monde utilisèrent cette technologie dans le but d'explorer les processus développementaux. Enfin, l'apparition au début des années 1990 des modèles conditionnels inductibles a permis d'explorer davantage les contributions cellulaires et moléculaires aux processus développementaux.

2 Les modèles murins pour l'étude de l'hématopoïèse

La plupart des modèles de KO conditionnels reposent sur l'utilisation du système Cre/LoxP. La Cre est une recombinase encodée par le bactériophage P1 capable de se lier à un motif de 34 paires de bases nommé loxP. L'expression de cette Cre dans des ES de souris permet de déléter l'ADN compris entre deux sites LoxP (« floxé ») par recombinaison homologue (Jiang and Gridley 1997). Les « knock-out » conditionnels sont générés en croisant une souris transgénique dont l'expression de la Cre est sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique avec une souris portant le gène cible « floxé ». Ainsi, chez la progéniture de ces souris, la délétion génique aura lieu uniquement dans les cellules exprimant la Cre (Gu et al. 1994). Cette technique permet également de générer des « knock-in », dans cette configuration un codon STOP « floxé » est inséré en amont du gène à induire. Dès lors, la recombinaison médiée par la Cre va induire la délétion du codon STOP et induire l'expression du gène (**Figure 13**).



Figure 13 Le système Cre LoxP :

(A) Les différentes approches de délétions géniques. La délétion génique peut être conditionnelle et tissu spécifique (a), inductible (b) et inductible dans un tissu spécifique (c). Cela permet un contrôle spatial de la délétion génique (a), temporel (b) ou les deux à la fois (c). B Représentation schématique d'un Knock-Out (B) ou d'un Knock-in (C) en utilisant le système Cre-LoxP. Dans ces systèmes est inséré entre 2 sites LoxP soit le gène cible (B) soit un codon STOP (C), la Cre induit une recombinaison homologue conduisant à la délétion du gène cible (B) ou d'uc codon STOP (C) entrainant respectivement la délétion du gène cible (B) ou l'expression de ce dernier (C)

A Le modèle Mx1 Cre

Le modèle Mx1-Cre est un des modèles les plus utilisés dans l'hématologie expérimentale. Il s'agit d'un modèle inductible décrit pour la première fois en 1995. Dans ce modèle, l'expression de la Cre est sous le contrôle du promoteur Mx1. Physiologiquement ce promoteur joue un rôle dans la réponse antivirale et est inactif dans les souris en bonne santé. Ce promoteur peut être transitoirement activé en

injectant de l'interféron-α, de l'interféron-β ou du Poly-IC aux souris. Par conséquent, l'injection IFN ou de Poly-IC dans des souris possédant un gène cible floxé et possédant le transgène Mx1-Cre conduit à la délétion de ce gène. Ce système est très efficace pour induire la délétion d'un gène dans la rate, le cœur, le foie et dans le système hématopoïétique (Kühn et al. 1995). Néanmoins, ce modèle présente quelques défauts que je vais résumer ici : premièrement, l'injection du Poly IC entraine l'activation des cellules NK induisant un épisode inflammatoire important ayant pour conséquences notamment de modifier de façon transitoire le phénotype des CSHs (jusqu'à 8 jours selon certaines études). Deuxièmement, il a été rapporté que des faibles niveaux d'interféron (correspondant à des niveaux d'expression endogène) peuvent induire l'expression de la Cre et par conséquent la délétion du gène inséré sous le promoteur Mx1. C'est pourquoi il est essentiel en utilisant ce modèle d'étudier le phénotype des souris au moins une semaine après l'administration du Poly-IC et de s'assurer d'avoir tous les contrôles nécessaires (Velasco-Hernandez et al. 2016).

B Le modèle Vav Cre

A l'instar du modèle Mx1-Cre le modèle Vav-Cre repose sur le système Cre/LoxP. À la différence du modèle Mx1 le modèle Vav-Cre n'est pas inductible. La Vav est un facteur d'échange de nucléotides guanines régulé par la famille des G protéines Rho/Rac. Ce modèle est particulièrement utilisé en hématologie expérimentale car le modèle Vav-Cre permet une délétion constitutive d'un gène cible dans toutes les cellules hématopoïétiques. Il s'agit d'un modèle où la délétion du gène cible est tissu spécifique (Georgiades et al. 2002). Cependant il est possible de constater avec ce modèle une délétion partielle du gène dans les ovaires et dans les testicules ayant des conséquences possibles sur la fertilité de ces animaux et sur le patrimoine génétique de leur descendance (de Boer et al. 2003).

C Le modèle CSH-SCL-Cre-ERT

Ce modèle inductible développé en 2005, permet de déléter un gène cible spécifiquement dans le système hématopoïétique. Dans ce modèle la Cre est placée en aval du promoteur Scl (Stem cell leukemia gene) connu pour son rôle dans l'hématopoïèse développementale (Göthert et al. 2005). Dans ce modèle la Cre est fusionnée à un récepteur à l'œstrogène muté activable par le tamoxifène (Feil et al. 1996).

D Le modèle Tie2 Cre

Dans ce modèle la Cre est insérée sous Tie2 qui est exprimé à la fois par les cellules endothéliales et par les CSHs (Kisanuki et al. 2001). Ce modèle est particulièrement intéressant pour étudier le rôle de la niche dans le maintien des CSHs (Ding and Morrison 2013). Néanmoins, dans ce modèle l'expression de la Cre est détectable dans 80-90% des cellules hématopoïétiques. De ce fait les phénotypes observés peuvent être dus aux CSHs et/ou aux cellules endothéliales. C'est pourquoi il faut contrôler la contribution de chacune de ces populations aux phénotypes observés (Joseph et al. 2013).

E Le modèle Col1α1-Cre

Dans ce modèle la Cre est insérée sous le promoteur de $\alpha 1(I)$ -collagène (Col1 $\alpha 1$) permettant la délétion conditionnelle du gène cible dans les ostéoblastes matures. Il existe deux versions de ce modèle, dans le premier la Cre a été placée sous le contrôle du fragment proximal de 2,3 kb du promoteur Col1 $\alpha 1$ murin permettant l'expression de la Cre dans les ostéoblastes mature (Dacquin et al. 2002). Dans l'autre version du modèle la Cre est placée sous le contrôle des fragments proximaux de 2,3kb ou 3,6kb du promoteur Col1 $\alpha 1$ du rat (F. Liu et al. 2004). Dans les deux modèles Col1 $\alpha 1$ -2,3kb l'activité de recombinaison de la Cre est mesurée uniquement dans les ostéoblastes matures, tandis que dans le modèle Col1 $\alpha 1$ -3,6kb la Cre est également exprimée dans les ostéoblastes immatures en cours de développement (F. Liu et al. 2004). Ainsi ces modèles permettent de cibler des populations ostéoblastiques à différents stades de développement. C'est ce modèle qui a permis au groupe de D.Scadden de décrire la niche endostéale comme support des CSHs (Calvi et al. 2003).

3 Adhésion et hématopoïèse : leçons des Knock-Out

A Les selectines

Le premier KO décrit pour avoir un effet sur l'hématopoïèse est celui de la p-sélectine en 1993. Les souris déficientes en p-selectine présentent un nombre élevé de neutrophiles circulants ainsi qu'une perte de roulage des leucocytes sur les vaisseaux suggérant que la p-sélectine est impliquée dans le recrutement de leucocytes durant l'inflammation (Mayadas et al. 1993). Deux ans plus tard des souris déficientes en p et e-selectine ont été générées. Ces souris arborent une augmentation de l'hématopoïèse extra médullaire et un défaut de recrutement des leucocytes (Frenette et al. 1996). L'exploitation du double KO a permis de mettre en évidence que ces deux sélectines ainsi que VCAM-1 sont essentielles pour le nichage des CSH (Frenette et al. 1998).

B Les intégrines

Les souris déficientes en intégrine β_1 ou β_7 ne présentent pas de défaut hématopoïétique majeur, on observe seulement une légère altération du nombre et de la localisation des progéniteurs (Bungartz et al. 2006). Comme mentionné précédemment le KO de $\alpha_4\beta_1$ a permis de confirmer l'importance de l'axe $\alpha_4\beta_1/VCAM1$ dans la rétention des CSHs dans la moelle osseuse (Priestley, Ulyanova, and Papayannopoulou 2007; Papayannopoulou et al. 1995). De façon concomitante, le cotraitement avec des anticorps bloquants anti $\alpha_4\beta_1$ et anti β_2 augmente la mobilisation des CSH chez le singe. On observe une augmentation exponentielle de la mobilisation des CSHs chez des souris déficientes en β_2 (CD18) et traitées avec un anticorps $\alpha_4\beta_1$ bloquant (Papayannopoulou et al. 2001). D'autre part, la délétion conditionnelle de β_3 chez la souris induit une augmentation des progéniteurs circulants et un défaut dans le nichage des CSHs ainsi que dans leur potentiel de greffe à court terme (L. M. Scott, Priestley, and Papayannopoulou 2003). Ces données prouvent que l'activité adhésive des intégrines est essentielle pour le maintien des CSH dans leur niche.

C Les cadhérines

A ce jour le rôle des cadhérines dans la biologie des CSHs reste sujet à controverse. En effet les différentes études autour des souris déficientes en N-cadhérines n'apportent guère de réponses concluantes (Kiel et al. 2009, 200; Bromberg et al. 2012). Néanmoins il semble que la N-cadhérine ne serait pas essentielle pour l'hématopoïèse à l'état basal mais aurait probablement un rôle dans l'hématopoïèse post myéloablation (Haug et al. 2008).

D Les molécules de la superfamille des immunoglobulines

Le rôle des Ig CAMs dans l'hématopoïèse normale a très peu été adressé par l'intermédiaire des modèles de souris transgéniques. D'une part, il n'y a pas toujours de phénotypes apparents associés à la délétion d'une Ig CAM (ex ALCAM (Weiner et al. 2004)). D'autre part, certaines Ig CAMs sont impliquées dans de nombreuses voies

développementales et le KO de ces molécules est associé à une augmentation de la mortalité embryonnaire et/ou des à effets secondaires importants. Par exemple, la délétion de VCAM-1 est associée à une mortalité embryonnaire augmentée (Kwee et al. 1995), démontrant l'importance de l'utilisation des KO conditionnels afin d'étudier le rôle des molécules d'adhésion dans l'hématopoïèse adulte (Terry et al. 1997). Ainsi par l'utilisation d'un modèle Tie2-Cre VCAM^{fl/fl} le groupe de Papayannopoulou montra que la délétion conditionnelle de VCAM-1 induit une augmentation des cellules B dans la moelle osseuse. Plus intéressant encore, le nombre de progéniteurs circulants est augmenté dans les souris déficientes en VCAM-1, suggérant un rôle de VCAM-1 dans la rétention des CSHs dans la moelle osseuse. Cependant VCAM-1 étant exprimée à la fois sur les CSHs mais aussi sur les cellules de la niche, il est donc impossible de savoir si la perte de VCAM-1 sur les CSHs ou sur les cellules de la niche est responsable de la mobilisation des CSHs (Ulyanova et al. 2005). Concernant la famille des JAMs il a été montré que la délétion de JAM-C est associée à une augmentation des progéniteurs myéloïdes (Praetor et al. 2009). Entre temps, notre équipe a montré que les souris déficientes en JAM-B présentaient un compartiment de CSH quiescentes diminué, ce phénotype étant associé à la perte d'interaction entre JAM-C et JAM-B (Arcangeli et al. 2011). Enfin, bien que JAM-4 et JAM-A soient exprimées par les CSHs leur délétion n'entraine pas de défaut hématopoïétique sévère suggérant que toutes les JAMs ne sont pas essentielles au bon déroulé de l'hématopoïèse (Nagamatsu et al. 2006; Cera et al. 2004).

Chapitre 2 L'hématopoïèse pathologique

I Les Hémopathies myéloïdes

1 Généralités

Les hémopathies malignes, anciennement appelées « cancers du sang » sont des tumeurs dont l'origine est le tissu hématopoïétique. Elles sont caractérisées par des défauts majeurs de prolifération et/ou de différenciation des cellules sanguines. Ces anomalies peuvent aussi bien affecter les cellules lymphoïdes (hémopathies lymphoïdes) et myéloïdes (hémopathies myéloïdes). Par la suite, je traiterai essentiellement des hémopathies myéloïdes à savoir les leucémies aigues myéloïdes, les syndromes myéloprolifératifs et les syndromes myélodysplasiques.

2 Leucémies Aigues myéloïdes (LAM)

La leucémie aigüe myéloïde (LAM) est le versant pathologique de la myélopoïèse. La LAM est caractérisée par une prolifération anormale de cellules immatures et indifférenciées que l'on appelle des blastes. L'étymologie du terme « leucémie » vient du grec leukos (blanc) et haima (sang). Cette pathologie fut décrite pour la première fois en 1845 par Rudolf Virchow. Il constata un envahissement du sang par des globules blancs qu'il appela « sang blanc » (wuss blut en allemand). L'évolution des outils microscopiques ainsi que les travaux de Paul Ehrlich sur la coloration des tissus a permis de classer les différents types de leucémies en fonction des lignées cellulaires atteintes. De nos jours, la classification des LAM repose sur deux grands systèmes : le système franco-américano-britannique (FAB) et le système de l'organisation mondiale de la santé (OMS). La classification FAB repose sur l'aspect morphologique des blastes observés au microscope. Elle tient compte du type de cellule d'où est partie la leucémie et de son stade de différenciation. Cette classification permet de distinguer 9 sous types de LAM allant de M0 à M7 (Tableau 2). La classification de l'OMS, plus récente que celle de la FAB, se base à la fois sur la morphologie des blastes mais aussi sur les anomalies cytogénétiques associées à la LAM. On distingue ainsi les 6 grands sous-types suivants : les LAM avec des anomalies génétiques récurrentes, les LAM avec changements liés à la myélodysplasie, les LAM liées aux traitements, les LAM non classées ailleurs, les sarcomes myéloïdes et les LAM associées à un syndrome de Down (Tableau 3) (Arber et al. 2016).

Sous-type FAB	Nom Usuel
MO	LAM avec différenciation minimale
M1	LAM sans maturation
M2	LAM avec maturation
M3	Leucémie aigue promyélocytaire (LPM)
M4	Leucémie aiguë myélomonocytaire
M4Eo	Leucémie aiguë myélomonocytaire avec éosinophilie
M5	Leucémie aiguë monocytaire, ou monoblastique
M6	Leucémie érythroblastique aiguë, ou érythroleucémie
M7	Leucémie aiguë mégacaryocytaire, ou megakcaryoblastique

Tableau 2 Classification des LAM d'après la FAB

A Diagnostic, facteurs de risques, incidence et survie

D'un point de vue clinique, il n'existe pas de symptôme pathognomonique dans la LAM. Les patients atteints de LAM présentent des symptômes liés à une insuffisance médullaire sévère tels que la fatigue, l'essoufflement et la pâleur. En cas de suspicion de LAM, le clinicien va effectuer une numération formule sanguine (NFS) dans le but de repérer une anémie, une leucopénie ou encore une thrombopénie. Généralement la NFS d'un patient atteint de LAM présente une diminution des globules rouges, des plaquettes et des polynucléaires. La présence de blastes circulants peut également conduire à une augmentation anormale du nombre de globules blancs. Cependant la NFS seule ne permet pas de poser le diagnostic de LAM. Il faut alors effectuer une biopsie de moelle osseuse dans le but de réaliser un myélogramme. Cet examen consiste à observer les cellules de la moelle osseuse avec un microscope pour y constater la présence de blastes. Dans la moelle osseuse on retrouve normalement de 1 à 5 % de blastes. Le diagnostic de LAM est confirmé si le nombre de blastes médullaires excède les 20%. Bien que le myélogramme soit l'examen clé pour poser le diagnostic de LAM, le clinicien possède un arsenal d'outils lui permettant de mieux caractériser la maladie. La cytométrie en flux, les analyses cytogénétiques, le compte

d'ARN (nCounter Nanostring) et le séquençage à haut débit sont autant de techniques qui permettent de mieux affiner le diagnostic et le pronostic des patients.

Il existe plusieurs facteurs de risque associés au développement leucémique. Parmi ces facteurs, on peut citer les anomalies chromosomiques telles que la trisomie 21 ou encore des mutations associées à d'autres maladies rares (anémie de Fanconi, neurofibromatose...). Il y a également des facteurs de risque non génétiques tels que les radiations ionisantes, (incidence accrue de LAM chez les survivants des bombardements de Hiroshima et Nagasaki et les travailleurs du nucléaire), le tabagisme ou encore les chimiothérapies.

Selon santé publique France, l'incidence de la LAM est de 5.7 pour 100 000 habitants en 2018 (3.1 en taux standardisé monde). L'âge médian au diagnostic est de 69 ans pour les hommes et 72 ans pour les femmes (SPF n.d.). La LAM est un cancer avec un pronostic plutôt défavorable (lié notamment à l'âge des patients) et on estime que la survie nette à 5 ans est de 21%. Généralement les traitements permettent d'atteindre un taux de 80% de rémission complète. Malheureusement, une fraction de cellules est souvent chimiorésistante, on parle alors de maladie résiduelle (MRD). La MRD est responsable des phénomènes de rechute souvent observés dans la LAM.

Tableau 3 Classification des LAM d'après l'OMS en 2016

LAM avec anomalies genetiques recurrentes
LAM avec t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
LAM avec inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11
LPM avec PML-RARA
LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
LAM avec t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
LAM (megakaryoblastique) with t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
Entité provisoire : LAM avec BCR-ABL1
LAM avec NPM1 muté
LAM avec la mutation bi allélique CEBPA
Entité provisoire : LAM avec RUNX1 muté
LAM avec changements liés à la myélodysplasie
LAM liées aux traitements
LAM non classées ailleurs
LAM avec différenciation minime
LAM sans maturation
LAM sans maturation LAM avec maturation
LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélomonocitaire
LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélomonocitaire Leucémie aigüe monoblastique/monocytaire
LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélomonocitaire Leucémie aigüe monoblastique/monocytaire Leucémie érythroïde pure
LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélomonocitaire Leucémie aigüe monoblastique/monocytaire Leucémie érythroïde pure Leucémie aigüe megakaryoblastique
LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélomonocitaire Leucémie aigüe monoblastique/monocytaire Leucémie érythroïde pure Leucémie aigüe megakaryoblastique LAM à composante basophile
LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélomonocitaire Leucémie aigüe monoblastique/monocytaire Leucémie érythroïde pure Leucémie aigüe megakaryoblastique LAM à composante basophile LAM avec myélofibrose
LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélomonocitaire Leucémie aigüe monoblastique/monocytaire Leucémie érythroïde pure Leucémie aigüe megakaryoblastique LAM à composante basophile LAM avec myélofibrose
LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélomonocitaire Leucémie aigüe monoblastique/monocytaire Leucémie érythroïde pure Leucémie aigüe megakaryoblastique LAM à composante basophile LAM avec myélofibrose Sarcome myéloïde LAM associées à un syndrome de Down
LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aigüe myélomonocitaire Leucémie aigüe monoblastique/monocytaire Leucémie érythroïde pure Leucémie aigüe megakaryoblastique LAM à composante basophile LAM avec myélofibrose Sarcome myéloïde LAM associées à un syndrome de Down Myélopoïèse anormale transitoire

B Outils de diagnostic et stratification des patients

La stratification des patients est essentielle pour la prise en charge de patients atteints de LAM. La stratification consiste à explorer différentes caractéristiques (anomalies chromosomiques, mutations, biomarqueurs...) afin de classer les patients dans différentes catégories de risque. Cette étape permet d'améliorer la prise en charge des patients et de choisir le meilleur traitement possible.

La cytométrie est un outil de premier choix pour l'analyse des LAM. Elle permet d'étudier les antigènes de surface présents sur les blastes. L'utilisation du CD34 et du CD38 indique le niveau de maturité de la LAM, tandis que le CD33 confirme le caractère myéloïde de la LAM. Ainsi de nombreux biomarqueurs pronostics dans la LAM ont pu être découverts tels que les intégrines $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/Mac1), α_2 , α_6 et $\alpha_4\beta_1$ (Graf et al. 2006; Lian et al. 2018; Yamakawa et al. 2012; Matsunaga et al. 2003), JAM-C (De Grandis et al. 2017) ou encore CD44 (Legras et al. 1998). La cytométrie présente l'avantage d'être une technique simple et rapide. Néanmoins, à l'heure actuelle il existe peu d'études sur la corrélation entre biomarqueurs et réponse aux traitements. De plus la LAM est une maladie très hétérogène, les patients présentant souvent des profils immunophénotypiques assez différents. De ce fait la cytométrie reste à ce jour un outil plus utilisé en hématologie expérimentale qu'en clinique (hormis certains marqueurs plus « homogènes » tels que CD34, CD13, CD38 ou CD33).

En revanche les approches génétiques sont très utilisées en clinique car elles permettent à la fois de stratifier les patients et d'adapter leurs traitements (Estey 2018). On distingue trois grandes techniques : la cytogénétique, les puces à ADN et le séquençage haut débit (NGS). La cytogénétique regroupe un ensemble de techniques (caryotype, FISH) permettant d'étudier les défauts chromosomiques tels que les inversions, les délétions ou les translocations chromosomiques sans extraire l'ADN. Les puces à ADN et le NGS permettent de trouver des mutations génétiques après extraction de l'ADN génomique. Il existe un grand nombre de mutations et d'anomalies chromosomiques associées à la LAM. Toutes ces données ont permis en 2017 à un groupe d'expert de stratifier les patients en trois groupes pronostics : favorable, intermédiaire et défavorable en fonction des anomalies constatées (Döhner et al. 2017)**(Tableau 4).**

La compilation de ces données a permis d'élaborer des algorithmes basés sur la cytogénétique, la génomique, les données cliniques, l'âge afin de prédire l'évolution clinique des patients. Cependant il y a un manque de recul concernant ces modèles algorithmiques et ils ne sont utilisés en clinique qu'à titre indicatif (Estey 2018; Papaemmanuil et al. 2016). L'intérêt pour l'élaboration d'outils pronostiques dans la LAM demeure grandissant. En 2016, l'Equipe de J.Dick élabore un score pronostique basé sur l'expression de 17 gènes (LSC17) associés au caractère souche des cellules initiatrices de leucémie (Ng et al. 2016). Cette signature permet d'attribuer un score à chaque patient. En fonction de ce score le clinicien choisira la meilleure alternative thérapeutique pour son patient (traitements standard, essais cliniques...). Actuellement cette signature est utilisée en routine dans plusieurs centres américains et européens. L'élaboration de ces modèles démontre une volonté de la part des oncohématologues d'aller vers une médecine encore plus personnalisée avec des prises de décisions facilitées.

Catégorie	Anomalies Génétiques
	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
Favorable	inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
	NPM1 muté sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD ^{faible}
	CEBPA muté bi allélique
	NPM1 muté et FLT3-ITD ^{élevé}
Intermédiaire	<i>NPM1</i> sauvage sans <i>FLT3</i> -ITD ou avec FLT3-ITD ^{faible} (sans risque génétique défavorable)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
	Anomalies cytogénétiques non classées comme favorables ou défavorables
Défavorable	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> réarrangé
	t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EVI1)
	−5 or del(5q); −7; −17/abn(17p)
	Caryotype complexe, caryotype monosomique
	NPM1 sauvage avec FLT3-ITD ^{élevé}
	RUNX1 muté
	ASXL1 muté
	TP53 muté

Tableau 4 Classification ELN2017 des LAM selon leurs anomalies génétiques

C Les mutations associées à la LAM

Au début des années 2000 les 6 principales caractéristiques du cancer ont été décrites : prolifération, immortalité cellulaire, angiogenèse, résistance à la mort cellulaire, capacité d'invasion métastatique et inhibition des signaux suppresseurs de prolifération. Ces caractéristiques permettent aux tumeurs de proliférer et de se disséminer (D. Hanahan and Weinberg 2000). Une révision de ces caractéristiques a été faite 11 années plus tard, ajoutant 5 nouvelles caractéristiques aux six anciennes : 1) la reprogrammation métabolique, 2) l'échappement immunitaire, 3) l'inflammation,

4) l'instabilité génomique et 5) les mutations (Douglas Hanahan and Weinberg 2011). L'instabilité génomique et les mutations sont à l'origine de l'acquisition de nouvelles caractéristiques par les cellules tumorales et sont largement responsables de l'hétérogénéité tumorale. En d'autres termes, si l'on devait hiérarchiser ces caractéristiques c'est l'instabilité génomique qui en serait l'apex. Comparée aux autres cancers, la fréquence des mutations dans la LAM est relativement faible (Figure 14) (M. S. Lawrence et al. 2013). Cette observation est confirmée par le faible nombre de fonctions biologiques altérées par les mutations dans la LAM (Döhner et al. 2017; Papaemmanuil et al. 2016; Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013) (Voir Tableau 5). Ces mutations influent sur la prolifération cellulaire ou la différenciation hématopoïétique dans la grande majorité des cas. Une étude princeps publiée en 2016 a identifié 5234 mutations drivers à travers 76 gènes (ou régions génomiques) avec des occurrences plus ou moins importantes (Papaemmanuil et al. 2016). Sur les 1540 patients analysés en NGS 96% possédaient au moins une mutation driver et 86% en possédaient au moins deux. Peu de mutations sont très récurrentes dans la LAM hormis les mutations de DNMT3A, NPM1 et FLT3 qui sont retrouvées chez 25 à 30% des patients (Figure 15) (Papaemmanuil et al. 2016; Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013). Dans certains cas la présence d'une seule mutation peut être associée à une valeur pronostique (RUNX1, ASXL1) (Döhner et al. 2017). Parfois c'est la co-occurrence de mutations qui sera associée à un impact pronostic : par exemple la triple mutation DNMT3A^{Mut}, NPM1^{Mut} et FLT3-ITD est de très mauvais pronostic (Döhner et al. 2017; Papaemmanuil et al. 2016). Enfin certaines mutations sont mutuellement exclusives c'est le cas par exemple des mutations TET2 et IDH1/2 probablement car elles conduisent aux mêmes conséquences (ici une hyperméthylation de l'ADN) (DiNardo and Cortes 2016). L'établissement de la cartographie du paysage mutationnel de la LAM a permis de faire des progrès considérables dans la compréhension du rôle des mutations dans la leucémogénèse. Ces progrès ont permis d'élaborer une nouvelle génération de traitement pour lutter contre la LAM (DiNardo and Cortes 2016).

<u>Tableau 5</u> Voies de signalisation les plus fréquemment mutées dans la LAM avec la fréquence d'occurrence et les gènes impliqués.

Classe fonctionnelle	Frequence (%)	Gènes impliqués
Kinase et signalisation	59	FLT3, KRAS, NRAS, KIT, PTPN11 et NF1,
Epigénétique	44	DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2, ASXL1, EZH2 et MLL/KMT2A
Nucleophosmine	27	NPM1
Facteurs de transcriptions	18	CEBPA, RUNX1, et GATA2
Spliceosome	14	SRSF2, U2AF1, SF3B1, et ZRSR2
Cohésine	13	RAD21, STAG1, STAG2, SMC1A et SMC3
Gène suppresseur de tumeurs	6	TP53

Adapté de Di Nardo 2016, Papaemmanuil, 2016 et Cancer Genome Atlas 2013



Figure 14 Fréquence des mutations somatiques observées dans la LAM comparée aux autres cancers :

Chaque point correspond à une tumeur, l'axe des ordonnées indique la fréquence totale de mutations dans l'exome. Les tumeurs ayant la plus faible fréquence de mutation sont situé à gauche. Adapté de Lawrence 2013.



Figure 15 Les principales mutations dans la LAM.

Représentation schématique des principales mutations retrouvées dans la LAM et leurs conséquences physiopathologiques. La duplication en tandem du domaine juxta membranaire de la tyrosine kinase FLT3 conduit à son activation constitutive, entrainant une augmentation de la prolifération cellulaire. DNMT3A est une méthyltransférase dont la mutation entraine une diminution de la méthylation de certain promoteur génique dont certain régulant l'expression de gène suppresseur de tumeurs ou la différenciation. La mutation de NPM1 entraine son accumulation dans le cytoplasme (NPM1c) ayant pour conséquence d'inhiber l'apoptose et d'activer la prolifération cellulaire via c-Myc. Les formes mutées de IDH1/2 catalysent la conversion de l'isocitrate en D-2-Hydroxyglutarate (2-HG) inhibant l'activité de TET2 et entrainant une hyperméthylation de l'ADN.

D Les oncogènes dans la LAM

Les oncogènes sont les produits de mutations, d'amplifications géniques ou de translocations chromosomiques et codent pour des onco-protéines qui favorisent

l'apparition de tumeur. Dans la LAM, les oncogènes influent sur la prolifération, la différenciation, l'apoptose et l'activité d'autorenouvèlement.

a <u>Les fusions MLL :</u>

Le gène MLL (Mixed lignage leukemia) est porté par le chromosome 11g23 qui est la cible récurrente de translocations souvent observées dans les leucémies aigues myéloïdes et lymphoblastiques (LAL) (Ziemin-van der Poel et al. 1991). Les gènes de fusion MLL résultant de ces réarrangements sont retrouvés dans 5 à 10% des LAM de l'adulte et sont associés à un pronostic défavorable (Schoch et al. 2003). A ce jour, 135 partenaires de fusion MLL ont été décrits, mais seules 8 fusions représentent 85% des réarrangements MLL retrouvés dans la LAM (Tableau 6) (Meyer et al. 2018). La protéine MLL est une méthyltransférase catalysant la méthylation de l'histone H3-Lys-4 (H3K4) qui supporte la transcription des gène cibles de MLL (notamment les facteurs de transcription hox) (Andrei V. Krivtsov and Armstrong 2007). En épigénétique, la modification des histones est associée soit à l'activation soit à la répression génique (Musselman et al. 2012). L'effet de la méthylation des histones sur l'expression génique est contexte dépendant, la méthylation de H3K4 active l'expression génique (Schübeler et al. 2004). La protéine MLL est essentielle à l'hématopoïèse embryonnaire et le KO conditionnel de MLL a démontré son rôle dans le maintien de l'activité souche des CSHs (McMahon et al. 2007). Dans le contexte leucémique, les protéines de fusions MLL sont capables de recruter la méthyltransférase DOTL1 qui catalyse la méthylation de l'histone H3-Lys-79 (H3K79) entrainant l'expression aberrante des gènes régulateurs de l'auto-renouvellement, Hoxa9 et Meis1 (Bernt et al. 2011; Andrei V. Krivtsov and Armstrong 2007).

Ces réarrangements sont également retrouvés dans les LAL de l'adulte, cependant leur distribution est totalement différente. Par exemple, dans la LAL de l'adulte, la fusion majoritaire est la fusion MLL-AF4 (80%), tandis que la fusion MLL-AF9 est minoritaire (±1%) (Meyer et al. 2018). De façon surprenante, on constate une fréquence élevée de la fusion MLL-AF9 dans la LAL pédiatrique (Meyer et al. 2018). Ceci peut s'expliquer par le fait que les programmes épigénétiques des CSHs évoluent avec l'âge (Sun et al. 2014) ou que le partenaire de fusion de MLL régule aussi la transformation leucémique.
Evènement	Chromosomes impliqués	Fusion	Fréquence (%)
Duplication en tandem	Dup(11q23)	MLL-PTD	26
	t(9;11)(p22;q23)	MLL-AF9	24
	t(11;19)(q23;p13.1)	MLL-ELL	12
	t(6;11)(q27;q23)	MLL-AF6	10
Translocations	t(10;11)(p12;q23)	MLL-AF10	9
	t(11;19)(q23;p13.3)	MLL-ENL	4
	t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	1
	t(1;11)(p32;q23)	EPS15	1

Tableau 6 les principaux réarrangement MLL dans la LAM

b <u>C-myc :</u>

C-myc est un facteur de transcription appartenant à la famille des helix-loop-helix leucine zipper régulant positivement la prolifération et la différentiation cellulaire (Delgado et al. 2013). Dans le système hématopoïétique murin, la délétion conditionnelle de c-myc induit un blocage de différentiation des CSHs (Wilson et al. 2004). Les dérégulations de c-myc ont été observées pour la première fois dans le lymphome de Burkitt (Hémopathie lymphoïde) (Dalla-Favera et al. 1982). Dans la plupart des lymphomes de Burkitt le gène de c-myc est transloqué dans le locus de la chaine lourde des immunoglobulines (IgH). Cette translocation induit une prolifération excessive des cellules B due à l'expression constitutive de myc sous le contrôle du locus IgH (Cory 1986). Ces observations ont permis de développer un modèle de lymphome murin où l'expression de c-myc est sous le contrôle du promoteur Eu (enhancer des IgH). Les souris Eµ-myc développent spontanément des lymphomes B quelques mois après leur naissance (Adams et al. 1985). Le rôle de myc dans les hémopathies myéloïdes a beaucoup moins été exploré que dans les hémopathies lymphoïdes. Néanmoins, l'expression de c-myc est associé à un pronostic défavorable dans la LAM (Ohanian et al. 2019). Il semblerait que dans la LAM, c-myc agisse comme un régulateur épigénétique en modulant l'expression de EZH2 (Salvatori et al. 2011). Une autre étude a également montré que c-myc co-opère avec la fusion MLL-ELN pour induire un blocage de différentiation (Schreiner et al. 2001).

c <u>Mecom/EVI1 :</u>

EVI1 est un facteur de transcription en doigt de zinc porté par le chromosome 3q26 essentiel pour la maintenance et la survie des CSH (Kataoka et al. 2011). Dans la LAM, le chromosome 3q26 est la cible fréquente de réarrangements conduisant à une surexpression de EVI1 associé à un pronostic très défavorable (8-10%) (Glass et al. 2014; Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003). EVI1 participe à la transformation leucémique en bloquant la différentiation hématopoïétique et en inhibant l'apoptose (Glass et al. 2014). EVI1 est une cible transcriptionnelle de MLL, en ce sens EVI1 est retrouvée surexprimé dans 20 à 43% des LAM avec réarrangement MLL et le KO de EVI1 réduit la survie des blastes MLL^{Pos} (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003; Bindels et al. 2012). Ces observations ont été confirmées par les modèles souris exprimant la fusion MLL-AF9 (Stavropoulou et al. 2016).

E Traitements

a Les traitements historiques de la LAM

Le traitement standard de la LAM repose sur une polychimiothérapie (cytarabine et anthracycline) d'induction suivie par une chimiothérapie de consolidation. L'induction suit un protocole 7+3, avec 7 jours de traitement continu avec de la cytarabine suivis de 3 jours de daunorubicine (Dombret and Gardin 2016). L'autre traitement de référence dans la LAM est la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HCT). Il faut remonter à 1957 pour trouver la trace du premier essai de greffe de moelle osseuse chez l'homme avec des résultats décevants (les receveurs étant décédés en moins de 3 mois) (E. D. Thomas et al. 1957). Il faudra attendre 1958 et la découverte par Jean Dausset du complexe majeur d'histocompatibilité humaine (CMH) pour comprendre le phénomène de rejet expliquant l'échec des greffes en 1957 (Dausset 1958). Grace à cette découverte Georges Mathé parvient pour la première fois à transplanter une moelle osseuse chez des patients irradiés accidentellement (4 des 5 patients ont survécu à la greffe) (Mathe et al. 1959). Cet évènement fut un succès retentissant à travers le monde permettant des progrès considérables notamment

dans le traitement des patients atteints de leucémie. De nos jours près d'un tiers des HCT concerne des patients atteints de LAM (Kassim and Savani 2017). L'HCT est un traitement de consolidation post-rémission utilisé chez les patients de risque intermédiaire après la première rémission complète (RC1). L'HCT est aussi indiquée pour les patients présentant un fort risque de rechute après la RC1 (Kassim and Savani 2017). A l'inverse les patients de risque favorable sont inéligibles à l'HCT car peu sujets aux rechutes. Il en est de même des patients réfractaires quand la chimiothérapie n'induit pas de RC. L'HCT reste le traitement de consolidation possédant la plus forte activité anti-leucémique. Cependant environ 40% des patients rechutent après une HCT et la survie à 2 ans de ces patients est inférieure à 20% (Tsirigotis et al. 2016). C'est pourquoi il est essentiel de pouvoir suivre la MRD (CMF, NGS...) chez les patients greffés dans le but de prédire le risque de rechute post-HCT.

b <u>Les traitements ciblés de nouvelle génération</u>

Durant des décennies, il y a eu très peu d'évolution dans la prise en charge des patients atteints de LAM. La première grande évolution thérapeutique eut lieu en 2013 avec l'utilisation de l'acide rétinoïque et de l'arsenic trioxyde pour traiter les LAM promyélocitaires (M3) (Lo-Coco et al. 2013). Plus récemment, des traitements ciblant les voies de signalisation altérées par les mutations ont été développés et autorisés par la Food and Drug Administration (FDA).

Inhibiteurs de FLT3 : Midaustaurine & Gilteritinib

La Midaustaurine est un inhibiteur de tyrosine kinase efficace sur les patients atteints de mutations de FLT3 qui exacerbent son activité de "récepteur tyrosine kinase". La mutation FLT3-ITD (duplication en tandem du domaine juxta membranaire) induit une activation constitutive de FLT3 entrainant une prolifération cellulaire incontrôlée (Figure 15). La mutation FLT3-ITD est retrouvée chez 25 à 30% des patients atteints de LAM. La Midaustaurine permet d'inhiber l'activité de FLT3-ITD (et TKD). Elle réduit le risque de rechute et permet d'augmenter la survie sans évènements (EFS) (Stone et al. 2017). Ce traitement est approuvé par la FDA le 28 avril 2017 pour tous les patients avec une LAM FLT3 mutée tous âges confondus. La Midaustaurine n'étant pas un inhibiteur spécifique de FLT3-ITD, ce traitement pourrait être efficace sur des LAM non mutées FLT3 (Estey 2018). Le 29 mai 2019, à la suite des résultats de l'essai clinique ADMIRAL (NCT02421939) le Gilteritinib devient le second inhibiteur FLT3

approuvé par la FDA pour le traitement des LAM rechutées et réfractaires FLT3 mutées. Les résultats de l'essai ADMIRAL ont permis de montrer une augmentation de la survie globale des patients traités avec le Gilteritinib (9.3 mois) comparé aux patients traités avec la chimiothérapie standard (5.6 mois) (Perl et al. 2019) (Figure 16).

Gemtuzumab ozogamicine (GO) :

Le GO est un anticorps anti CD33 combiné avec la toxine caleacheamicine. Le CD33 est souvent exprimé à la surface des blastes (également sur les cellules myéloïdes normales) mais pas sur les autres cellules normales. Utilisé seul le GO est particulièrement efficace pour les LAM M3 mais très peu efficace sur les autres LAM (13% de rémission complète (RC)). Comme la midaustaurine le GO est utilisé en combinaison avec la chimiothérapie. En combinaison avec la chimiothérapie, le GO permet de réduire le risque de rechute et améliore la survie à 5ans des patients ayant des profils cytogénétiques favorables et intermédiaires (Hills et al. 2014). Cette molécule a été approuvée par la FDA le 1^{er} septembre 2017 pour tous les patients avec des LAM CD33⁺ (Estey 2018). Actuellement, d'autres anti CD33 sont en cours d'investigation afin d'améliorer leur efficacité (Walter 2018) (**Figure 16**).

CPX351 (« Vyxeos »)

Le CPX351 est une formulation liposomale de cytarabine et daunorubicine fixé à un ratio 5:1 M (optimisé durant les essais précliniques). L'encapsulation liposomale permet une diffusion prolongée des deux drogues (Nikanjam et al. 2018). Les essais cliniques sur le CPX ont été conduits sur des LAM secondaires (post myélodysplasie (MDS) et traitements) et réfractaires. Le CPX améliore la RC, l'EFS et la survie globale (Lancet et al. 2018). Le CPX est approuvé par la FDA le 3 Aout 2017 pour les patients atteints de LAM secondaire (**Figure 16**).

Décitabine azacytidine.

La décitabine et l'azacytidine sont des agents hypométhylants qui agissent sur les méthyls transférases. L'hypométhylation de certains promoteurs induit la réactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Par ailleurs ils induisent également la différenciation cellulaire et l'apoptose (Malik and Cashen 2014). Les différents essais cliniques avec ces molécules ont montré une bonne efficacité sur la survie globale et

Ia RC chez les patients âgés (≥65 ans) inéligibles aux traitements standards (Dombret et al. 2015; Malik and Cashen 2014). Ces 2 molécules ont été approuvées en Europe pour le traitement de la LAM chez les patients âgés de plus de 65 ans. En revanche la FDA n'a approuvé ces molécules que dans le traitement des SMD (sauf en combinaison avec le venetoclax) (Figure 16).

Venetoclax :

Le venetoclax est un inhibiteur de la protéine anti-apoptotique BCL-2 responsable de certaines résistances aux traitements. La combinaison du venetoclax avec la décitabine (ou azacytidine) améliore de façon considérable la RC des patients âgés (≥75 ans), avec des caractéristiques cytogénétiques intermédiaires et défavorables, ne pouvant pas supporter les traitements « standards » (DiNardo et al. 2019). La FDA a approuvé la combinaison venetoclax + décitabine/azacytidine (28 janvier 2016) ou + cytarabine à faible dose (28 juillet 2017) pour les patients inéligibles aux thérapies intensives (Figure 16).

Enasidenib et Ivosidenib :

L'Enasidenib et l'Ivosidenib sont des inhibiteurs de IDH2 et IDH1 (isocitrate déshydrogénase) respectivement. Des mutations de IDH1/2 sont retrouvées dans approximativement 20% des LAM. Physiologiquement les enzymes IDH1 et IDH2 catalysent la conversion de l'isocitrate en α -cétoglutarate (α KG) qui permet la déméthylation de l'ADN. Inversement les mutants IDH1/2 catalysent la conversion de l'αKG en D-2-Hydroxyglutarate (2-HG). L'accumulation de l'onco-métabolite 2-HG entraine l'inhibiton TET2, qui catalyse la déméthylation de l'ADN. Ainsi, l'inhibition de TET2 par le 2-HG entraine une hyperméthylation de l'ADN qui elle-même conduit à un blocage dans la différenciation hématopoïétique (Figure 15) (Figueroa et al. 2010). Ces molécules utilisées en monothérapie induisent des RC durables chez les patients mutés pour IDH1 ou IDH2 (30.3 % l'Ivosidenib et 23% l'Enasidenib) (Stein et al. 2017; DiNardo et al. 2018). Par ailleurs, la mutation IDH1 n'est plus détectable chez 20% des patients en RC après traitements avec l'Ivosidenib (DiNardo et al. 2018). Le 1^{er} Aout 2017 la FDA approuve l'utilisation de l'Enasidenib pour le traitement des LAM rechutées ou réfractaires avec une mutation IDH2. La FDA approuve l'utilisation de l'Ivosidenib le 2 mai 2019 pour les LAM de novo avec une mutation IDH1. Récemment, un essai clinique a montré qu'en combinaison avec l'Azacytidine l'Ivosidenib induit la disparition de la mutation IDH1 chez 70% des répondeurs (DiNardo et al. 2021) (Figure 16).

F Les LAMs secondaires

En oncohématologie on distingue les LAM *de novo* (i.e. sans antécédent connu) des LAM secondaires (sLAM). Les LAM peuvent émerger après une autre hémopathie maligne (SMD, LMC...) ou à la suite d'une chimiothérapie visant à soigner un autre cancer, on parle alors sLAM. Les sLAM sont caractérisées par une survie globale beaucoup plus faible, un fort taux de rechute et une moins bonne réponse aux traitements d'induction. Le profil mutationnel des sLAM est très différent des LAM de novo reflétant le caractère évolutif de cette maladie. Ceci indique que la sLAM est une entité différente de la LAM *de novo* possédant ses propres caractéristiques biologiques (Sperling, Gibson, and Ebert 2017).



Figure 16 Les traitements anti-leucémiques de nouvelle génération.

Représentation schématique des voies de signalisation ciblées par les traitements de nouvelles génération approuvés par la FDA.

3 Les néoplasmes myéloprolifératifs

Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) sont des maladies chroniques associées à une production anormale de cellules morphologiquement et fonctionnellement matures. L'excès de ces cellules dans le sang peut entrainer des complications graves telles que des thromboses, des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou des infarctus. Les NMP regroupent la polyglobulie de Vaguez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), la myélofibrose primitive (MP) et la leucémie myéloïde chronique (LMC) (Tefferi and Vardiman 2008). La PV se caractérise par une production excessive de globules rouges entrainant une polyglobulie et une augmentation de l'hématocrite. La TE est associée à une augmentation anormale de la lignée mégacaryocytaire. Les complications associées à la TE sont d'ordre vasculaire avec un risque accru de thrombose chez les patients atteints de cette maladie. La MP est caractérisée par un défaut du support de l'hématopoïèse c'est-à-dire la moelle osseuse. Chez les patients atteints de MP il y a un envahissement de la moelle osseuse par du tissu fibreux. Cet envahissement entraine une diminution de production des cellules sanguines avec pour conséquence fréquente une anémie. On constate également une splénomégalie car les CSHs qui ne peuvent plus se développer correctement dans la moelle osseuse vont coloniser la rate (hématopoïèse extra-médullaire). Le point commun à ces trois maladies est la récurrence de mutations (JAK2, CALR et MPL) conduisant à un emballement de la voie de signalisation JAK/STAT. L'accumulation de mutations secondaires entraine une évolution des NMP en sLAM (Lundberg et al. 2014) (10-20% des MP et 2% des PV à 10 ans (lurlo, Cattaneo, and Gianelli 2019)).

La CML est une entité à part dans la famille des NMP dans le sens où le driver oncogénique se distingue des autres NMP. La LMC est caractérisée par une prolifération anormale de granulocytes fonctionnellement immatures. Dans 95% des cas les CML sont la conséquence d'une translocation entre les chromosomes 22 et 9 que l'on appelle le chromosome de Philadelphie (Ph+) conduisant au gène de fusion oncogénique BCR-ABL (Figure 17). La protéine de fusion BCR-ABL possède une activité tyrosine kinase constitutivement active (c'est-à-dire ne nécessitant pas d'être activée par d'autres protéines). Cette activation constitutive induit notamment une augmentation de la prolifération cellulaire (PI-3K/Akt) une diminution de l'apoptose (Stat5) et de ce fait une forte instabilité génétique (Calabretta and Perrotti 2004). La LMC évolue en trois phases, une phase chronique avec une accumulation de

granulocytes différenciés mais fonctionnellement immatures, une phase d'accélération qui ressemble à une myélodysplasie avec une accumulation de progéniteurs immatures (myéloïdes et/ou lymphoïdes), puis une phase blastique associée à une accumulation de blastes indifférenciés et à des aberrations cytogénétiques (Kantarjian et al. 1987; Spiers 1995). La phase blastique marque le passage d'une maladie chronique à une maladie aigue c'est-à-dire un sLAM. Sans traitement la LMC va naturellement évoluer vers une sLAM.



Figure 17 Représentation schématique de la translocation conduisant au gène de fusion BCR-ABL.

La translocation réciproque entre le chromosome 9 et 22 conduit à la formation du chromosome de Philadelphie porteur du gène de fusion BCR-ABL responsable de 95% des LMC. Chr : chromosome ; Ph : Philadelphie

4 Les syndromes myélodysplasiques

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des hémopathies clonales qui touchent les CSH conduisant à des défauts hématopoïétiques. Les SMD sont des maladies chroniques caractérisées par des cellules hématopoïétiques dysplasiques, une insuffisance médullaire et des cytopénies (Arber et al. 2016). Initialement les SMD ont été classés par la FAB en 5 sous-types basés sur des caractéristiques à la fois cliniques et morphologiques. On retrouve l'anémie réfractaire, l'anémie réfractaire sidéroblastique, l'anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB), l'AREB en transformation et la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) (Heaney and Golde 1999). Cette classification a été revue par l'OMS une première fois en 2008 puis en 2016. **(Tableau 7)** (Arber et al. 2016). Les SMD sont également associés à des défauts cytogénétiques sévères tels que la trisomie (chromosome 8) la monosomie (chromosome 7) et des délétions (syndrome 5q) (Navarro et al. 2007; Giagounidis et

al. 2004; Musilova and Michalova 1988). D'un point de vue mutationnel les SMD sont fréquemment associés à des mutations de génes impliqués dans l'épissage (SF3B1, SRSF2) et dans le contrôle des modifications épigénétiques (TET2, ASXL1) (Sperling, Gibson, and Ebert 2017). Les SMD sont aussi des maladies évolutives car environ 30% des patients atteints de SMD développent une sLAM (Menssen and Walter 2020).

Tableau 7 Classification des SMD/NMP et SMD d'après l'OMS en 2016

Néoplasmes myélodysplasiques/myéloprolifératifs (SMD/NMP)
Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)
Leucémie myéloïde chronique atypique (aLMC), BCR-ABL1 ⁻
Leucémie myélomonocytaire juvénile chronique (LMMJ)
SMD/NMP sidéroblastique et thrombocytose (SMD/NMP-RS-T)
SMD/NMP inclassifiables
Syndrome myélodysplasiques (SMD)
SMD avec dysplasie uni lignée
SMD sidéroblastique (SMD-RS)
SMD-RS et dysplasie uni lignée
SMD-RS et dysplasie multi-lignée
SMD avec dysplasie multi-lignée
SMD avec blastes en excès
SMD avec de(5q) isolée
SMD, inclassifiable
Entité provisoire : cytopénie réfractaire de l'enfant

II Les modèles souris pour comprendre et étudier la LAM

1 La souris comme modèle d'étude de la LAM

En plus des aspects moléculaires, l'élaboration de modèles d'animaux leucémiques est essentielle pour élargir notre champ de connaissances sur la pathogénie de la LAM. Grâce à ces modèles, nous avons pu mieux comprendre les mécanismes d'initiation leucémique, découvrir les gènes impliqués dans la transformation leucémique tels que *Hoxa9*, *Meis1*, *Evi1* entres autres (Largaespada 2000). Enfin, la possibilité de manipuler l'expression de certains gènes au cours de l'initiation leucémique permet d'identifier et de valider de nouvelles cibles thérapeutiques afin de traiter la LAM humaine. Dans cette partie, j'aborderais les principales façons de générer ces modèles animaux. Dans un second temps je m'intéresserai plus particulièrement au modèle iMLL-AF9 (Stavropoulou et al. 2016) que j'ai utilisé au cours de ma thèse.

A Les techniques historiques

Historiquement, l'élaboration des premiers modèles animaux leucémiques remonte au milieu des années 50. La génération de ces souris reposait sur trois techniques principales, l'irradiation, l'infection virale et l'induction chimique (**Figure 18**).

L'induction chimique repose sur le traitement des souris avec un carcinogène proleucémique tels que le benzène (Kawasaki et al. 2009). En 1949, L.Law développe le modèle L1210 en traitant des cellules isolées de souris DBA/2 exposées à un antagoniste de l'acide folique (Law and Dunn 1949). Ces modèles ont permis d'étudier l'efficacité de la cytarabine pour le traitement des LAM (Chu and Fischer 1962). Ces modèles permettent également d'étudier l'effet d'un carcinogène sur le développement leucémique. L'induction chimique est petit à petit tombée en désuétude pour plusieurs raisons, la principale étant que l'apparition d'une LAM après induction est un phénomène rare et extrêmement latent.

Dans les années 50, plusieurs études font état d'un phénomène d'initiation leucémique induit par l'injection d'un surnageant cellulaire dans des souris venant de naitre (Gross 1951; 1953; Dulaney et al. 1957). Ces surnageants (sans cellule car filtrés) proviennent de la souche murine AK qui est connue pour développer spontanément des LAM (incidence 80/90%). Les chercheurs découvrent qu'a l'origine de ces leucémies se trouve un type de rétrovirus les virus de leucémies murines (MuLV). La première démonstration de l'existence de ces virus remonte à 1957 avec l'étude de C.Friend (Friend 1957). Comme leur nom l'indique ces virus sont capables d'induire la leucémie chez la souris avec une efficacité variable selon les souches murines. Les MuLV ont permis d'identifier certains oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs (Largaespada 2000). Expérimentalement, les MuLV sont injectés aux nouveaux nés

avant que leur système immunitaire ne puisse reconnaitre le virus pour le détruire. Dès lors, le virus va pouvoir se répliquer et infecter des millions de cellules et s'insérer dans le génome de l'hôte. Ces insertions vont déréguler certains gènes notamment les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. En clonant les sites d'insertions proviraux (séquence LTR) des MuLV dans les cellules leucémiques il est possible d'identifier les gènes responsables de la leucémogénèse (Kool and Berns 2009).

L'incidence de leucémie est également augmentée chez les personnes ayant été exposées à des rayonnements ionisants (RI) (Preston et al. 1994; Noshchenko, Bondar, and Drozdova 2010). L'induction par irradiation consiste à induire la LAM en irradiant des souris avec des rayonnements ionisants. Chez les souris, on observe la délétion interstitielle hémizygote du chromosome 2 sous l'effet des RI (perte d'hétérozygotie LOH) (Hayata et al. 1979). Chez la souris le Chr2 porte le gène Sfpi1 qui code pour le facteur de transcription PU.1 essentiel à l'hématopoïèse (E. W. Scott et al. 1994). Il a été proposé que la perte d'une copie de *Sfpi1* induite par les RI entraine l'apparition de la LAM suggérant que PU.1 est un gène suppresseur de tumeur (Cook et al. 2004). Une étude récente a démontré que la délétion d'une seule copie de Sfpi1 entraine l'apparition de clones pré leucémiques possédant un avantage prolifératif. Ces cellules vont acquérir une seconde mutation (mutation ponctuelle dans la copie de Sfpi1 restante) conduisant une expansion clonale et à la LAM (Verbiest et al. 2018). Bien que la latence d'apparition de la LAM dans ce modèle soit comparable à la latence d'apparition chez l'Homme, le rendement avec cette approche est mitigé (Tableau 8) (Rivina, Davoren, and Schiestl 2014).

Souche	Dose (Gy)	Latence (mois)	% de LAM	Références
RF	4.25	4-12	50	(Upton et al. 1958)
SJL/J	3-3.5	12	10-30	(Haran-Ghera, Kotler, and Meshorer 1967)
C3H/He	2.84	1.5-18	24	(Seki et al. 1991)
CBA	3	18-24	25	(Major and Mole 1978)

Tableau 8 les modèles de sour	s leucémiques	radio-induits
-------------------------------	---------------	---------------

Adapté de Rivina 2014

B Les souris transgéniques

La génération des modèles transgéniques de souris leucémiques découle des découvertes faites en médecine moléculaire notamment sur les mutations « drivers » de la LAM. L'approche la plus classique, est de générer un plasmide contenant le transgène désiré et une séquence régulatrice (promoteur). Par exemple, une construction dans laquelle la séquence régulatrice est le promoteur humain CD11b le transgène s'exprimera les cellules myéloïdes matures (Dziennis et al. 1995). Ensuite le plasmide est linéarisé avant d'être injecté dans le noyau d'ovocytes fertilisés qui sont ensuite transplantés dans des femelles pseudo-gestantes. Les principaux défauts de cette méthode dite « classique » est que i) l'insertion du transgène se fait de façon aléatoire dans le génome de l'hôte ii) le nombre de copie du transgène s'insérant dans le génome est aléatoire iii) les niveaux d'expression du transgène dépendent du site d'insertion du promoteur. Pour pallier ces défaut, l'alternative possible est de réaliser un « knock-in » dans un locus spécifique par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires de souris. Ces cellules sont ensuite injectées dans un blastocyste lui-même introduit dans une femelle pseudo-gestante (Figure 18). A l'instar des knock-out (cf. chapitre 1) l'expression du transgène est sous le contrôle d'un promoteur endogène permettant un meilleur contrôle des niveaux d'expression de ce dernier. On parle d'expression constitutive lorsque le transgène est exprimé tout au long du développement embryonnaire. Or, il est possible que certains transgènes puissent induire une forte mortalité embryonnaire (ex RUNX1-ETO dans le locus Aml1 (Rhoades et al. 2000). Afin de contourner ce problème, l'expression temporelle du transgène peut être contrôlée par un système inductible. Outre les systèmes inductibles Cre LoxP (cf. chapitre 1), le système Tet est également un système inductible permettant le contrôle de l'expression d'un transgène. Dans ce système l'expression du transgène est placée sous le contrôle d'un promoteur minimal (Tet Responsive Element (TRE)) reconnu par des protéines trans-activatrices (tTA et rtTA) sensibles à la tétracycline (Tet) et ses dérivées (doxycycline (DOX)) (Almosailleakh and Schwaller 2019). Dans le système TET-ON la protéine tTA (tetracycline transactivator) reconnait le TRE et induit l'expression génique. Dans ce système, l'ajout de la DOX va empêcher la tTA de se lier au TRE induisant la répression du gène cible. Inversement dans le système TET-OFF la protéine rtTA (reverse tetracycline transactivator) se lie au TRE après ajout de la DOX induisant ainsi l'expression du

gène (Gossen et al. 1995; Furth et al. 1994) (Figure 19). Les modèles inductibles permettent un contrôle temporel de l'expression du transgène chez la souris, de plus l'utilisation d'un promoteur inductible tissu spécifique (ex. Mx1-cre) permet un contrôle spatio-temporel de l'expression du transgène. L'utilisation de l'ensemble de ces outils a permis de générer de nombreux modèles de souris transgéniques développant « spontanément » des LAM (tableau 9).



Figure 18 Les méthodes pour générer des modèles murins de LAM.

A) les méthodes dîtes historique repose sur **i)** l'infection virale avec des virus murins de leucémies (MuLV) **ii)** l'induction de la LAM avec des rayonnements ionisants **iii)** l'inductions avec des carcinogènes. **B)** Les souris transgéniques sont générées en insérant un transgène « driver » de LAM dans le génome d'une souris. L'approche classique consiste à injecter le transgène directement dans le noyau d'un zygote fertilisé puis de transplanter ce dernier dans une femelle pseudo-gestante. L'autre approche consiste à insérer le transgène par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires de souris puis de les injecter dans un blastocyste qui est transplanté dans une femelle pseudo-gestante. **C)** Les techniques d'infections rétrovirales et d'édition génomique permettent d'induire l'expression d'un transgène « driver » dans des CSHs triés à partir d'une souris donneuse. Les cellules sont ensuite injectés par voie rétro-orbitale ou caudale à une souris receveuse irradiée qui pourra développer une LAM après un temps de latence variable selon le transgène. EP : électroporation ; CS : Cellules souches ; IR : irradiation. Adapté de Almosailleakh 2019.

Tableau 9 les modèles transgéniques de souris leucémiques

Année	Transgène	Expression	Promoteur	Inducteur	Phénotype	Référence
1997	PML-RARA	constitutive	hCG		Expansion des cellules myéloïdes. LAM avec 30% de pénétrance après une longue latence	(Grisolano et al. 1997)
1997	PML-RARA	constitutive	hMRP8		LMP (LAM M3)	(Brown et al. 1997)
2001	RUNX1-ETO	constitutive	hMRP8		AML seulement après traitement avec le carcinogène ENU	(Yuan et al. 2001)
2003	MLL-ENL	constitutive	MII		LAM avec une forte pénétrance et latence courte (médiane 50j)	(Forster et al. 2003)
2005	NUP98- HOXD13 (NHD13)	constitutive	Vav		MDS évoluant en LAM (31%) après une longue latence (10 mois)	(Lin et al. 2005)
2006	SALL4	constitutive	CMV		MDS-like avec évolution possible en LAM (50% de pénétrance)	(Ma et al. 2006)
2007	NRASD12+ BCL2	constitutive	hMRP8		LAM	(Omidvar et al. 2007)
1996/2008	MLL-AF9	constitutive	MII		LAM trouvant son origine des CSHs	(Corral et al. 1996; W. Chen et al. 2008)
2011	NPM1c	conditionnelle	Mx1	Mx1-Cre (pIC)	LAM avec 30% de pénétrance et une longue latence (médiane 617j)	(Vassiliou et al. 2011)
2012	NHD13+ FLT3-ITD	conditionnelle	Vav+Flt3		LAM avec 100% de pénétrance	(Greenblatt et al. 2012)
2012	MLL-PTD+ FLT3-ITD	constitutive	MII+FIt3		LAM avec 100% de pénétrance	(Zorko et al. 2012)
2013	NPM1c+ FLT3-ITD	Constitutive (FLT3-ITD) Conditionnelle (NPM1c)	Mx1	Mx1-Cre (pIC)	LAM après une latence courte (médiane 49j)	(Mupo et al. 2013)
2014	NRASG12D+ cbfb-MYH11	conditionnelle	Mx1	Mx1-Cre (pIC)	LAM avec 100% de pénétrance	(Xue et al. 2014)
2014	MLL-ENL	conditionnelle	TRE (Col1a)	rTTA (DOX)	LAM prenant son origine des progéniteurs et pas des HSCs	(Ugale et al. 2014)
2016	MLL-AF9	conditionnelle	TRE (Hprt)	rTTA (DOX)	LAM prenant son origine soit des CSH-lt ou des GMPs	(Stavropoulou et al. 2016)
2017	NPM1c+ NRASG12D	conditionnelle	Mx1	Mx1-Cre (pIC)	LAM avec 95% de pénétrance et plus mature que les souris NPM1c+ FLT3-ITD	(Dovey et al. 2017)
2018	MLL-ENL	conditionnelle	TRE (Hprt)	rTTA (DOX)	LAM ou Leucémies bi- phénotypiques (myélo/lympho) selon l'origine cellulaire	(Stavropoulou et al. 2018)

Adapté de Almosailleakh 2019

C Infection rétrovirale de cellules hématopoïétiques

Cette approche repose sur l'infection de cellules hématopoïétiques (moelle totale ou triée) avec un rétrovirus exprimant un proto-oncogène qui s'insère dans le génome des cellules infectées. Les cellules infectées sont ensuite injectées dans des souris irradiées (par voie caudale ou rétro-orbitale), générant une souris chimérique pouvant développer une leucémie (Figure 18). Cette méthodologie, permet de tester simplement et rapidement le potentiel de transformation leucémique conféré par un ou plusieurs proto-oncogènes. A l'ère de l'édition génomique, une étude pionnière du laboratoire de B. Ebert a démontré qu'il était possible d'induire la leucémie en éteignant simultanément l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs dans des HSCs grâce à la technique du CRISPR-Cas9 (Heckl et al. 2014).



Figure 19 le système inductible TET.

Dans le système **TET-OFF** l'ajout de doxycycline induit la répression génique en empêchant la liaison de la protéine tTA au TRE. Inversement, dans le système **TET-ON** l'ajout de doxycycline induit l'expression génique en induisant la liaison de la protéine rtTA avec le TRE.

Ces modèles ont permis des progrès spectaculaires dans la compréhension des mécanismes de transformation leucémique mais aucun d'entre eux ne retranscrit fidèlement l'hétérogénéité de la LAM humaine. Le système hématopoïétique murin est par essence différent de celui de l'Homme et les mécanismes de transformation leucémique sont sensiblement différents (Almosailleakh and Schwaller 2019). L'expression artificielle d'un transgène ne retranscrit pas les étapes de sélection clonale en réponse à l'apparition d'une mutation comme cela se produit chez l'Homme lors de l'initiation leucémique. Les souris provenant d'élevages sont sélectionnées au

fur et à mesure des accouplements ce qui entraîne une perte d'hétérogénéité interindividuelle, alors que chez l'Homme cette hétérogénéité est extrêmement importante. L'avènement des techniques d'édition génomique laisse entrevoir un futur où les modèles animaux seront de plus en plus complexes mais aussi plus représentatifs de la LAM humaine.

2 Le modèle iMLL-AF9

Le premier modèle de souris MLL-AF9 est un « knock-in » de la fusion MLL-AF9 dans le locus MII. Malgré l'expression pan tissulaire de la fusion MLL-AF9 les souris développent des LAM (Corral et al. 1996). A la suite de cette étude, un modèle reposant sur le système Cre-LoxP et mimant la translocation chromosomique entre le gène *MII* et *Af9* a été généré. Dans ce modèle, un premier site LoxP est inséré dans l'intron 8 du gène *MII* porté par le chromosome 9. Le second site Lox P est inséré dans l'intron 8 du gène Af9 porté par le chromosome 4. La recombinaison induite par la Cre entraine la translocation t(4;9) et conduit à l'expression de la fusion MLL-AF9 (Figure 20) (Collins et al. 2000). En combinant ce modèle avec une Cre exprimée dans les CSHs (Lmo2-Cre) ou dans les progéniteurs T (Lck-Cre) le groupe de T.Rabbits a démontré que chez la souris la fusion MLL-AF9 induit uniquement des LAM et aucune LAL T (Drynan et al. 2005). L'infection rétrovirale a largement été utilisée pour induire l'expression de la fusion MLL-AF9 dans des populations de cellules hématopoïétiques triées. Ces approches ont permis de démontrer que la fusion MLL-AF9 induit une reprogrammation des progéniteurs hématopoïétiques engagés (GMP) en cellules initiatrices de leucémie (Andrei V. Krivtsov et al. 2006; Somervaille and Cleary 2006). Il a été proposé que des niveaux d'expression anormalement élevés et non physiologiques de la fusion MLL-AF9 pouvaient être responsable de la reprogrammation des GMP en cellules initiatrices de leucémie (W. Chen et al. 2008). Chacun de ces modèles proposant une origine cellulaire différente à la LAM dans le contexte MLL-AF9, on peut légitimement se demander si ces résultats s'opposent réellement. Des éléments de réponse sont apportés par une étude de 2013 qui montre que les LSK exprimant la fusion MLL-AF9 sont capables d'initier plus rapidement la leucémie que les GMP exprimant la même fusion et que les leucémies dérivées des LSK sont plus résistantes aux chimiothérapies aboutissant à l'hypothèse que la nature de la LAM est déterminée par sa cellule d'origine (A. V. Krivtsov et al. 2013). C'est pour répondre à ces interrogations que le groupe de J.Schwaller a développé un

modèle de souris iMLL-AF9 inductible permettant un contrôle total de l'expression temporelle de la fusion MLL-AF9 à des niveaux physiologique (1 copie) (Stavropoulou et al. 2016).



Figure 20 le modèle de fusion interchromosomique MLL-AF9.

Dans ce modèle les site LoxP sont insérés entre les exons 8 et 9 du gène MII et Af9. La recombinaison entre les deux sites LoxP médié par la Cre entraine une translocation entre les chromosomes 4 et 9 générant un gène de fusion MII-AF9. Après la transcription et l'épissage une ARNm mature et fonctionnel est généré permettant l'expression de la protéine de fusion MLL-AF9. Adapté de Collins 2000, et Drynan 2005.

Le modèle iMLL-AF9 repose sur le système TET-OFF/TET-ON, dans ce modèle la rtTA est en aval du locus ROSA26 et la fusion MLL-AF9 se trouve en aval du TRE dans le locus Hprt du chromosome X. L'ajout de doxycycline va permettre à la rtTA de se lier au TRE et ainsi induire l'expression de la fusion MLL-AF9 (Stavropoulou et al. 2016) (Figure 21). Grâce à ce modèle les auteurs ont découvert deux origines à la LAM dans le contexte MLL-AF9, une origine dans les CSHs-It et une origine dans les GMP. L'expression conditionnelle de la fusion MLL-AF9 dans CSH-It est associée à une leucémie agressive chimio-résistante exprimant EVI1 et Erg qui sont des marqueurs de mauvais pronostic dans la LAM humaine (Rockova et al. 2011). Inversement, l'expression conditionnelle de la fusion MLL-AF9 dans les GMP induit une leucémie moins agressive au potentiel d'initiation leucémique réduit. Ce modèle confirme l'idée que la nature de la LAM est déterminée par la cellule d'origine (Stavropoulou et al. 2016). Ces résultats montrent que ce modèle est tout à fait pertinent pour adresser la question de la transformation et de l'initiation leucémique.

Par ailleurs, l'existence d'une signature associée à l'agressivité permet de facilement valider l'influence d'une protéine ou d'un traitement sur l'initiation et l'agressivité leucémique.



Figure 21 Le modèle iMLL-AF9.

Ce modèle repose sur le système TET-ON, l'ajout de DOX dans l'eau du biberon des souris induit l'expression de la fusion MLL-AF9 et l'apparition de la LAM. L'arrêt de la doxycycline induit la réversion du phénotype de LAM chez la souris et un retour à la normale. Chr : Chromosome. Adapté de Stavropoulou 2016.

III L'Hématopoïèse clonale, un état pré-leucémique ?

1 Le concept de l'hématopoïèse clonale liée à l'âge (ARCH).

En vieillissant, les mécanismes de défense contre les dommages à l'ADN sont moins performants et contribuent ainsi à l'instabilité génomique (López-Otín et al. 2013).

L'ARCH est définie par l'expansion clonale de CSHs présentant des mutations somatiques chez un individu sain (Shlush 2018). Concrètement, le ou les clones mutés vont davantage contribuer à la production des cellules sanguines matures par rapport aux CSHs normales (Figure 22). Par conséquent, pour être qualifié de ARCH les mutations doivent être observées à la fois dans les cellules souches et dans les cellules matures. L'ARCH n'est pas un phénomène rare car il concerne environ 10% des individus âgés de 70 ans et plus. Les gènes les plus fréquemment mutés sont *DNMT3A, TET2* et *ASXL1* et contrairement aux hémopathies malignes 93% des individus ne présentent qu'une seule et unique mutation (Jaiswal et al. 2014). De façon surprenante, l'ARCH a été associée à une augmentation du risque de maladie cardiovasculaire (Jaiswal et al. 2014). Bien que le risque de développer une hémopathie chez un individu présentant une ARCH est augmenté, le risque absolu reste faible (\approx 4%) (Jaiswal et al. 2014; Genovese et al. 2014). En conclusion, l'ARCH



Figure 22 L'hématopoïèse clonale liée à l'âge (ARCH).

L'apparition d'une mutation dans les cellules souches hématopoïétiques leur confère un avantage sélectif. Cet avantage se traduit par une expansion du clone muté qui va contribuer davantage à l'hématopoïèse. Par conséquent les cellules matures possèdent la même mutation issue du clone muté dont elles dérivent.

2 A l'origine de la leucémogénèse

Comme mentionné précédemment les hémopathies ne sont pas toujours la conséquence directe de l'ARCH. Dans certains cas cependant, il y a un lien direct entre l'ARCH et l'évolution vers la LAM. C'est ce qu'a démontré en 2014 le groupe de J.Dick. Les auteurs ont constaté chez certains patients (n=17) l'existence d'une population de cellules souches non leucémiques DNMT3A mutées. Les blastes de ces patients présentaient en plus de la mutation DNMT3A une co-mutation qui pouvait être FLT3 ou NPM1. Ces données démontrent que la mutation DNMT3A apparait avant les mutations FLT3 et NPM1 à un stade pré-leucémique (Shlush et al. 2014). Ainsi les mutations liées à l'ARCH confèrent aux clones mutants une susceptibilité d'évolution vers la leucémie sous couvert de l'apparition d'un ou plusieurs évènements mutationnels (Xie et al. 2014) (Figure 23). En accord avec ceci, le knock-out de Dnmt3a chez la souris induit une augmentation de l'auto-renouvellement des CSHs mais n'induit pas de leucémie chez les individus jeunes (Challen et al. 2011). Cependant, en laissant vieillir ces animaux l'apparition d'évènements secondaires entraine l'émergence d'hémopathies malignes (LAM/SMD/LMC) (Mayle et al. 2015). Ces résultats démontrent que l'évolution de l'ARCH vers une hémopathie maligne nécessite obligatoirement l'apparition d'un second hit mutationnel. Bien que l'ARCH favorise l'apparition de mutations secondaires ce phénomène reste rare, expliquant de facto pourquoi l'ARCH n'évolue pas systématiquement en hémopathie maligne. Toutes les études parues en 2014 sur l'ARCH et le risque de transformation leucémique ont comme principale limite, le faible nombre de patients ayant in fine développé une hémopathie. Mais deux études parues en 2018 utilisant des cohortes bien plus étoffées ont montré que l'ARCH est bien associé à un risque plus élevé de transformation maligne, avec comme nouveauté le constat d'une hiérarchie de gravité dans les mutations ARCH. En d'autres termes certaines mutations acquises sont plus à risque que d'autres. Par exemple, l'acquisition de mutation de gènes de l'épissage durant le vieillissement est associé à un risque élevé de développer une LAM des années plus tard (Abelson et al. 2018; Desai et al. 2018). Ces données suggèrent que l'épissage pourrait jouer un rôle fondamental dans la transition entre un stade préleucémique et un stade initiateur de leucémie. Ceci serait en accord avec le fait que les mutations dans les gènes de l'épissage sont fréquentes dans les SMD qui présentent un risque accru d'évoluer en sLAM (Sperling, Gibson, and Ebert 2017). Néanmoins, il est plus difficile de réconcilier le risque élevé de développer une LAM *de novo* à la suite d'altérations de l'épissage étant donné que les mutations des gènes de l'épissage sont rares dans les LAM *de novo* (Sperling, Gibson, and Ebert 2017). Il serait donc intéressant d'étudier les profils d'épissages des cellules initiatrices de leucémies afin de confirmer l'existence d'un lien entre épissage et initiation leucémique.



Figure 23 Evolution de l'ARCH à la LAM.

L'apparition d'une mutation ARCH dans les CSHs augmente le risque d'un second hit mutationnel faisant évoluer l'ARCH d'un état pré-leucémique à un état leucémique. L'hémopathie résultante dépend de la nature de la mutation secondaire. Adapté de Xie 2014.

Chapitre 3 La cellule souche leucémique et l'initiation de la leucémie

I La cellule souche leucémique

C'est dans les années 1990 qu'est démontrée pour la première fois l'existence des cellules souches leucémiques (CSLs) par le groupe de J.Dick. Les CSLs représentent une fraction de cellules leucémiques rares comprises dans le compartiment CD34⁺/CD38⁻ capables d'initier la leucémie dans des souris immunodéficientes (Lapidot et al. 1994; Bonnet and Dick 1997). Il existe deux propriétés caractéristiques des CSLs: la capacité d'initier et de reconstituer l'hétérogénéité clonale de la leucémie et l'autorenouvellement. Ce dernier est mesuré par la capacité des CSLs à transférer la pathologie dans des expériences de transplantations sériées (Hanekamp, Cloos, and Schuurhuis 2017). Les approches par dilutions limites (DLA) ont démontrés que les CSLs partagent les même caractéristiques fonctionnelles que les CSHs (Lapidot et al. 1994). La comparaison ne s'arrête pas là car les CSLs possèdent un profil d'expression génique similaire aux CSHs (Eppert et al. 2011) confirmant le lien phylogénique entre la CSH et la CSL. La fréquence de CSLs est très variable et oscille entre 1 cellule sur 1600 à 1 sur 1100000 blastes (Eppert et al. 2011). Dans un premier temps les CSLs étaient considérées comme présentes uniquement dans le compartiment CD34⁺/CD38⁻. Néanmoins, il a rapidement été démontré que les CSLs sont également présentes dans le compartiment CD34⁻ (Terpstra et al. 1996). La transplantation de fractions cellulaires nécessite en amont une étape de tri en cytométrie basée sur l'utilisation d'anticorps. Ainsi le groupe de D.Bonnet a démontré que l'utilisation d'un anti-CD38 entraine un important effet anti-greffe et que des CSLs existent dans le compartiment CD38⁺ (Taussig et al. 2008). Les CSLs forment ainsi une population beaucoup plus hétérogène que ce qu'il était pensé au départ. Néanmoins, bien que des CSLs soient retrouvées dans chaque compartiment CD34/CD38 elles sont clairement enrichies dans le compartiment CD34+/CD38- et sont associées à un pronostic clinique défavorable (Ng et al. 2016; Eppert et al. 2011; van Rhenen et al. 2005). En conclusion, les CSLs forment un groupe de cellules hétérogènes rares partageant des propriétés fonctionnelles et phénotypiques similaires aux CSHs normales.

Il La cellule souche leucémique: une entité phénotypique à part entière?

1 Les CSLs dans la LAM

Les CSLs et les CSHs coexistent dans la moelle osseuse et partagent la même identité phénotypique (*i.e.*CD34⁺/CD38⁻). D'un point de vue clinique, le lien entre la fréquence de CSLs et maladie résiduelle est clairement établi (Wendelien Zeijlemaker et al. 2019). En d'autres termes cela signifie que les CSLs sont des cellules chimiorésistantes et que ces cellules sont responsables des phénomènes de rechutes dans la LAM. C'est pourquoi de nombreuses études se sont attachées à établir la cartographie phénotypique des CSLs afin de les distinguer des CSHs. Le principal intérêt est de pouvoir cibler thérapeutiquement ces CSLs afin d'empêcher tout phénomène de rechute. Ces dernières années de nombreux marqueurs permettant d'identifier et de trier les CSLs ont été publiés (Voir Tableau 10).

Marguer	Expression		Dítímmora	
Marqueur	CSHs	Cellules matures	References	
JAM-C	+	Plaquettes	(De Grandis et al. 2017)	
CD123	-	Lymphocytes T	(Jordan et al. 2000)	
CD96	-	Lymphocyte T activé	(Hosen et al. 2007)	
CD32		Lumphoputop D at T		
CD25	-	Lymphocytes B et 1		
CD98	+	Ubiquitaire	(Bajaj et al. 2016)	
TIM-3	-	Lymphocytes T	(Kikushige et al. 2010)	
CD44	+	Ubiquitaire	(L. Jin et al. 2006)	
CLL-1	-	Cellules myéloïdes	(van Rhenen et al. 2007)	
CD47	+	Ubiquitaire	(Jaiswal et al. 2009)	
CD93	-	Cellules myéloïdes	(Iwasaki et al. 2015)	
GPR56	+	Ubiquitaire	(Pabst et al. 2016)	
CD99	-	Lymphocytes T	(Chung et al. 2017)	
IL1RAP	-	Lymphocytes T	(Askmyr et al. 2013)	
CD7 [‡]		Lymphocytes T		
CD11b [‡]		Cellules myéloïdes	(M. Zojilomokor et al. 2016)	
CD22 [‡]	-	Lymphocytes B	(W. Zeijientaker et al. 2016)	
CD56 [‡]		Cellules NK		
CD33	+	Cellules myéloïdes	(Ehninger et al. 2014)	

Tableau 10 les marqueurs des cellules souches leucémiques

‡ Ces anticorps sont à utiliser en cocktail avec CLL-1 et TIM-3, l'expression de CD123 et de CD33 doit également être contrôlée. Adapté de Zeijlemaker 2019

2 Les CSLs hors du contexte de la LAM, l'exemple des SMD et des CML

Comme évoqué au chapitre 2 Paragraphe B et C, les SMD et les CML peuvent évoluer en sLAM. Concrètement, cela signifie que certaines cellules présentes dans ces pathologies sont capables d'acquérir des propriétés d'initiation leucémique.

Dans la LMC, les CSLs (CSLs^{LMC}) sont comprises dans le compartiment CD34⁺ CD38⁻ CD45RA⁻ CD71^{-/+} HLA-DR^{Io} (MPPs/GMPs) et possèdent une mutation dans le domaine kinase du gène BCR-ABL (C. H. M. Jamieson et al. 2004; Khorashad et al. 2008). Durant la phase chronique de la LMC, les progéniteurs engagés peuvent acquérir une capacité aberrante d'auto-renouvellement (C. H. M. Jamieson et al. 2004). L'acquisition de cette propriété, normalement exclusive aux CSHs, est rendue possible par une suractivation de la voie Wnt/ β -caténine dans les GMPs (C. H. M. Jamieson et al. 2004; C. H. Jamieson 2008). Ainsi durant la phase chronique, les GMPs se transforment progressivement en cellules souches pré-leucémiques (phase d'accélération) puis en CSL (phase blastique) **(Figure 24).**



Figure 24 modèle d'évolution de la LMC en sLAM.

Représentation schématique des trois phases d'évolutions de la LMC en sLAM.

Les SMD sont des hémopathies clonales extrêmement hétérogènes et leur évolution vers la sLAM dépend de l'acquisition de mutations associées à la LAM. Ainsi l'hétérogénéité du profil mutationnel des SMD et donc de l'expansion clonale rend complexe la caractérisation de CSLs. Néanmoins il semblerait que les CSL dans les SMD (CSL^{SMD}) soient contenues dans le compartiment souche CD34⁺ CD38⁻ Thy1⁺. Contrairement aux CSH normales les CSL^{SMD} présentent une signature moléculaire distincte (L. Nilsson et al. 2007; 2002). Le postulat initial d'évolution des SMD en sLAM était décrit comme linéaire, l'acquisition d'une mutation dans une CSHs entraine une hématopoïèse clonale et l'apparition d'une CSH^{pré-SMD} (*i.e.* ARCH). L'expansion clonale qui en résulte accroit le risque d'une seconde mutation et l'émergence d'une CSH^{SMD} et donc d'une myélodysplasie. Enfin, c'est l'accumulation de mutations qui permet l'émergence d'une CSL et la transformation en sLAM (Figure 25). Ces premières observations reposaient sur des approches de séquençage en "bulk". L'émergence des techniques de séguençage en cellule unique ont permis de redistribuer les cartes. En réalité, plusieurs clones de CSH^{pré-SMD}/CSH^{SMD} coexistent et évoluent en parallèle. Ainsi l'architecture clonale du compartiment souche des SMD est bien plus complexe qu'il n'y parait. Chez un même patient, la cartographie clonale du bulk^{SMD} et du bulk^{sLAM} est différente. Ceci indique que l'origine du bulk ne provient pas de la même cellule souche. En effet, l'apparition d'une mutation associée à la LAM dans les CSH^{pré-SMD}/CSH^{SMD} entraîne l'apparition d'une CSL qui évolue en parallèle de la myélodysplasie et qui à terme entraine une sLAM (J. Chen et al. 2019) (Figure 25). Pour simplifier, la CSL ne provient pas du bulk^{SMD} mais du compartiment CSH^{pré-} SMD/CSHSMD

Pour conclure, quelle que soit l'origine des CSL (SMD, LMC, NMP), la génération d'une cellule capable d'autorenouvellement et d'un potentiel plus ou moins limité de différenciation signent l'évolution vers un état pré-leucémique ou leucémique. Deux enseignements peuvent être tirés de ces constatations. Premièrement, la CSL est une entité hétérogène qui n'est pas restreinte à la LAM *de novo*. Deuxièmement, d'un point de vue évolutif la CSL est un clone dormant, plastique capable de répondre à une pression de sélection par une accumulation de mutations et une adaptation à son environnement dans le but de proliférer et devenir dominant.



Figure 25 Les modèles d'évolution de la SMD vers la sLAM.

A. Modèle d'évolution linéaire, Ce modèle repose sur l'accumulation de mutations en série durant l'évolution du SMD vers la sLAM. **B.** Le modèle d'évolution clonale parrallèle, ce modèle suggère l'évolution, au niveau du compartiment souche, de plusieurs clones en parallèle durant le le développement du SMD et la progression vers la sLAM. CS = Cellule souche. Adapté de Chen 2019.

3 Mesure de l'activité des CSLs.

Plusieurs techniques de référence sont utilisées pour mesurer l'activité d'initiation leucémique. Ces techniques reposent à la fois sur des approches *in vitro* et *in vivo*.

La culture en méthylcellulose permet de mesurer l'activité clonogénique des CSLs c'est-à-dire leur capacité d'auto-renouvellement. Le principe est simple, les cellules sont mises en culture dans un milieu semi-liquide (méthyl-cellulose) complémenté ou

pas avec des cytokines ou des facteurs de croissance. Ensuite, après quelques jours l'expérimentateur compte les colonies formées, en sachant que plus les cellules possèdent une activité souche plus elles vont former de colonies. L'avantage de cette technique est de pouvoir rapidement mesurer l'activité clonogénique de plusieurs fractions cellulaires. De plus, la morphologie des colonies renseigne sur la différenciation cellulaire. Le principal désavantage de cette technique est le fait qu'elle ne prenne pas en compte l'interaction des CSLs avec le stroma. Pour répondre à ce problème, R.Ploemacher met au point en 1989 la technique du cobblestone (Ploemacher et al. 1989). Dans cette technique les cellules sont mises en culture sur des cellules stromales préalablement irradiées. Après plusieurs jours de coculture on compte les colonies qui se sont formées de façon stroma dépendante. Cette technique permet de mimer *in vitro* les interactions entre les CSLs et les cellules stromales de la moelle osseuse.

Depuis les travaux de T.Lapidot en 1994, la xénogreffe de cellules triées ou pas dans des souris immunodéficientes est devenue la technique de référence pour mesurer l'activité des CSLs. Il existe deux approches principales, la greffe en bulk ou la dilution limite. La greffe de bulk est simple : un nombre fixe de cellules leucémiques déplétés de cellules T et triées ou pas (souvent de l'ordre de 100 000 à 1 000 000 cellules) est injecté dans une souris. La prise leucémique est constatée par CMF en mesurant le pourcentage de blastes humain dans le sang des souris xénogreffées. L'étape de tri cellulaire en amont de la greffe permet de mesurer le potentiel d'initiation leucémique de plusieurs populations cellulaires différentes. Avant d'être injectées les cellules peuvent également être génétiquement manipulées (infections virales, CRISPR...) afin d'induire ou de réprimer l'expression d'un ou plusieurs gènes. Ainsi la greffe en bulk permet de mesurer l'implication d'une ou plusieurs protéines (ou gène) sur l'initiation leucémique mais ne renseigne pas sur le niveau d'enrichissement en CSLs au sein de la fraction cellulaire. C'est pourquoi la technique in vivo de référence pour mesurer la fréquence de CSLs est la dilution limite (DLA). Mathématiquement, la DLA repose sur la loi de Poisson, qui assume que le nombre de cellules actives dans chaque culture varie selon une distribution de Poisson, et qu'une seule cellule biologiquement active est suffisante pour induire une réponse positive (Hu and Smyth 2009). Expérimentalement, cela consiste à injecter des doses décroissantes de cellules (ex. 1000, 500, 50, 10) avec des réplicats pour chaque dose et de suivre la prise de greffe sur l'ensemble des animaux du réplicat. A la fin de l'expérience, le nombre de répondeurs (i.e. souris ayant greffées avec un certain seuil) en fonction de chacune des doses est mesuré afin de déterminer la fréquence de CSLs en utilisant l'équation de Poisson (Fazekas de St Groth 1982).

III Les mécanismes d'adhésions des CSLs à la moelle osseuse.

1 Avant propos

Les CLS sont le reflet pathologique des CSHs, il n'est donc pas surprenant de constater que les CSLs partagent les mêmes niches micro-environnementales que les CSHs. A l'instar des CSHs, les CSLs utilisent des mécanismes d'adhésion dans le but de proliférer, de maintenir leur quiescence et de se créer un environnement chimioprotecteur. Dans cette partie, je vais aborder les principales molécules d'adhésion impliquées dans le mainten des CSLs (**Figure 26**).



Figure 26 les CSLs dans les niches de la moelle osseuse.

Représentation schématique de l'occupation des niches de la moelle osseuse par les CSLs et leurs modalités d'interactions. Bien qu'il y ait des preuves démontrant un rôle protecteur via l'interaction entre les CSLs et l'E-selectine des doutes persistent sur la localisation de ces interactions (ellipse en pointillé sur le schéma). HA : Acide Hyaluronique

2 CD44

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire de classe 1 impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires. La partie extracellulaire de CD44 interagit préférentiellement avec la matrice extra-cellulaire. Les ligands principaux de CD44 appartiennent à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs). Le pré-ARN messager de CD44 contient 19 exons dont 9 exons variants (v2-v10) sont régulés par l'épissage alternatif (Ponta, Sherman, and Herrlich 2003; Prochazka, Tesarik, and Turanek 2014). La plus petite isoforme de CD44 est appelée isoforme standard (CD44s) et est exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme. En plus de cette isoforme standard il existe 5 autres isoformes principales ayant toutes des fonctions différentes (Ponta, Sherman, and Herrlich 2003) **(Figure 27)**.



Figure 27 représentation schématique des isoformes de CD44.

Adapté de ponta 2003

Dans la LAM les isoformes contenant les exons variants v3, v4, v5, v6, v7 et v10 sont détectables par cytométrie en flux et et les isoformes de CD44 contenant l'exon v6 sont associées à un mauvais pronostic (Bendall, Bradstock, and Gottlieb 2000; Legras et al. 1998). CD44 est exprimé à la surface des CSLs et des CSLs^{LMC}. L'expression de CD44 est essentielle pour le nichage et la greffe des CSLs^{LMC} de souris (Krause et al. 2006). De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant anti CD44 empêche la greffe et

le nichage des CSLs dérivées de patients dans la souris (L. Jin et al. 2006). Ainsi CD44 constitue une cible thérapeutique de choix pour l'élimination des CSLs à la fois dans la LAM mais également dans la LMC. En 2016, un essai clinique de phase I a été conduit avec un anticorps monoclonal anti-CD44 (RG7356) dans la LAM. En monothérapie le RG7356 n'apporte pas de plus-value par rapport aux traitements déjà existants. Néanmoins il apparait que ce traitement pourrait induire la différenciation des CSLs les rendant plus sensibles aux chimiothérapies conventionnelles (Vey et al. 2016) **(Tableau 11)**.

3 Intégrines

Les intégrines sont exprimées de façon ubiquitaire sur les blastes leucémiques ainsi que sur les CSLs. L'expression de de $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/Mac1), α_2 , α_6 et $\alpha_4\beta_1$ est associée à un mauvais pronostic dans la LAM (Figure 26)(Graf et al. 2006; Lian et al. 2018; Yamakawa et al. 2012; Matsunaga et al. 2003). Historiquement, il a été décrit que les blastes leucémiques interagissent avec le stroma de la moelle osseuse via les intégrines β_1 et β_2 (Bendall, Kortlepel, and Gottlieb 1993). Par ailleurs, l'interaction entre l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ et le collagène induit la résistance à la doxorubicine en inhibant la protéine Rac-1 (Figure 5) (Naci et al. 2019). Cet effet peut être réverté grâce à l'utilisation d'un anticorps contre $\alpha_2\beta_1$. L'intégrine $\alpha_4\beta_1$ est également impliquée dans des phénomènes de chimiorésistance. Les patients exprimant des niveaux élevés d' $\alpha_4\beta_1$ ont plus de risque de rechuter après induction, indiguant que les blastes $\alpha_4\beta_1^+$ sont probablement enrichis en CSLs. *In vitro*, l'interaction de $\alpha_4\beta_1$ avec la fibronectine induit la voie de signalisation PI3K-Akt protégeant les cellules de la chimiothérapie (Figure 5). Parallèlement, la combinaison d'un anticorps contre $\alpha_4\beta_1$ et la cytarabine induit la disparition de la MRD chez des souris xénogreffées (Matsunaga et al. 2003). Les intégrines β_4 et α_6 sont surexprimées dans les LAM EVI1^{High}. De façon surprenante, un shRNA dirigé contre EVI1 entraine une baisse de la capacité adhésive des blastes ainsi qu'une diminution de l'expression de β_4 et α_6 . Ainsi l'utilisation d'anticorps bloquants anti β_4 et α_6 induit une sensibilisation aux traitements des blastes EVI1^{High} (Yamakawa et al. 2012) (Figure 28). Ces études conduites chez l'homme démontrent l'existence d'un intérêt thérapeutique dans le ciblage des intégrines dans la LAM. Chez la souris, dans le modèle MLL-AF9 il a été montré que β₃ est essentielle pour la leucémogénèse. En effet, le "knock-out" de l'intégrine β₃ est associé à une meilleure survie globale des souris leucémiques. Concomitamment, le "knock-out" de la chaine intégrine α_5 associée à la chaine β_3 , entraine une diminution de la survie des cellules leucémiques. Il apparait que les cellules leucémiques β_3^+ interagissent avec le micro-environnement conduisant à l'activation de la src-kinase Syk (Miller et al. 2013) **(Figure 5)**.



Figure 28 fonctions moléculaires des intégrines dans les CSLs.

Représentation schématique du rôle des intégrines dans la prolifération et la chimioprotection des CSLs. L'interaction entre $\alpha_2\beta_1$ et le collagène induit la résistance à la doxorubicine en inhibant la protéine Rac-1, cet effet est réverté par l'action d'un anticorps bloquant anti $\alpha_2\beta_1$. L'adhesion des CSLs via l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ entraîne l'activation de la voie Pi3k-AKT protégeant les CSLs de la chimiothérapie. Les LAM EVI1^{High} surexpriment l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, l'utilisation d'un shRNA contre EVI1 réduit l'expression de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, et l'utilisation d'un anticorps bloquant anti β_4 et α_6 permet de sensibiliser les blastes à la chimiothérapie. Enfin l'interaction des CSLs au stroma via l'intégrine $\alpha_5\beta_3$ induit l'activation de la srckinase SYK entraînant la prolifération cellulaire.

4 E-selectine

L'E-selectine est une molécule d'adhésion exprimée à la surface des cellules endothéliales de la moelle osseuse. L'E-selectine est beaucoup plus exprimée sur les cellules endothéliales de souris leucémiques que chez des souris normales (Barbier et al. 2020). L'inflammation causée par les blastes est à l'origine de l'augmentation de l'E-selectine ayant pour conséquence de détourner la niche endothéliale la rendant chimioprotectrice (Barbier et al. 2020). Par ailleurs, les cellules leucémiques ont une capacité de liaison à l'E-selectine augmentée suggérant que les blastes sont au contact de la niche endothéliale via l'E-selectine. Cette liaison induisant l'activation de la voie de signalisation pro-survie AKT/NF-KB protégeant les cellules de la chimiothérapie (Barbier et al. 2020). Chez la souris, une étude a montré que les cellules leucémiques chimiorésistantes sont en contact de la niche périvasculaire là où est exprimée l'E-selectine (Ninomiya et al. 2007). Néanmoins, de façon surprenante, l'inhibition ou le « knock-out » de l'E-selectine n'induit qu'une légère mobilisation des blastes suggérant que ces derniers n'interagissent pas avec l'Eselectine (Barbier et al. 2020). Les auteurs suggèrent que l'inhibition ou la perte d'expression de l'E-selectine est compensée par d'autres mécanismes adhésifs responsables de la rétention des blastes dans la moelle osseuse. Cependant, aucune expérience d'immunohistochimie n'a été réalisée afin de corroborer ce postulat. Il n'en demeure pas moins que l'inhibition (GMI-1271) de l'E-selectine en combinaison avec la cytarabine réduit de façon drastique la MRD chez les souris leucémiques. Bien qu'il n'y ait pas d'évidence phénotypique, il semblerait que les blastes capables de se lier à l'E-selectine soient enrichis en CSLs (Barbier et al. 2020) (Figure 29). Ces résultats pré-cliniques font de l'E-selectine une cible thérapeutique de choix pour le traitement de la MRD dans la LAM (Tableau 11).



Figure 29 mécanismes moléculaires induits par l'interaction entre les CSLs et l'E-selectine.

Dans ce modèle les CSLs interagissent à l'E-selectine endothéliale par l'intermédiaire d'un épitope sialyl-LewisX ou possiblement via CD34 exprimé par les CSLs. Cette interaction active la voie pro-survie NF-κB. L'inhibition chimique (GMI-1271) de cette interaction couplée à la cytarabine inhibe la voie NF-κB et induit l'apoptose des CSLs.

5 CD98

CD98 est une glycoprotéine capable de se lier aux intégrines β_1 et β_3 impliquée dans le remodelage de la fibronectine dans la matrice extracellulaire (Féral et al. 2007). CD98 joue également un rôle dans l'activation et la prolifération des lymphocytes B et T (Haynes et al. 1981; Cantor et al. 2009). En réalisant une infection rétrovirale de la fusion MLL-AF9 dans des LSK de souris *Cd98hc*^{fl/fl} (inductibles au tamoxifène), J.Bajaj a démontré que le « knock-out » de CD98 induit une diminution du nombre de CSLs murines. Cette réduction est accompagnée d'une baisse du potentiel d'initiation leucémique des CSLs murine. Cet effet est également constaté en inhibant CD98 soit

par l'intermédiaire d'un anticorps bloquant ou via un shRNA (Bajaj et al. 2016). Par ailleurs, les auteurs ont montré que l'expression de CD98 est enrichie dans le compartiment CD34+ des pateints atteints de LAM (Bajaj et al. 2016). D'un point de vue mécanistique, CD98 permet l'interaction entre $\alpha_4\beta_1$ présent sur les CSLs et VCAM-1 exprimé par les cellules endothéliales. Cette interaction contribue au nichage des CSLs dans la niche périvasculaire et permet d'activer la voie NF- κ B offrant un environnement chimio-protecteur aux cellules leucémiques (Bajaj et al. 2016; Jacamo et al. 2014) (**Figure 30**). Basé sur ces observations, un essai clinique de phase I avec un anticorps monoclonal dirigé contre CD98 a été réalisé en 2016 (NCT02040506) (**Tableau 2**).



Figure 30 Fonctions moléculaires de CD98 dans les CSLs.

CD98 interagit avec les intégrines β 1 et β 3 et participe au remodelage de la fibronectine de la matrice extra-cellulaire. D'autre part, CD98 potentialise l'interaction entre α 4 β 1 et VCAM-1.

6 JAM-C

Une étude récente du laboratoire, confirmée par d'autres, a démontré que JAM-C identifie une population de CSLs associée à un pronostic défavorable dans la LAM (De Grandis et al. 2017; von Bonin et al. 2018; Y. Zhang et al. 2018). Pour cette étude,

nous avons dérivé à partir d'une lignée cellulaire d'AML deux variants de CSLs (CD34+/CD38-/CD123+) exprimant (CSLsJAM-CPos) ou non JAM-C (CSLsJAM-CNeg). Grâce à ce modèle nous avons pu prouver que seules les CSLs^{JAM-CPos} sont capables d'initier la LAM dans des souris immunodéficientes (De Grandis et al. 2017). Ces observations ont été confirmées par des expériences de DLA sur cellules de patients triées démontrant que 1/63 cellule du compartiment CSLs^{JAM-CPos} est capable d'initier la LAM contre 1/600 dans le compartiment CSLs^{JAM-CNeg} (De Grandis et al. 2017). Ces données suggèrent que la rétention des CSLs dans la moelle osseuse pourrait être médiée par l'interaction JAM-C/JAM-B (cf. chapitre 1). Pour tester cette hypothèse, nous avons injecté des CSLs^{JAM-CPos} dans des NSG n'exprimant pas la protéine JAM-B. De façon surprenante, deux souris sur cinq ont développé une LAM, indiquant que l'interaction JAM-C/JAM-B n'est pas totalement responsable de la rétention des CSLs dans la moelle osseuse. Des analyses en protéomique nous ont permis de démontrer que CSLs^{JAM-CPos} possèdent une activité kinase Src exacerbée induite par le domaine intracellulaire de JAM-C (Figure 31). Ces résultats indiquent que JAM-C possède des fonctions cellulaires autonomes au-delà de ses propriétés adhésives (De Grandis et al. 2017).



Figure 31 Fonctions moléculaires de JAM-C dans les CSLs.

L'interaction entre JAM-C et JAM-B est en partie responsable de la rétention des CSLs dans la moelle osseuse. Au dela de ses propriétés adhésives JAM-C possède des fonctions cellulaires autonome, le domaine intra-cellulaire de JAM-C induit l'activation des src-kinases. L'activation des src induit d'une part une augmentation de la prolifération cellulaire et pourrait d'autre part jouer un rôle dans l'activation des intégrines.

7 Les facteurs solubles

Les cellules leucémiques expriment des niveaux élevés de Tie2 (Schliemann et al. 2006), suggérant que l'axe Tie2/angiopoiétine régulerait le processus de leucémogénèse. Ainsi, le blocage de Tie2 avec un anticorps réduit la prolifération leucémique (Reikvam et al. 2010). Plusieurs essais cliniques ciblant Tie2 ont été conduits (Voir tableau 2). L'axe Tie2/angiopoietine protège les CSH de l'apoptose, par extension il pourrait également protéger les CSLs des chimiothérapies. Cependant il n'existe pas de lien entre l'expression de Tie2 et la survie globale ou la rechute dans la LAM (Schliemann et al. 2006).

De façon similaire à Tie2, CXCR4 (récepteur de CXCL12) est également très exprimé à la surface des cellules leucémiques. En pratique clinique, l'inhibiteur de CXCR4 (Plerixafor) est utilisé pour mobiliser les CSHs avant une HCT (DiPersio et al. 2009). Des résultats pré-cliniques chez la souris ont montré que l'inhibition de CXCR4 induisait une mobilisation des blastes et une sensibilisation à la chimiothérapie (Nervi et al. 2009). Par ailleurs, l'expression de CXCR4 est associé à un mauvais pronostic et à un fort risque de rechute dans la LAM, plaçant CXCR4 comme un potentiel marqueur des CSLs (Spoo et al. 2007). Toutes ces observations ont conduit à l'élaboration d'essais cliniques (voir Tableau 11) visant à une mobilisation et une sensibilisation des blastes à la chimiothérapie en abolissant l'axe CXCR4/CXCL12 (Uy et al. 2012). Les résultats semblent être concluants.

L'ensemble de ces résultats montrent que les CSLs sont capables de tirer profit des mécanismes pro-adhésifs de la niche, leur conférant soit un avantage prolifératif, soit une chimioprotection. Ainsi durant l'initiation leucémique, certains modèles postulent que des CSHs sont remplacées par des CSLs, lesquelles modulent le microenvironnement médullaire par la sécrétion de molécules solubles ou par interactions directes. Par exemple, la sécrétion de la chimiokine CCL3 par les blastes diminue le nombre d'ostéoblaste dans un modèle de LAM chez la souris et le niveau de CCL3 sérique est significativement augmenté chez des patients atteints de LAM (Frisch et al. 2012). Ainsi le remodelage de la niche empêche le développement des CSH libérant de l'espace pour les CSLs.
Cible	Molecule	Protocole	Hémopathie	Phase	Identification
CD44	Anti-hCD44 (RG7356)	Monothérapie	LAM réfractaires ou rechutées	I	NCT01641250
CD98	Anti-hCD98 (IGN523)	Monothérapie	LAM réfractaires ou rechutées	I	NCT02040506
E- selectine	GMI-1271 (Uproleselan)	Combinaison MEC [†]	LAM de novo réfractaires ou rechutées	1/11	NCT02306291
		Combinaison Ara-C + Dauno	LAM de novo	11/111	NCT03701308"
		Combinaison MEC† ou FAI‡	LAM réfractaires ou rechutées	111	NCT03616470"
Tie2/Ang- 1	AMG 386 (Trebananib)	Mono ou Combi Ara-C	LAM de novo	1/11	NCT01555268
CXCR4	AMD 3100 (Plerixafor)	Combi MEC [†]	LAM de novo	1/11	NCT00512252
		Monothérapie	LAM de novo SMD	1/11	NCT01236144
		Combi Décitabine	LAM de novo	I	NCT01352650

Tableau 11 Liste des essais cliniques ciblant les mécanismes adhésifs dans la LAM

† MEC= mitoxantrone, etoposide et cytarabine, **‡** FAI= fludarabine, cytarabine et idarubicine, **11** en cours d'inclusion.

IV Epissage et initiation leucémique.

1 Les bases de l'épissage

En 1961 F.Gros et F.Jacob découvrent que l'information génique contenue dans l'ADN est transmise aux ribosomes par l'intermédiaire d'un ARN qu'ils qualifient de messager (F. Jacob and Monod 1961; Gros et al. 1961). Un nouveau modèle est alors proposé

où l'ADN est transcrit en ARNm, puis l'ARNm est traduit en protéine par les ribosomes. A la fin des années 70, on constate que les ARNm néo-transcrits possèdent des séquences qui doivent être éliminées afin que l'ARNm soit traduit en protéine. Ces séquences sont appelés introns et s'opposent aux exons qui eux contiennent l'information génétique (Berget, Moore, and Sharp 1977; Chow et al. 1977). Cette découverte margue un changement de paradigme, les ARNm néo-transcrits (préARNm) doivent être « épissés » avant d'être traduit en protéines. En 1980, le complexe catalytique responsable de l'épissage des ARNm, ou spliceosome, est décrit (Lerner et al. 1980). Le spliceosome est constitué de 5 sous-unités de protéines ribonucléaires (Small Nuclear Ribonucleoprotein (SnRNP)) : U1, U2, U4, U6 et U5. En plus de ces 5 SnRNP qui forment le cœur du spliceosome, on trouve de multiples cofacteurs qui régulent l'activité d'épissage (Matera and Wang 2014). Ainsi c'est plus de 200 protéines qui contrôlent les phénomènes d'épissage dans les cellules eucaryotes (Lee and Abdel-Wahab 2016). L'assemblage du spliceosome se fait en plusieurs étapes, nécessite une consommation importante d'ATP, et repose sur deux réactions de trans-estérification. Premièrement, la sous unité U1 reconnait le site d'épissage en 5' du préARNm (5'ss) puis la protéine SF3B1 recrute la sous unité U2 au point de branchement (Branching Point : BP) en 3' marqué par une adénosine. Ensuite, les protéines U2AF2 et U2AF1 se lient respectivement aux séquences polypyrimidine et site d'épissage 3' permettant la formation du complexe A (U1+U2) (Figure 32 et 33 B). Une fois le complexe A formé, la tri-snRNP (U4, U6 et U5) est recrutée formant le complexe B. A la suite d'une série de modifications conformationnelles, le complexe B se transforme en complexe B activé (Bact). Le complexe B^{act} induit la première étape catalytique du spliceosome, générant le complexe C, qui contient l'exon 1 libre et l'intermédiaire intron-exon 2. Le complexe C induit la seconde réaction catalytique qui conduit à l'épissage des exons et à l'excision du complexe U6, U2, U5 avec le lariat intronigue. Les SnRNP sont ensuite recyclées pour une autre ronde d'épissage (Dujardin et al. 2016; Matera and Wang 2014) (Figure 32).



Figure 32 Représentation schématique des différentes étapes de l'épissage.

Adapté de Matera 2014.

2 L'épissage alternatif

Chez l'Homme, 22 000 gènes codent pour au moins 100 000 protéines différentes, cela signifie qu'en moyenne un gène code pour 5 protéines ayant des fonctions différentes (Maniatis and Tasic 2002). Cette diversité du protéome s'explique par le mécanisme d'épissage alternatif. En effet, un même préARNm peut être épissé en plusieurs ARNm matures différents codant pour des isoformes protéiques différentes. Il existe 5 types d'épissage différents, les exons cassettes, les exons mutuellement exclusifs, la rétention d'intron, les sites alternatifs 5' et les sites alternatifs 3' (Lee and Abdel-Wahab 2016) (**Figure 33 A).** L'épissage alternatif est un phénomène hautement régulé par des séquences (exonique ou intronique) en *cis*. Ces séquences en *cis* sont reconnues en *trans* par des protéines régulatrice. On distingue des séquences exoniques répressives (ESS) et activatrices (ESE) et des séquences introniques

répressives (ISS) et activatrices (ISE). Ces séquences sont reconnues par des protéines régulatrices appartenant à la famille des protéines SR et hnRNP. Dans la majorité des cas, les protéines SR induisent l'épissage des exons en s'associant aux séquences activatrices en cis. Inversement, les protéines hnRNP reconnaissent les séquences ISS et ISE, ce qui induit un saut d'exon (Matera and Wang 2014; Matlin, Clark, and Smith 2005) (Figure 33 B). Au-delà de ces mécanismes ubiguitaires, l'épissage alternatif est régulé de façon tissu-spécifique. En effet, certains cofacteurs régulant l'épissage sont exprimés de façon tissu-spécifique. L'exemple le mieux décrit concerne les protéines NOVA (Neuro-oncological ventral antigen) 1 et 2 exprimées dans le cerveau (Buckanovich, Yang, and Darnell 1996; Yang, Yin, and Darnell 1998). La protéine NOVA-1 active l'inclusion d'exons lors de l'épissage du récepteur GABAA, essentiel à la survie neuronale (Jensen et al. 2000). De façon similaire NOVA-2 régule l'architecture synaptique en régulant l'épissage des préARNm (Ule et al. 2005). L'épissage alternatif peut également être induit par des stimuli extra-cellulaires. Par exemple, dans le système immunitaire, les cellules T activées induisent un changement du profil d'expression des protéines SR (ten Dam et al. 2000). Ce changement s'accompagne d'une modification de l'épissage du préARNm de CD45 (PTPRC) et conduit à la traduction d'isoformes de PTPRC possédant des fonctions différentes (H. Y. Wang et al. 2001). La structure même du préARNm peut moduler l'accessibilité aux sites répresseurs et activateurs de l'épissage. De plus l'épissage étant un évènement co-transcriptionnel, la rapidité de la transcription influe sur également sur l'épissage alternatif (lp et al. 2011).

Tous ces niveaux de régulation de l'épissage alternatif sont essentiels tant ce phénomène est capital pour l'intégrité biologique des cellules eucaryotes. Pour étayer mes propos, il a été démontré qu'un changement du programme d'épissage induit la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes (Gabut et al. 2011; Han et al. 2013). Par ailleurs, des études en cellule unique montrent que les programmes d'épissage évoluent avec la différenciation cellulaire et sont mêmes proéminents par rapport aux changements d'expression génique (Shalek et al. 2013; Song et al. 2017).



Figure 33 L'épissage alternatif et sa régulation.

A. Représentation schématique des cinq évènements d'épissage alternatif. **B.** Représentation schématique de la régulation de l'épissage par les séquences régulatrices exoniques et introniques. ESE = séquences exoniques activatrices ; ESS = séquences exoniques répressives ; ISE = séquences introniques activatrices ; ISS = séquences répressive. Adapté de Lee 2016 et Dujardin 2017.

3 L'épissage dans les CSLs

Il existe deux faisceaux de corrélations qui font de l'épissage un mécanisme potentiellement essentiel pour l'initiation leucémique. Premièrement, les mutations de gènes codant pour des protéines impliquées l'épissage représentent un facteur de risque de développement leucémique des années plus tard (Abelson et al. 2018; Desai et al. 2018). Deuxièmement, au cours du vieillissement l'expression des protéines de l'épissage évolue. Ces changements s'accompagnent d'évènements d'épissage différentiel entre les CSH « jeunes » et « vieilles ». Environ 29% des gènes exprimés sont différentiellement épissés entre un patient atteint de LAM et un donneur sain (Adamia et al. 2014).

Les mutations des gènes de l'épissage sont des évènements rares dans les LAM de novo mais sont fréquentes dans les sLAM. Il est donc naturel de se demander si dans un contexte muté, l'épissage est impliqué dans l'initiation leucémique. Sans surprise, les CSLs^{sLAM} présentent des profils d'épissage aberrant. En allant plus loin dans la démonstration les auteurs ont constaté que les CSLs^{sLAM} expriment des isoformes spécifiques de CD44, BCL-2, PTPN6 et PTK2B (Crews et al. 2016). Au-delà de leur rôle dans la progression leucémique (Beghini et al. 2000; Despeaux et al. 2012), ces isoformes sont également retrouvées dans des CSLs^{sLAM} sans mutation associée à l'épissage. Cette observation, à première vue contre intuitive, démontre que certaines protéines de l'épissage sont essentielles pour l'initiation leucémique, tout en étant non-mutées. Ce phénomène est connu et porte le nom d'addiction non-oncogénique (R. Thomas and Majeti 2019). Pour illustrer mon propos, la protéine de l'épissage RBM39, essentielle pour l'initiation et la progression leucémique, n'est pourtant jamais mutée dans la LAM (E. Wang et al. 2019). Dans la même idée, les protéines MBNL (Muscleblind-like) sont des protéines capables de se lier à l'ARN et de réguler l'épissage. L'expression de MBNL3 est diminuée dans les CSLs^{LMC} induisant un défaut d'épissage et une accumulation de l'isoforme CD44v8-10 (Figure 27). La surexpression de l'isoforme CD44v8-10 induit d'une part l'expression de facteurs de transcriptions tels que β-caténine, SOX2 et OCT-4 (pro-quiescence) en plus des isoformes longues de BCLX et MCL1 (ayant des fonctions anti-apoptotiques). D'autre part, l'isoforme CD44v8-10 induit l'expression de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 et OPN (Holm et al. 2015). (Figure 34). La protéine MBNL1 est surexprimée dans les leucémies avec réarrangement MLL. La délétion génique de MBNL1 dans des souris MLL-AF9 entraîne un défaut d'initiation leucémique suggérant une diminution de l'activité souche des CSLs. MBNL1 réduit la rétention d'introns dans les transcrits de SETD1A et DOT1L ce qui a pour conséquence d'augmenter le nombre de transcrits traduits (Itskovich et al. 2020). SETD1A et DOT1L sont des histones méthyltransférases ayant des fonctions essentielles dans la progression des leucémies avec réarrangement MLL (Deshpande et al. 2013). En outre, les CSLs^{LMC} présentent une isoforme spécifique de GSK3β (GSK3β-m). L'émergence de cette isoforme est la conséquence d'un épissage aberrant dans les CSLs^{LMC}. Or, il n'existe pas de mutation associée à l'épissage dans les LMC (Grossmann et al. 2011). Cette isoforme est absente des blastes et progéniteurs hématopoïétiques normaux. Physiologiquement, le rôle de GSK3 β est de phosphoryler la β -caténine entraînant sa dégradation par le protéasome. L'isoforme de GSK3ß-m perd sa capacité de phosphorylation entrainant une accumulation de β-caténine dans le cytosol.

à la transformation des progéniteurs leucémiques en CSLs. Inversement, l'introduction d'une isoforme non tronquée de GSK3β dans les CSLs^{LMC} réduit leur potentiel d'initiation leucémique (Abrahamsson et al. 2009) **(Figure 9)**.L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'épissage différenciel de certaines isoformes puisse contribuer directement ou indirectement à l'initiation leucémique dans la LAM.



<u>Figure 34</u> Mécanismes moléculaires induit par l'épissage alternatif impliqués dans la survie, la quiescence, la prolifération et la transformation des CSLs.

La diminution de l'expression de MBNL3 dans les CSL^{CML} induit un défaut d'épissage de CD44. L'augmentation de l'expression de MBNL1 induit un défaut d'épissage conduisant à une augmentation des transcrits de SETD1A et DOTL1. CSL^{CML} expriment une isoforme tronquée de GS3K β entraînant une accumulation de β -catenine dans le cytosol.

4 Le ciblage thérapeutique de l'épissage

Ces études suggèrent que l'épissage pourrait constituer une cible thérapeutique de choix dans le traitement de la LAM. Il existe de nombreuses molécules pharmacologiques capables de moduler l'activité de l'épissage (Lee et al. 2016; Salton and Misteli 2016). Globalement, ces molécules ciblent les stades précoces d'assemblage du spliceosome en ciblant la protéine SF3B1. Bien que l'inhibition de l'épissage soit relativement efficace pour diminuer la progression leucémique, plusieurs études pointent le fait que ces molécules sont beaucoup plus efficaces dans les LAMs présentant des mutations de l'épissage. En effet, ces mutations étant toujours hétérozygotes, l'épissage canonique repose sur l'unique allèle sauvage chez ces patients. Il est postulé que l'inhibition de l'épissage dans ce contexte réduit de facon drastique le nombre d'ARNm canoniques induisant la mort cellulaire, alors que les cellules non mutées résistent à cette inhibition car la quantité d'ARNm canoniques est suffisante (Lee et al. 2016; Seiler et al. 2018; E. Wang et al. 2019; Pellagatti and Boultwood 2020). En clinique, un essai de phase I avec le composé E7107 a été menée en 2006 dans le cadre du traitement de tumeurs solides (NCT00499499). Cependant les essais ont été arrêtés à cause de la toxicité du composé (Hong et al. 2014). Un autre essai clinique de phase I avec le composé H3B-8800 est en cours et les résultats sont encourageant du point de vue de la toxicité (NCT02841540) (Steensma n.d.). Cependant aucune de ces études n'adresse la guestion de l'activité des CSLs après traitement. Or, des résultats encourageants montrent que l'utilisation d'un inhibiteur de l'épissage (17S-FD-895) réduit l'auto-renouvellement des CSLs sans altérer les CSHs (Crews et al. 2016). Ces observations suggèrent que les CSLs pourraient être dépendantes de l'activité spliceosomale indépendamment du statut mutationnel.

OBJECTIFS DE THESE

La molécule d'adhésion JAM-C est impliquée dans le maintien et la quiescence des CSHs par l'intermédiaire de son interaction avec son ligand JAM-B exprimé par les cellules stromales. Dans le contexte leucémique, JAM-C est exprimé par les CSLs et son expression est associée à un mauvais pronostic dans la LAM. Au cours de cette étude nous avions démontré que JAM-C activait la voie des Src-kinases et avions établi un modèle cellulaire de variants de la lignée KG1 exprimant ou pas JAM-C. La différence majeure entre ces deux variants cellulaires était l'activité initiatrice de leucémie restreinte aux cellules KG1 JAM-C⁺ par opposition aux cellules n'exprimant pas JAM-C et n'ayant pas le potentiel de greffe. Les expériences de xénogreffes réalisées avec ces variants cellulaire ont démontré que JAM-C possédait des fonctions cellulaires autonomes indépendantes des mécanismes d'adhésion.

C'est dans ce contexte que je rejoins le laboratoire en 2016 pour mon stage de M2 avec pour objectif principal d'étudier les voies de signalisation pouvant être régulées par JAM-C dans les CSLs. Pour répondre à cette question, nous avions conduits des expériences de « peptide-pull-down » combinée à la spectrométrie de masse avec un peptide correspondant aux 19 acides aminés du domaine intracellulaire (ICD) de JAM-C. Ces expériences m'ont permis de confirmer l'interaction entre JAM-C et la protéine GRASP55 via son domaine PDZ (Cartier-Michaud et al. 2017) (Figure 35A). De façon beaucoup plus surprenante, l'ICD de JAM-C interagissait avec les protéines de la machinerie d'épissage (Figure 35A et 1B). Dès lors nous nous étions demandé comment une molécule d'adhésion, membranaire, pouvait interagir avec des protéines nucléaires de la machinerie d'épissage ?

En retournant sur notre modèle KG1, nous avons constaté que les génes *BACE-2* et *JAM3* (codant pour JAM-C) était plus exprimés dans les KG1 JAM-C⁺ comparées aux KG1 JAM-C⁻ (Figure 35C). BACE-2 appartient à la famille des sécrétases, tout comme ADAM10 et ADAM 17, connues pour être capable de cliver l'ectodomaine de JAM-C (Rabquer et al. 2010). Bien que ceci n'ai jamais été démontré pour JAM-C, le clivage de l'ectodomaine d'une protéine est fréquemment suivi d'un deuxième clivage qui génère un fragment correspondant à tout ou une partie de la séquence cytosolique (ICD). L'exemple le plus connu de clivage séquentiel amenant à la génération d'un

ICD fonctionnel est la voie de signalisation NOTCH. Ceci nous a conduit à formuler une hypothèse selon laquelle le clivage de JAM-C génère un ICD pouvant contribuer à l'auto-renouvellement en modulant l'activité d'épissage des CSLs. Cette hypothèse étant supportée par des mRNAseq réalisés sur KG1 montrant un profil d'épissage spécifique associé à l'expression de JAM-C (Figure 35D et 35E).



Figure 35 Résultats préliminaires.

A. Interactome de l'ICD de JAM-C. Les protéines ont été identifiées par peptide pull down et protéomique. Les peptides correspondant aux 18 derniers acides aminés de JAM-C ou de JAM-A ont été utilisés avec des lysats de KG-1. Les codes couleur représentent le nombre de peptides identifiés par spectrométrie de masse pour chacune des protéines indiquées. Les carrés bleus dénotent l'absence de peptide identifié. **B.** Exemple représentatif de la confirmation de deux interactions identifiées en (**A**) par western blot. **C.** Gènes différentiellement exprimés entre les KG1^{JAM-C+} et les KG1^{JAM-C+}. **D.** Validation par PCR des évènements de saut d'exon pour PER3 et CSNK1e identifiés par analyse différentielle des données de mRNAseq entre les KG1^{JAM-C+} et les KG1^{JAM-C-}.

Ces résultats de M2 m'ont permis d'obtenir un financement de thèse dont l'objectif principal était d'explorer si l'activité d'initiation leucémique des CSL dépend uniquement des propriétés adhésives de JAM-C ou dépend également d'une signalisation par l'ICD de JAM-C impliquant la régulation de l'épissage. Dans un second temps, j'ai également participé à l'étude du rôle de GRASP55 dans l'hématopoïèse normale et dans un modèle de lymphome.

Mes principaux résultats de thèse sur les fonctions de JAM-C et de GRASP55 dans l'hématopoïèse pathologique seront présentés dans la partie résultat. Les résultats de notre collaboration sur le rôle des rythmes circadiens dans le homing de la LAM seront présentés dans la partie résultats annexes ainsi qu'un article de méthodologie décrivant la méthode d'analyse des CSHs et des progéniteurs hématopoïétiques par cytométrie en flux.

RESULTATS

ARTICLE 1 : GRASP55 Is Dispensable for Normal Hematopoiesis but Necessary for Myc-Dependent Leukemic Growth

Anne-Laure Bailly, <u>Julien M. P. Grenier</u>, Amandine Cartier-Michaud, Florence Bardin, Marielle Balzano, Armelle Goubard, Jean-Claude Lissitzky, Maria De Grandis, Stéphane J. C. Mancini, Arnauld Serge and Michel Aurrand-Lions.

Cette étude décrit le rôle de la protéine GRASP-55 dans l'hématopoièse normale et pathologique. Cette étude a été initiée à la suite de la découverte des fonctions de GRASP-55 dans la relocalisation de JAM-C dans l'acrosome des spermatocytes en cours de différenciation (Cartier-Michaud et al. 2017). Dès lors, nos avions postulé que la protéine golgienne GRASP-55 pourrait également réguler le transport de JAM-C vers la surface cellulaire des CSH. Cette hypothèse était étayée par le fait que GRASP-55 avait été également impliquée dans le transport d'autres protéines essentielles à l'hématopoïése telle que TGFb ou SCF (Kuo et al. 2000). En utilisant des souris déficientes pour le gène codant GRASP-55 nous avons découvert que GRASP-55 n'est pas essentiel pour l'hématopoïèse normale à l'état basal ou aprés un stress hématoppïétique. Ces résultats s'expliquent par le fait que GRASP-55 et JAM-C ne sont pas exprimés au même moment au cours de l'hématopoïèse. De façon intéressante en utilisant une lignée cellulaire dépendante de l'activité de myc (Eµ-myc) nous avons montré que le knock-out de GRASP-55 reduit la prise leucémique après injection. Cet effet n'étant pas dû à un défaut de homing des cellules, mais à une augmentation de l'apoptose des cellules GRASP-55^{KO} incapables d'utiliser la voie de survie autophagique suite à une déprivation de glucose.







This information is current as of June 29, 2021.

GRASP55 Is Dispensable for Normal Hematopoiesis but Necessary for Myc-Dependent Leukemic Growth

Anne-Laure Bailly, Julien M. P. Grenier, Amandine Cartier-Michaud, Florence Bardin, Marielle Balzano, Armelle Goubard, Jean-Claude Lissitzky, Maria De Grandis, Stéphane J. C. Mancini, Arnauld Serge and Michel Aurrand-Lions

J Immunol 2020; 204:2685-2696; Prepublished online 30 March 2020; doi: 10.4049/jimmunol.1901124 http://www.jimmunol.org/content/204/10/2685

Supplementary	http://www.jimmunol.org/content/suppl/2020/03/27/jimmunol.190112
Material	4.DCSupplemental

References This article **cites 48 articles**, 18 of which you can access for free at: http://www.jimmunol.org/content/204/10/2685.full#ref-list-1

Why The JI? Submit online.

- Rapid Reviews! 30 days* from submission to initial decision
- No Triage! Every submission reviewed by practicing scientists
- Fast Publication! 4 weeks from acceptance to publication

*average

- **Subscription** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: http://jimmunol.org/subscription
- **Permissions** Submit copyright permission requests at: http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html
- **Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: http://jimmunol.org/alerts



GRASP55 Is Dispensable for Normal Hematopoiesis but Necessary for Myc-Dependent Leukemic Growth

Anne-Laure Bailly,* Julien M. P. Grenier,* Amandine Cartier-Michaud,* Florence Bardin,* Marielle Balzano,* Armelle Goubard,* Jean-Claude Lissitzky,* Maria De Grandis,[†] Stéphane J. C. Mancini,* Arnauld Serge,* and Michel Aurrand-Lions*

Grasp55 is a ubiquitous Golgi stacking protein involved in autophagy, protein trafficking, and glucose deprivation sensing. The function of Grasp55 in protein trafficking has been attributed to its PDZ-mediated interaction with the C-terminal PDZ-binding motifs of protein cargos. We have recently shown that such an interaction occurs between Grasp55 and the adhesion molecule Jam-C, which plays a central role in stemness maintenance of hematopoietic and spermatogenic cells. Accordingly, we have found that *Grasp55*-deficient mice suffer from spermatogenesis defects similar to *Jam-C* knockout mice. However, whether Grasp55 is involved in the maintenance of immunohematopoietic homeostasis through regulation of protein transport and Jam-C expression remains unknown. In this study, we show that *Grasp55* deficiency does not affect hematopoietic stem cell differentiation, engraftment, or mobilization, which are known to depend on expression of Grasp55-dependent protein cargos. In contrast, using an Myc-dependent leukemic model addicted to autophagy, we show that knockdown of Grasp55 in leukemic cells reduces spleen and bone marrow tumor burden upon i.v. leukemic engraftment. This is not due to reduced homing of Grasp55-deficient cells to these organs but to increased spontaneous apoptosis of Grasp55 plays a role in Myc-transformed hematopoietic cells but not in normal hematopoietic cells in vivo. *The Journal of Immunology*, 2020, 204: 2685–2696.

ematopoiesis and spermatogenesis are two differentiation processes in which adult stem cells produce their progeny in a sequentially ordered manner. It has been shown previously that JAM-C is expressed by hematopoietic stem cells (HSC) and by male germ cells (1-3). In both biological models, JAM-C plays a role in the maintenance of tissue homeostasis through adhesion regulation between developing cells and surrounding stromal cells expressing JAM-B, the high-affinity ligand of JAM-C (4, 5). During spermatogenesis, JAM-C regulates polarization of developing spermatids, a critical step in spermatozoa development (3). During hematopoiesis, JAM-C interaction with JAM-B plays a critical role in maintenance of HSC, which are at the apex of hematopoietic hierarchy (6). HSC differentiate into more mature multipotent progenitors (MPPs), which have decreased self-renewal capacity and progressively engage in megakaryocyte (MPP2), myeloid-biased (MPP3), or lymphoid-biased (MPP4)

A.-L.B. and J.M.P.G. designed and performed experiments, analyzed results, and wrote the manuscript. A.C.-M., F.B., M.D.G., M.B., and A.G. performed

MPPs (7). In agreement with its function in HSC maintenance, JAM-C is downregulated in MPPs during steady-state hematopoiesis (2). JAM-C expression by HSC is also rapidly downregulated after HSC mobilization using cyclophosphamide and G-CSF (8), suggesting that JAM-C may play a role in the switch from steady-state to emergency hematopoiesis. However, downregulation of JAM-C is not unique to G-CSF-induced mobilization because downregulation of other bone marrow retention signals such as VCAM-1/VLA-4, CXCL12/CXCR4, or SCF/Kit have also been documented (9–11).

We have recently identified the Golgi reassembly-stacking protein of 55 kDa (Grasp55) as a PDZ domain-containing protein interacting with the C-terminal PDZ-binding motif of Jam-B and Jam-C in mouse (12). Grasp55, and the related protein Grasp65, are highly conserved throughout evolution and play complementary roles in Golgi cisternal stacking through oligomerization and

Copyright © 2020 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/20/\$37.50

^{*}Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Aix Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, Cancerology Research Center of Marseille, Marseille 13009, France; and [†]Etablissement Français du Sang PACA Corse, Biologie des Groupes Sanguins, UMR 7268, Aix Marseille Université, CNRS, Marseille 13005, France

ORCIDs: 0000-0003-4141-1132 (J.-C.L.); 0000-0001-9255-4606 (S.J.C.M.); 0000-0003-4271-3706 (A.S.); 0000-0002-8361-3034 (M.A.-L.).

Received for publication September 24, 2019. Accepted for publication March 3, 2020.

This work was supported in part by grants from the French National Research Agency (ANR-BSV1-019-02 and A*MIDEX project ANR-11-IDEX-0001-02); Cancéropôle PACA; the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (PJA20141201990 [to M.A.-L.], PJA20131200298 [to S.J.C.M.], and PJA20131200238 [to A.S.]); and the FEDER, funded by the 'Investissements d'Avenir' French Government Program and managed by the French National Research Agency. A.-L.B. and M.B. were respective Ph.D. student recipients of grants from Ligue contre le Cancer (TDQR15906) and Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20150532380). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

experiments. J.-C.L. performed lentiviral transductions. S.J.C.M. designed the flow cytometry panels and wrote the manuscript. A.S. performed imaging analysis. M.A.-L. supervised the study, analyzed results, discussed data, and wrote the manuscript. All authors provided valuable inputs on the manuscript.

Address correspondence and reprint requests to Michel Aurrand-Lions, Cancerology Research Center of Marseille, Aix Marseille University, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, 27 Boulevard Leï Roure CS3005913273 Cedex 09, Marseille, Bouches du Rhone 13009, France. E-mail address: michel.aurrand-lions@inserm.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BMDM, bone marrow-derived macrophage; Cy7, cyanine 7; D35, day 35; 5-FU, 5-fluorouracil; Grasp55, Golgi reassembly-stacking protein of 55 kDa; *Grasp55^{AHem}*, hematopoietic-specific, Grasp55-deficient mice; GRASP55^{KD}, GRASP55 knockdown; *Grasp55^{WT}*, GRASP55 wild-type; HSC, hematopoietic stem cell; HSPC, hematopoietic stem and progenitor cell; LSK, Lin^{Neg}Sca^{Pos}Kit^{Pos}, MEF, mouse embryonic fibroblast; MPP, multipotent progenitor; shRNA, short hairpin RNA; UPR, unfolded protein response.

PDZ-mediated interactions with proteins of the golgin family, such as Golgin45, GM130, or p24 (13-17). In addition, GRASP55 depletion results in accelerated protein trafficking through the Golgi apparatus and has striking negative effects on protein glycosylation and sorting (18). More recently, O-GlcNAcylation has been shown to restrict the function of GRASP55 to Golgi stacking, whereas de-O-GlcNAcylation switches its function as an autophagosome-lysosome-tethering molecule (19). However, the function of GRASP55 is not limited to Golgi stacking and autophagy regulation because several studies have shown that GRASP55 is involved in protein trafficking through an unconventional secretory pathway triggered by cellular stress or unfolded protein response (UPR) (20-23). TGF-β, MT1-MMP, membrane-bound SCF, CD8α, Frizzled4, CD83, and IL-1B have been shown to be transported in a GRASP55-dependent manner (24-28). In addition, GRASP55 has been involved in MT1-MMP activation, which is necessary for various biological processes, including HSC mobilization (29). We have thus explored the function of GRASP55 in adult mammalian normal and pathological hematopoiesis. To this end, we have generated constitutive and inducible knockout mouse models of Gorasp2 (encoding Grasp55) and studied HSC self-renewal, engraftment, mobilization, and differentiation. To test whether Grasp55 may be involved in pathological hematopoiesis, we also questioned whether Grasp55 controls leukemic development. To this end, we used the Eµ-Myc lymphoma model known to be addicted to autophagy activation (30, 31).

Our results show that Grasp55 is not involved in the regulation of Jam-C expression in HSC. In addition, Grasp55 deficiency does not affect HSC maintenance or differentiation at steady-state or upon hematopoietic stress. We further show that this is not due to compensatory mechanisms because acute depletion of Grasp55 expression using Mx1-Cre-inducible system does not result in hematopoietic abnormalities. This is likely due to the inversely regulated expression of Grasp55 and Jam-C during hematopoietic cell differentiation. Indeed, Grasp55 transcript and protein are expressed at low levels in the most immature hematopoietic cells (HSC-MPP1) and are upregulated in the following differentiation steps (MPP2 and MPP3/4), in which JAM-C expression is lost. We thus tested whether Myc-induced B cell lymphoid leukemia would depend on Grasp55 expression for their growth. Our results show that Grasp55 is necessary for Myc-dependent lymphoid leukemic development in vivo, opening the way for specific Grasp55 targeting in Myc-addicted hematological malignancies.

Materials and Methods

Mice

Generation and genotyping of Gorasp2-constitutive-deficient mice were previously described (12). Because Gorasp2-deficient male are sterile, the colony is maintained by interbreeding of heterozygote mice. The colony was backcrossed on C57/BL6J mice for more than 10 generations. Floxed Gorasp2 lines, obtained before CMV-Cre deleter mice mating during Gorasp2 knockout generation, are maintained by intercrossing and backcrossing on C57/BL6 background for more than seven generations. Conditional inducible Grasp55 (Gorasp2)-deficient mice were obtained by two successive matings: in a first time, $Grasp55^{-/-}$ female were mated with Mx1-cre^{Pos} male mice to obtained $Grasp55^{+/-}$ Mx1-Cre^{Pos} mice; and in a second time, Grasp55^{+/-} Mx1-Cre^{Pos} mice are mated with Grasp55^{fl/fl} (Grasp55 floxed) mice. Grasp55^{fl/-} Mx1-Cre^{Neg} and Grasp55^{fl/-} Mx1-Cre^{Pos} mice were used for experimentation. Same strategy was used to obtain hematopoietic-specific constitutive $Grasp5^{fl/-}$ Vav-Cre mice, $Gorasp2^{fl/-}$ Vav-Cre^{Neg} (GRASP55 wild-type [$Grasp55^{WT}$]), and $Gorasp2^{fl/}$ Vav- Cre^{Pos} (hematopoietic-specific, Grasp55-deficient mice [Grasp55^{ΔHem}]) mice were used for experimentation.

CD45.1/2 mice, used as competitor in competitive assay, were obtained by interbreeding of CD45.1 with CD45.2 mice (purchased from JANVIER LABS). Mice were used at age >8 wk old. All animal experiments were performed according to French Guidelines for Animal Handling in Cancerology Research Center of Marseille Animal Facility (agreement D13 055 04). Experimental protocols were approved by the Ethical Committee no. 14 under the declaration number 02294.01.

Genotyping

Genotyping of *floxed Grasp55* line was achieved by PCR of genomic DNA extracted from mouse tails using the same primers and conditions as constitutive *Gorasp2* mice. However, resulting amplification of the 544-bp fragment for the wild-type allele and the 700-bp fragment for the floxed allele were both obtained using heterozygous mice. Genotyping of Mx1-cre and Vav-cre mice was achieved using the generic Cre and the iVav-Cre genotyping protocols from The Jackson Laboratory.

HSC exhaustion after 5-fluorouracil treatment

 $Grasp55^{WT}$ and $Grasp55^{\Delta Hem}$ mice were injected i.p. once a week with 5-fluorouracil (5-FU) at 120 mg/kg during 5 wk. One day after 5-FU injection, blood parameters were tested using IDEXX ProCyte Dx Hematology Analyzer (IDEXX Laboratories). Mice were sacrificed at day 35 (D35) after the first injection.

Inducible deletion with poly(I:C) and analysis of Grasp55 deletion

Gorasp2 gene deletion in Gorasp2^{ft/-} Mx1-Cre mice was induced by three i.p. injections of 200 μ g poly(I:C) (InvivoGen) on D0, D2, and D4. Gorasp2 gene deletion in WBCs was confirmed on D15 by PCR. Briefly, WBC isolated from 100 μ l of peripheral blood by Ficoll and genomic DNA was extracted by digestion in 250 μ l lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris [pH 8.8], 2.5 mM MgCl₂, 0.45% NP40, and 0.45% Tween 20) with 0.4 mg/ml Proteinase K (Invitrogen) for 30 min at 56°C, then PCR was achieved using same protocol as genotyping. Mice were sacrificed for analysis 1 mo after the first poly(I:C) injection.

Bone marrow mobilization assays

Mobilization was induced using cyclophosphamide (4 mg i.p. at D0) and human rG-CSF (5 mg s.c. at D1, D2, and D3) injections as previously described (8). Mice were sacrificed on D5 for analysis.

Colony-forming assay

Peripheral blood and bone marrow WBCs were isolated by Ficoll. Two hundred thousand blood cells were seeded per well in methylcellulose medium following the manufacturer's instructions (www.stemcell.com, reference 3434; STEMCELL Technologies, Grenoble, France).

Competitive bone marrow transplantation

Lethally irradiated (8 Gy) CD45.1 mice were transplanted with 2.10^6 of total bone marrow cell from donors (*Gorasp2*^{+/+} or *Gorasp2*^{-/-} CD45.2) and competitor (CD45.1/2) cells in a 1:1 ratio by retro-orbital sinus injection. Mice chimerism was assessed monthly by monitoring of host (CD45.1), competitor (CD45.1/2), and donor (CD45.2) cells in peripheral blood by flow cytometry. Chimerism and hematopoietic phenotype in bone marrow were evaluated 18 wk after transplantation.

Thioglycollate-induced peritonitis in chimeric mice

Lethally irradiated (8 Gy) CD45.1 mice were transplanted with 2.10^6 of total bone marrow cell from donors (*Gorasp2^{+/+}* or *Gorasp2^{-/-}* CD45.2) by retro-orbital sinus injection. Eighteen weeks after transplantation, chimeric mice were injected i.p. with 3 ml of thioglycollate 3% (w/v; Sigma-Aldrich). Eighteen hours after injection, mice were sacrificed, and peritoneal exudates were collected by three successive peritoneal washes with 10 ml cold PBS. Cells were counted and analyzed using IDEXX ProCyte Dx Hematology Analyzer (IDEXX Laboratories).

Eµ-Myc cell engraftment in mice

Mouse primary Eµ-Myc lymphoma cells were isolated as previously described (32) and expanded through passaging in irradiated recipient mice. Five hundred thousand GRASP55 knockdown (GRASP55^{KD}) or Grasp55^{WT} Eµ-Myc cells are injected into caudal tail vein of Ly-5.1 mice. Mice were sacrificed at D9 after injection. Tumoral invasion in blood, spleen, and bone marrow was assessed by flow cytometry.

Cytometry and cell sorting

Single-cell suspensions were prepared from bone marrow (one leg: femur and tibia), and RBCs were lysed with ammonium-chloride-potassium buffer (Life Technologies). Cells were incubated with mAbs in PBS-0.5% BSA for 30 min at 4°C. For blood samples, RBC lysis was done after staining with BD FACS Lysing buffer (BD Biosciences). For hematopoietic cell identification, following Abs were used: biotin anti-CD3, CD4, CD8, CD19, CD11c, DX5, Ter119, CD11b, B220, Gr1 (Lineage mixture, BioLegend), CD16/32-PE (clone 2.4G2; BD Pharmingen), CD45.1-PE-CF594 (clone A20; BD Horizon), CD45.2-eF450 (clone104; eBioscience), CD48-PE-cyanine 7 (Cy7) (clone HM48-1; BioLegend), CD150-eF647 (clone TC15-12F12.2; BioLegend), CD117-allophycocyanin-e780 (clone 2B8; eBioscience), CD127-PE-Cy5 (clone A7R34; eBioscience), CD135-PECF594 (clone A2F10.1; BD Horizon), Sca-1-BV421 (clone D7; BD Horizon), CD4-FITC (clone RAM4-5; eBioscience), CD8-PE (clone 53-6.7; eBioscience), B220-AF700 (clone RA3-6B2; eBioscience), CD11ballophycocyanin (M1/70; eBioscience), and BV510-streptavidin (BD Horizon). Eµ-Myc cells were phenotyped using the following: CD19-BV500 (clone 1D3; BD Biosciences), CD23-BV711 (clone B3B4; BD Biosciences), CD25-PE-Cv5 (clone PC61; eBioscience), CD45.2-PE-Cv5.5 (clone 104; eBioscience), B220-allophycocyanin-Cy7 (clone RA3-6B2; BD Biosciences), CD71-BV605 (clone C2; BD Biosciences), CD93-PE-Cy7 (clone AA4.1; eBioscience), BP1-biotin (clone BP1; BD Biosciences), and streptavidin-AF594 (BioLegend). In all experiments, a viability marker was used depending on the panels: SYTOX Green nucleic acid stain (Life Technologies), Fixable Viability Dye eF506 (eBioscience), and DRAQ7 (BioStatus). JAM-B and JAM-C staining were done using staining polyclonal rabbit anti-mouse JAM-B (pAb829) and JAM-C (pAb501) produced in laboratory and PE-conjugated goat-anti-rabbit (H + L) Ab (1/200; Jackson ImmunoResearch Laboratories) as secondary Ab. Grasp55 intracellular staining was done using anti-Grasp55 Ab (Proteintech) and BD Cytofix/Cytoperm solution following the manufacturer's instruction.

For hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) sorting, bone marrow cells were depleted using Lineage Cell Depletion Kit from Miltenyi Biotec and autoMACS Pro. The Lin cells were stained as described in preceding paragraph.

For annexin–propidium iodide, staining cells were stained with allophycocyanin–annexin V (BD Biosciences) and propidium iodide solution (Sigma-Aldrich) in annexin binding buffer (Life Technologies) for 15 min at room temperature.

Stained cells were analyzed by a BD LSR II FACS (lasers 405, 488, 561, and 633 nm) and sorted by Aria III SORP sorter (BD Biosciences). Results were analyzed with BD Diva version 8.0.1 software or FlowJo version 10.0.7 software (Tree Star).

Cell culture

Eμ-Myc clone 504 cells were provided by J.E. Ricci. Eμ-Myc cells were cultured in DMEM GlutaMAX, supplemented with 10% FBS, 1% nonessential amino acids, 1% L-glutamine, 1% HEPES 1 mM, 1% penicillinstreptomycin, 0.1% 2-ME (all cell culture products were purchased from Life Technologies). For cell proliferation, cells were plated at a density of 10,000 cells per well into 96-well plates, and cell numbers were quantified after 24, 48, 72, and 96 h using CellTiter-Glo Assay (Promega). *Grasp55^{+/+}* and *Grasp55^{-/-}* mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were obtained as previously described (12). Chloroquine treatment was performed at a concentration of half IC₅₀ (5 μM for Eμ-Myc cells and 17.5 μM for MEFs) during 24 h. For Eμ-Myc glucose starvation, cells were washed twice in PBS, incubated in DMEM without glucose (Life Technologies), 10% FCS, and 1% penicillin-streptomycin, and cells were quantified 24 h later using CellTiter-Glo (Promega).

Lentiviral transduction

For lentiviral transduction, 1.10^6 cells were plated in 96-well plates in 190 µl complete medium with 8 µg/ml polybrene and 10 µl of lentiviral particles expressing Grasp55 short hairpin RNA (shRNA)–GFP (GRASP55^{KD}) or control GFP (GRASP55^{WT}) vectors (TRIPdU3 vector). Cells were centrifuged at 3000 rpm without brake during 2 h at 32°C and incubated overnight. Next-day medium was replaced by complete medium, and cell fluorescence was checked by microscopy (AMG EVOS LED fluorescence microscope). One week after transduction, transduced cells were sorted by flow cytometry based on GFP expression. Correct GRASP55 silencing was tested by Western blot.

Gene expression analysis

Five hundred for each population (HSC-MPP1, MPP2, and MPP3/4) from wild-type CD45.1 mice were sorted using the autoclone module on an Aria III SORP sorter (BD Biosciences) into 96-well plates in the Reverse Transcription-Specific Target Amplification Master Mix Solution. Cell lysis, cDNA synthesis, and amplification were performed according to Fluidigm protocols. Selected TaqMan Gene Expression Assays (original

magnification $\times 20$) were pooled and diluted with water 100-fold so that each assay is at a final concentration of 0.2× in the pooled assay mixture. Five microliters of CellsDirect 2× Reaction Mix (Invitrogen), 2.5 µl pooled assay mixture, 0.2 µl SuperScript III RT/Platinum Taqmax mixture, and 2.3 µl water were combined to a final volume of 10 µl in one well of a 96-well quantitative PCR plate for the sort. cDNA samples were amplified using the following program: 1) 50°C for 10 min, 2) 95°C for 2 min, 3) 95°C for 15 s, and 4) 60°C for 4 min, and repeat steps 3 and 4 18 times. Preamplified products were diluted 5-fold before analysis with Universal PCR Master Mix and inventoried TaqMan Gene Expression Assays in 96.96 Dynamic Arrays on a BioMark System (Fluidigm). For each gene, the relative expression was defined as the mean value of 40 minus cycle threshold for the gene of interest divided by 40 minus cycle threshold for actin. Results were represented as a heat map using Morpheus software (https://software.broadinstitute.org/morpheus/).

Western blot

GRASP-55 expression by hematopoietic cells was tested using a total of 10,000 sorted cells for each population (HSC-MPP1, MPP2, and MPP3/4) resuspended in 50 µl of RIPA buffer (50 mM Tris HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% Triton, 0.1% SDS, and 1% Na deoxycholate) and 10 µl of 6× sample buffer. Western blots for LC3 were performed on 20 µg of proteins. Whole-protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane. Saturated membranes were exposed to rabbit anti-GRASP55 Ab (1/500e; Proteintech), rabbit anti-LC3 Ab (1/1000e; MBL International), mouse anti– α -tubulin Ab (1/1000, T6074; Sigma-Aldrich) in PBS-1% nonfat milk, and 0.1% Tween 20 at 4°C overnight. Membranes were incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG or HRP-conjugated goat anti-mouse IgG Ab (1/5000; Jackson Immuno-Research Laboratories) at room temperature for 1 h. Signal was revealed using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific).

Immunofluorescence

One thousand sorted cells were incubated in a 50 μ l PBS–0.5% BSA drop on poly-L-lysine–coated slide in a humidified chamber at 37°C during 2 h; buffer was carefully removed by aspiration and replaced by saturation mixture (PBS–2% BSA).

Primary Ab anti-GRASP55 (1/250; Proteintech) was incubated overnight at 4°C in PBS–0.5% BSA. After soft washes, samples were incubated for 1 h at room temperature with donkey anti-rabbit–eF594-conjugated secondary probe purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories. DAPI nuclear staining was done with the second final wash. Coverslip was mounted using ProLong Gold Antifade reagent (Invitrogen).

Images were obtained using a ZEISS LSM 880 Meta Confocal. Images were analyzed using ImageJ. Three-dimensional Golgi volume quantification was performed as previously described (12).

Caspase activity assay

Cells were plated at a density of 10,000 cells per well into a white-walled, 96-well plate. Caspase activity was determined using the Caspase-Glo 3/7 Kit following the manufacturer's instructions (G811A from Promega). Luminescence was measured using a POLARstar ω from BMG LABTECH.

In vivo homing

Eµ-myc GRASP55^{KD} were labeled with Calcein Violet (violet), and GFP (green) was used for Eµ-myc GRASP55^{WT} and injected at 1:1 ratio into mice (5.10^6 cells/200 µl NaCl/mouse). Cells in each organ were analyzed for expression of green or violet fluorescence by flow cytometry. Stained cells were analyzed by an LSR II FACS (lasers 405, 488, 561, and 633 nm; BD Biosciences). Results were analyzed with BD Diva version 8.0.1 software.

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times. Statistical significance was performed using nonparametric Mann–Whitney U test, Student t test, or two-way ANOVA with Bonferroni posttest in Prism software. Any p value <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Regulated expression of GRASP55 during HSC differentiation

We first tested if *Gorasp2*, the gene encoding Grasp55, was expressed in HSPCs using quantitative RT-PCR on sorted cells from mouse bone marrow according to the gating strategy shown

GRASP55 IS DISPENSABLE FOR NORMAL HEMATOPOIESIS



FIGURE 1. Regulated expression of GRASP55 during early mouse hematopoietic cell differentiation. (**A**) Flow cytometry gating strategy used to define HSPCs. Representative dot plot for wild-type mouse is shown. HSC and MPP1 (HSC-MPP1) are defined as Lin^{Neg}Sca^{Pos}Kit^{Pos} (*Figure legend continues*)

in Fig. 1A. Although Jam3, the gene encoding Jam-C, was highly expressed on the most immature compartment (HSC-MPP1) and downregulated in more mature cells, Gorasp2 presented an inverted pattern of expression and was barely detectable in HSC-MPP1 and MPP2 cells (Fig. 1B). Other genes encoding proteins involved in Golgi stacking such as Blzfl (encoding Golgin45) or Golgb1 (encoding Giantin) followed the same pattern of expression as compared with Gorasp2, whereas expression of Golga2 (encoding GM130) remained stable. Of note, and consistent with publicly available datasets from the ImmGen consortium (immgen.org), we failed to detect Gorasp1, the gene encoding Grasp65 in HSPC (data not shown). Grasp55 upregulation between the most immature compartment (HSC-MPP1) and moredifferentiated MPPs (MPP2 and MPP3/4) was further confirmed at the protein level by flow cytometry and Western blotting (Fig. 1C, 1D). Immunostaining for Grasp55 performed on HSC-MPP1, MPP2, and MPP3/4 isolated from wild-type or Grasp55^{-/-} mice confirmed that Grasp55 expression and localization changed during hematopoietic cell differentiation (Fig. 1E). We found that Grasp55 signal was barely detectable in wild-type HSC-MPP1 and was increased in MPP2 and MPP3/4, as confirmed by staining intensity quantification of confocal Z-stacked pictures (Fig. 1F). In addition, three-dimensional quantification of Grasp55 staining revealed that the volume of Grasp55 vesiculotubular objects was not significantly different between HSC-MPP1 and MPP2 cells, whereas there was a significant increase in MPP3/4 cells (Fig. 1G). This indicates that Grasp55 is upregulated and recruited to large Golgi stacks at the transition between MPP2 and MPP3/4 stages of differentiation, suggesting that structural Golgi remodeling occurs during hematopoietic differentiation.

Lack of hematopoietic and inflammatory defects in $Grasp55^{-/-}$ mice

We thus analyzed early hematopoietic differentiation in *Grasp55^{-/-}* mice and compared with control littermate animals. Total number of bone marrow cells and percentages of Lin^{Neg}Sca^{Pos}Kit^{Pos} (LSK) were identical between $Grasp55^{+/+}$ and $Grasp55^{-/-}$ (Fig. 2A, 2B). Results were thus expressed as percentage of the LSK compartment (Fig. 2C) or percentage of total bone marrow (Fig. 2D). Within the LSK compartment, HSC-MPP1, MPP2, or MPP3/4 were not affected by the loss of Grasp55 expression (Fig. 2C) or the more mature common myeloid progenitors or granulocyte/monocyte progenitors (Fig. 2D). In addition, downregulation of JAM-C expression during hematopoietic differentiation was not affected, suggesting that long-term HSC maintenance remained unaffected in absence of Grasp55 expression at steady-state (Fig. 2E). We thus tested if Grasp55 may be involved in emergency hematopoiesis using constitutive Grasp $55\Delta^{Hem}$ obtained by crossing Grasp55^{fl/-} mice with Vav-Cre-transgenic mice. Repeated injection of 5-FU resulted in similar decrease in hematocrit values between $Grasp55^{\text{WT}}$ and $Grasp55\Delta^{\text{Hem}}$ animals (Supplemental Fig. 1A, 1B). D35 was defined as the end point for analysis of

of sustained anemia. No difference in absolute cell numbers or frequencies of early hematopoietic subsets was found between $Grasp55^{\Delta Hem}$ and $Grasp55^{wt}$ control animals after four injections of 5-FU (Supplemental Fig. 1C-F). Although only three mice were analyzed in this pilot experiment, power calculation shows that a tremendous number of mice would have been necessary to get a chance to reach statistical significance. We thus decided to move to another model in which deletion of Grasp55 is induced in an acute manner to not allow for compensatory mechanism to take place. To this end, Grasp55^{fl/-} animals crossed with Mx1cre-transgenic mice were injected with poly(I:C), resulting in floxed allele deletion 15 d upon poly(I:C) treatment (Supplemental Fig. 2A). Analysis of absolute bone marrow cell numbers and frequencies of LSK cells showed no differences between controls and conditional induced knockout mice poly(I:C)-treated Grasp55^{fl/-} Mx1-Cre mice (Supplemental Fig. 2B, 2C), nor did the analysis of different LSK (HSC-MPP1, MPP2, and MPP3/4) and progenitor subsets (common myeloid progenitor and granulocyte/monocyte progenitor) reveal differences between experimental groups (Supplemental Fig. 2D, 2E). Finally, because Grasp55 has also been involved in inflammatory response in vitro (23), we also tested whether inflammatory recruitment of leukocytes at effector sites would be affected by Grasp55 deficiency. In this study, again, we did not find significant differences in acute inflammatory recruitment of leukocytes to the peritoneal cavity upon thioglycollate challenge (Supplemental Fig. 3). This indicates that Grasp55 is dispensable for emergency hematopoiesis and inflammatory recruitment in vivo.

bone marrow composition to avoid death of the animals because

HSC mobilization and engraftment are not affected by Grasp55 deficiency

Because Grasp55 has been involved in the regulation of retention signals for HSC in the bone marrow, we next performed HSC mobilization assays using cyclophosphamide and G-CSF. This experimental setting induces dramatic changes in molecular mechanisms involved in HSC retention within bone marrow niches and results in myeloid-biased expansion of HSPCs (33). As expected, increase of LSK cells frequencies was found in mouse bone marrow and blood upon mobilization (Fig. 3A, 3B). However, such increase was independent of GRASP55 expression. When CFU cell assays were performed as a read-out of hematopoietic cell progenitor activity, no differences were found between $Grasp55^{-/-}$ mice and control littermate animals (Fig. 3C). To get further insights into the function of GRASP55 in controlling cellular cross-talks upon hematopoietic stress, we performed competitive bone marrow engraftment assays. To avoid bias due to the difference in CD45.1, CD45.2, and CD45.1/2 allele expression (34), we designed two experimental groups using CD45.2 Grasp55^{+/+} or CD45.2 Grasp55^{-/-} bone marrow cells admixed at 1:1 ratios with wild-type CD45.1/2 bone marrow cells as competitors (Supplemental Fig. 4A). Engraftment was performed in

⁽LSK) CD150⁺ CD48⁻, MPP2 as LSK CD150⁺ CD48⁺, and MMP3/4 as LSK CD150⁻ CD48⁺. Common myeloid progenitors and granulocyte macrophage progenitor are respectively defined as Lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺ (LK) CD127⁻CD16/32⁻ and LK CD127⁻CD16/32⁺. (**B**) Heat-map representation of relative mRNA expression as detected by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) on 500 sorted cells. Actin expression levels were used for normalization. (**C**) Histogram showing changes in GRASP55 expression as measured by flow cytometry. Results are expressed as fold changes relative to mean fluorescence intensity signals obtained for HSC-MPP1 subset (n = 4 mice). *p < 0.05, **p < 0.01. (**D**) Representative Western blot against GRASP55 on cell lysates obtained from 20,000 sorted cells. Ponceau red staining is shown as loading control. (**E**) Representative pictures of GRASP55 immunostaining on indicated cells isolated by flow cytometry cell sorting. Cells isolated from *Grasp55^{-/-}* mice were used as control (n = 3 mice). (**F**) Summed pixel intensities of individual objects found in individual confocal planes of Z-stacks acquired on five HSC-MPP1, eight MPP2, and six MPP3/4 cells. ***p < 0.001. (**G**) Three-dimensional quantification expressed as the volume of the largest vesiculotubular structures found in HSC-MPP1, MPP2, and MPP3/4 cells analyzed in (E). A significant enlargement of GRASP55-stained structures was found in MPP3/4. *p < 0.05, **p < 0.01.



FIGURE 2. Early hematopoietic differentiation in $Grasp55^{-/-}$ mice. (**A**) Absolute numbers of bone marrow cells isolated from $Grasp55^{-/-}$ and control littermate mice. Results are expressed as mean \pm SEM of cell numbers isolated from two legs per mice (n = 6 per group). (**B–D**) Relative frequencies of LSK cells (**B**), HSC-MPP1, MPP2, and MPP3/4 cells (**C**), and common myeloid progenitors and granulocyte/monocyte progenitors (**D**) found in the bone marrow of $Grasp55^{-/-}$ and control littermate mice. Flow cytometry gating strategy used to define HSPC in control and Grasp-55–deficient mouse is described in Fig. 1A. (**E**) Graph showing the relative median fluorescence intensity (MFI) detected by flow cytometry for JAM-C staining on HSC-MMP1, MPP2, and MPP3/4 cells isolated from $Grasp55^{-/-}$ and control littermate mice. Results are expressed as mean \pm SEM. Data are representative of six independent experiments.

CD45.1 lethally irradiated recipients (Fig. 4A). Such experiments are highly sensitive and have been widely used to highlight subtle defects in hematopoiesis, which are not revealed in other experimental settings. Using chimerism measurement in the peripheral blood as follow-up, we found significant decrease in $Grasp55^{-/-}$ hematopoietic engraftment as compared with $Grasp55^{+/+}$ cells before 12 wk, whereas differences disappeared at 16 wk (Fig. 4B).

This was mostly due to a reduction of *Grasp55*-deficient lymphoid cells in the blood circulation during the first 4 mo after engraftment (Fig. 4C–F). Such difference was abolished after 18 wk, suggesting that this transient difference revealed subtle changes in the early steps of *Grasp55*-deficient cells commitment toward lymphoid versus myeloid lineage after engraftment. This is consistent with the high expression of Grasp55 found in MPP3/MPP4



FIGURE 3. HSC mobilization is not affected by *Grasp55* deficiency. (**A**) Relative frequencies of LSK cells found in the bone marrow of *Grasp55^{-/-}* and control littermate mice after HSC mobilization by cyclophosphamide (CY)/G-CSF. NaCl-treated mice are used as control. (**B**) Relative frequencies of LSK cells found in blood of CY/G-CSF or NaCl-injected *Grasp55^{-/-}* and Grasp^{+/+} mice. (**C**) Number of CFU cells (CFU-C) mobilized into blood from *Grasp55^{-/-}* and control littermate mice after CY/G-CSF. Each symbol represents the average of colony numbers obtained per mice (2.10⁵ cells per well, two wells per mouse). Results from a single experiment with n = 3-4 mice are shown. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.



FIGURE 4. Competitive engraftment of *Grasp55*-deficient bone marrow cells. (**A**) Experimental design of competitive bone marrow transplantation. The same number of *Grasp55*^{+/+} or *Grasp55*^{-/-} donor (CD45.2) cells were mixed in 1:1 ratio with competitor (CD45.1/2) bone marrow cells (see Supplemental Fig. 4A) and injected into CD45.1 lethally irradiated recipients. (**B**) Graph showing the frequency of CD45.2 donor cells in the blood of recipient mice engrafted either with *Grasp55*^{+/+} (white dots) or *Grasp55*^{-/-} (filled black dots) donor cells. *p < 0.05. (**C**–**F**) Donor-specific CD4⁺ T cell (C), CD8⁺ T cell (D), B220⁺ B cell (E), and CD11b⁺ myeloid cell (F) frequencies in the blood of mice transplanted with *Grasp55*^{+/+} (white dots) or *Grasp55*^{-/-} (filled black dots) bone marrow. (**G** and **H**) Relative frequencies of donor and competitor LSK, HSC-MPP1, MPP2, MPP3/4 (G), common myeloid progenitor, and granulocyte/monocyte progenitor (H) cells found in the bone marrow of mixed chimera engrafted with *Grasp55*^{+/+} or *Grasp55*^{-/-} donor cells 18 wk after cell injection. Results are expressed as mean ± SEM. Data show results of one representative experiment from two independent experiments.



FIGURE 5. *Grasp55* silencing inhibits Eµ-myc leukemic engraftment. (**A**) Phenotype of primary Eµ-myc clone assessed by flow cytometry and showing the pre–B cell nature of leukemic cells. (**B**) JAM-B expression by the primary Eµ-myc clone shown in (A). (**C**) Western blot analysis of Eµ-myc cells 1 wk after transfection with GFP as control (GRASP55^{WT}) or short hairpin GRASP55 lentivirus (GRASP55^{KD}) using GRASP55 (upper panel) or actin (lower panel) Abs. (**D**) Proliferation of Eµ-Myc GRASP55^{WT} and Eµ-Myc GRASP55^{KD} in complete medium was determined using ATPmetry (Cell Titer Glow, Promega). Results are expressed as mean relative light unit (RLU) values \pm SEM obtained from four replicates. Doubling times are 16.20 \pm 1.468 h for Eµ-Myc GRASP55^{WT} and 20.10 \pm 3.869 h for Eµ-Myc GRASP55^{KD}. (**E**–**G**) Tumor invasion of Eµ-myc cells in the indicated organ 9 d after injection of 50,000 GRASP55^{WT} or GRASP55^{KD} Eµ-myc cells in CD45.1 mice. Tumor invasion in spleen is revealed by spleen weight and percentage of CD45.2⁺GFP⁺ cells (E). Percentages of CD45.2⁺ GFP⁺ cells in bone (F) and blood (G) are shown. Results are expressed as mean \pm SEM (*n* = 6 mice per group). One representative experiment from two independent experiments is shown. ***p* < 0.01.

myeloid- and lymphoid-biased progenitors (Fig. 1). When chimerism in the bone marrow was analyzed after 18 wk, overt engraftment advantage for wild-type competitor cells (CD45.1/2) against donor cells (CD45.2) was found in the LSK compartment irrespective of *Grasp55* genotype (Fig. 4G). No change in bone marrow cellularity was observed (Supplemental Fig. 4B). More interestingly, specific significant decrease in common myeloid progenitor frequencies was observed in mixed chimeric mice engrafted with *Grasp55^{-/-}* and wild-type competitor cells as compared with *Grasp55^{+/+}*/wild-type chimeras, whereas no change in granulocyte/monocyte progenitor frequencies was detected (Fig. 4H). This was due to a significant decrease in competitor cell frequencies, suggesting that loss of Grasp55 expression in hematopoietic cells may alter indirectly the maintenance of wild-type common myeloid progenitors.

GRASP55 plays a role in Myc-addicted leukemic growth in vivo

Because we failed to detect Grasp55-dependent alterations of the hematopoietic system at steady-state or upon stress, we asked the question whether GRASP55 may contribute to development of Myc-addicted lymphoma/leukemia known to depend on autophagy pathway activation (30, 31, 35). One leukemic primary cell clone obtained from Eµ-Myc mice harbored a pre–B cell phenotype, as



FIGURE 6. *Grasp55* silencing decreases leukemic cell survival. (**A**) Left panel, Dot plot showing the indicated fluorescence of the mixture of GRASP55^{WT} (GFP⁺Calcein Violet⁻) and GRASP55^{KD} (GFP⁺Calcein Violet⁺) Eµ-myc cells before injection. Right panels, Dot plots showing the GFP and Calcein Violet fluorescence signals 16 h after injection in the indicated organs. Relative proportions of GRASP55^{WT} (Calcein Violet⁻) and GRASP55^{KD} (Calcein Violet⁺) cells within the GFP⁺ compartments are indicated. (**B**) Absolute number of GRASP55^{WT} and GRASP55^{KD} Eµ-myc cells in the indicated organs 16 h after injection. Each symbol represents an individual mouse (n = 6 mice per group). Results obtained in a single experiment are expressed as mean ± SD. ***p < 0.001.

demonstrated by positivity for CD19, CD25, CD43, BP1, and CD93 (Fig. 5A). In addition, the selected clone expressed JAM-B, a known interacting partner of GRASP55 [Fig. 5B and (12)]. Two cell lines in which GRASP55 expression was depleted or not were derived upon lentiviral transfection with shRNA directed against GRASP55 or empty vector containing the GFP only (Fig. 5C). Silencing GRASP55 did not affect JAM-B expression (data not shown) or cell proliferation (Fig. 5D). Upon engraftment in C57BL/6 animals, control E μ -Myc cells invaded spleen and bone marrow within 9 d, whereas invasion by Eµ-Myc GRASP55KD was greatly reduced (Fig. 5E, 5F). This was accompanied by a 3-fold decrease in peripheral leukemic cell load for Eµ-Myc GRASP55^{KD} leukemic cells as compared with control (Fig. 5G). Because such differences may rely on changes in homing or engraftment properties, we tested the tissue homing properties of the two cell lines. To this end, tissue homing was analyzed upon intravascular injection of mixed Eµ-Myc GRASP55^{WT} and Eµ-Myc GRASP55^{KD} cells, respectively labeled by GFP and GFP/Calcein Violet reporters (Fig. 6A, left panel). Frequencies of Eµ-Myc GRASP55^{WT} cells were significantly increased as compared with Eµ-Myc GRASP55^{KD} cells in spleen, bone marrow, and blood 16 h after injection (Fig. 6B). This last result was surprising because reduced short term tissue homing is usually accompanied by increased number of cells remaining in the blood (36).

GRASP55 regulates cell survival in an autophagy independent manner

We thus hypothesized that $E\mu$ -Myc GRASP55^{KD} cells may present reduced survival during early steps of homing experiments. Spontaneous apoptosis of Eµ-Myc GRASP55KD cells was thus compared with Eµ-Myc GRASP55^{WT} cells. To this end, caspase activity was measured 12 h after viable cell replating in fresh medium. A significant increase of caspase 3/7 activity was observed in Eµ-Myc GRASP55KD cell culture as compared with control (Fig. 7A). Accordingly, we observed an increase in early and late apoptotic cells in Eµ-Myc GRASP55^{KD} cell culture as compared with Eµ-Myc GRASP55^{WT} (Fig. 7B, 7C). However, the effect was only marginal and would not totally explain results from in vivo homing experiments. Because normal value of glucose level in mouse serum is by far lower than in culture medium (1.4 versus 4 g/l) and because GRASP55 has been involved in glucose sensing (37), we then reasoned that glucose starvation may be needed to reveal a more pronounced difference. We thus cultured Eµ-Myc leukemic cells for 96 h in complete medium or in absence of glucose. Although more than 67% of Eµ-Myc GRASP55^{WT} cells survived glucose starvation, <55% of Eµ-Myc GRASP55^{KD} cells were still alive as compared with control culture condition in complete medium (Fig. 7D). This result is consistent with a recent study showing that GRASP55 sense glucose deprivation to promote autophagosome-lysosome fusion (19). We then questioned whether such a pathway contributes to the better survival of Eµ-Myc proficient cells. To this end, we treated cells with chloroquine, which is known to induce Eµ-Myc cell death through inhibition of lysosome function and autophagosome accumulation (38). We found no differences in cytotoxicity with respect to Grasp55 expression in Eµ-Myc cells or in MEFs isolated from $Grasp55^{+/+}$ or $Grasp55^{-/-}$ mice (Fig. 8A). We confirmed that Myc-transformed cells were more sensitive to

2693



FIGURE 7. Grasp55 silencing increases apoptosis. (**A**) Histograms showing Caspase 3/7 activity of GRASP55^{WT} (white bar) and GRASP55^{KD} Eµ-myc cells (black bar) 12 h after plating and expressed as fold increase over time 0. **p < 0.01. (**B**) Dot plots showing representative results of annexin V and propidium iodide (PI) or cytometry staining of GRASP55^{WT} and GRASP55^{KD} Eµ-myc cells 12 h after plating in fresh medium. (**C**) Quantification of results shown in (**B**) showing significant decrease survival of GRASP55^{KD} as compared with GRASP55^{WT} Eµ-myc cells 12 h after plating. Conversely, significant increases in early and late apoptosis are observed. *p < 0.05, ***p < 0.001. (**D**) Graph showing Eµ-myc cell survival upon glucose starvation after 96 h. Results are expressed as percentage of survival obtained in complete medium. One representative experiment from three independent experiments is shown. *p < 0.05.

chloroquine than MEFs as previously reported (Fig. 8B and (38)). However, we found no difference in LC3-II accumulation between Grasp55-proficient and -deficient cells at the steady-state or upon chloroquine treatment (Fig. 8C, 8D). Altogether, these results argue for an increased sensitivity to glucose starvation of $E\mu$ -Myc Grasp55-deficient cells without dramatic changes in autophagic fluxes.

Discussion

In the current study, we have addressed the physiological function of Grasp55 in normal, emergency, and pathological hematopoiesis using *Grasp55*-deficient mice for which we have previously reported spermatogenesis defects (12). Surprisingly, we found no difference in normal and emergency hematopoiesis between Grasp55-deficient and -proficient mice, even though Grasp55 has been involved in the regulation of number of molecules known to be essential for hematopoietic homeostasis. We rule out that this was due to incomplete deletion of the gene because mice presented overt phenotypes reminiscent of $Jam-c^{-/-}$ mice, such as male infertility (3, 12, 39), which has been confirmed in another *Grasp55*-deficient strain (23). Although the absence of JAM-C deregulation in *Grasp55^{-/-}* hematopoietic cells may be easily explained by the inverted expression pattern of JAM-C and GRASP55 during early hematopoietic cell differentiation (Fig. 1), the lack of overt immunohematopoietic phenotype remains puzzling. Indeed, given the roles of GRASP55 in Golgi structure, protein expression, and autophagy (19, 23, 40, 41), one could expect dramatic effects due to the loss of GRASP55 expression when the hematopoietic system is challenged.

Several key regulators of hematopoietic homeostasis, such as TGF- β , membrane-bound SCF, or MT1-MMP have been shown to interact with GRASP55 (25, 29). TGF- β and membrane-bound SCF interact with GRASP55 through canonical C-terminal PDZ-binding motifs (25). Interaction of GRASP55 with transmembrane TGF- β was directly correlated to cell surface levels because mutation of the last 2 hydrophobic aa reduced surface expression and GRASP55 interaction, whereas truncation of the last 8 aa abolished interaction and expression. However, the reverse experiment consisting in silencing expression of GRASP55 and measuring TGF- β or membrane-bound SCF expression were not



FIGURE 8. GRASP55 is not required for autophagy. (**A**) Cytotoxicity of chloroquine on GRASP55^{WT} and GRASP55^{KO} Eµ-Myc and Grasp55^{+/+} and Grasp55^{-/-} MEFs at 24 h using CellTiter-Glo Assay. (**B**) IC₅₀ of chloroquine on GRASP55^{WT} and GRASP55^{KO} Eµ-Myc and Grasp55^{+/+} and Grasp55^{-/-} MEFs at 24 h. Results of one representative experiment from three independent experiments are shown. (**C** and **D**) Western blot against GRASP55 and LC3 on GRASP55^{WT} and GRASP55^{KO} Eµ-Myc (C) and Grasp55^{+/+} and Grasp55^{-/-} MEFs (D) after 24 h chloroquine treatment. Tubulin was used as loading control. One representative experiment from three independent experiments is shown.

performed in these studies. Thus, we cannot exclude that bone marrow stromal cells use alternative trafficking machinery to express these niche factors. Our results are more difficult to reconcile with the described function of GRASP55 in regulating MT1-MMP activation or IL-1ß secretion (23, 27, 29). Indeed, MT1-MMP activation by furin has been shown to depend on GRASP55 using dominant negative approaches and overexpression of GRASP55 in HT1080 human fibrosarcoma cell line (29). MT1-MMP plays a central role in maintenance of hematopoietic homeostasis through the control of HIF1 α and MMP2 activation (42, 43). The latter has been shown to activate MMP9, which releases membrane-bound SCF upon HSC mobilization with G-CSF (9). We failed to detect hematopoietic alterations at steady-state homeostasis or upon G-CSF-induced HSC mobilization in Grasp55^{-/-} mice, indicating that alternative pathways regulating MT1-MMP activation must exist in bone marrow stromal cells. Same is true for IL-1β secretion. Indeed, a prior study has shown that silencing Grasp55 expression in bone marrow-derived macrophages (BMDM) reduces IL-1ß secretion induced by nigericin and starvation (27). A more recent study has demonstrated that IL-1ß secretion is reduced in BMDM isolated from Grasp55deficient mice because of impaired UPR signaling (23). However, we found no differences in hematopoietic response upon 5-FU treatment, which is known to involve IL-1ß secretion by myeloid cells (44). This discrepancy may be due to differences in the pathways involved in IL-1ß secretion by BMDM as compared with IL-1 β secretion by the whole organism in response to hematopoietic stress. This raises the question as to whether silencing Grasp55 in isolated cellular models reflects its physiological function. Alternatively, it may well be that redundant unconventional secretory pathways are present in higher eukaryotes and that compensatory

mechanisms take place in absence of Grasp55. Indeed, a single GRASP isoform is present in *Saccharomyces cerevisiae* and has been involved in autophagic mediated secretion of Acb1, which lacks a signal sequence similar to IL-1 β (45). This Grasp homolog represents the unique PDZ-containing protein of yeast. This is in sharp contrast with the situation in mammals in which more than 250 PDZ domains are present in more than 150 proteins (46). Therefore, it would be interesting to perform an shRNA screening against genes encoding PDZ-containing proteins that could compensate *Gorasp2* deficiency for maintenance of HSC homeostasis.

More interestingly, our results demonstrate that Eµ-Myctransformed hematopoietic cells become addicted to Grasp55 pathway. Myc-dependent transformation is well known to induce UPR, which results in endoplasmic reticulum stress-induced autophagy (31). Autophagy promotes survival of tumor cells through processing cellular contents destined for degradation to support bioenergetics (30). Because Grasp55 has been involved in autophagy-driven pathways of unconventional secretion and in autophagosome-lysosome fusion upon glucose deprivation (19, 27, 45, 47), it may well be that the Eµ-Myc Grasp55^{KD} cells lose their ability to use autophagy as rescue mechanism and become sensitized to apoptosis. This would be consistent with previous findings showing that caloric restriction sensitizes Eµ-Myc cells to inhibitors of the antiapoptotic Bcl-2 protein family (48). It would, therefore, be interesting to explore effects of combined drug inhibition of Grasp55 and antiapoptotic proteins in additional cancer models known to involve UPR response and autophagy.

Acknowledgments

We are grateful to the flow cytometry, microscopy, and animal core facilities for providing supportive help. We thank C. Bagnis and J.E. Ricci, who provided lentiviral stocks and primary lymphoma cells from $E\mu$ -Myc mice, respectively.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Forsberg, E. C., S. S. Prohaska, S. Katzman, G. C. Heffner, J. M. Stuart, and I. L. Weissman. 2005. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet.* 1: e28.
- Praetor, A., J. M. McBride, H. Chiu, L. Rangell, L. Cabote, W. P. Lee, J. Cupp, D. M. Danilenko, and S. Fong. 2009. Genetic deletion of JAM-C reveals a role in myeloid progenitor generation. *Blood* 113: 1919–1928.
- Gliki, G., K. Ebnet, M. Aurrand-Lions, B. A. Imhof, and R. H. Adams. 2004. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. *Nature* 431: 320–324.
- Arrate, M. P., J. M. Rodriguez, T. M. Tran, T. A. Brock, and S. A. Cunningham. 2001. Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor. J. Biol. Chem. 276: 45826–45832.
- Lamagna, C., P. Meda, G. Mandicourt, J. Brown, R. J. Gilbert, E. Y. Jones, F. Kiefer, P. Ruga, B. A. Imhof, and M. Aurrand-Lions. 2005. Dual interaction of JAM-C with JAM-B and alpha(M)beta2 integrin: function in junctional complexes and leukocyte adhesion. *Mol. Biol. Cell* 16: 4992–5003.
- Arcangeli, M. L., V. Frontera, F. Bardin, E. Obrados, S. Adams, C. Chabannon, C. Schiff, S. J. Mancini, R. H. Adams, and M. Aurrand-Lions. 2011. JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *Blood* 118: 4609–4619.
- Pietras, E. M., D. Reynaud, Y. A. Kang, D. Carlin, F. J. Calero-Nieto, A. D. Leavitt, J. M. Stuart, B. Göttgens, and E. Passegué. 2015. Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. *Cell Stem Cell* 17: 35–46.
- Arcangeli, M. L., F. Bardin, V. Frontera, G. Bidaut, E. Obrados, R. H. Adams, C. Chabannon, and M. Aurrand-Lions. 2014. Function of Jam-B/Jam-C interaction in homing and mobilization of human and mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 32: 1043–1054.
- Heissig, B., K. Hattori, S. Dias, M. Friedrich, B. Ferris, N. R. Hackett, R. G. Crystal, P. Besmer, D. Lyden, M. A. Moore, et al. 2002. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109: 625–637.
- Lévesque, J. P., J. Hendy, Y. Takamatsu, P. J. Simmons, and L. J. Bendall. 2003. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J. Clin. Invest.* 111: 187–196.
- Lévesque, J. P., Y. Takamatsu, S. K. Nilsson, D. N. Haylock, and P. J. Simmons. 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.
- Cartier-Michaud, A., A. L. Bailly, S. Betzi, X. Shi, J. C. Lissitzky, A. Zarubica, A. Sergé, P. Roche, A. Lugari, V. Hamon, et al. 2017. Genetic, structural, and chemical insights into the dual function of GRASP55 in germ cell Golgi remodeling and JAM-C polarized localization during spermatogenesis. *PLoS Genet.* 13: e1006803.
- Barr, F. A., C. Preisinger, R. Kopajtich, and R. Körner. 2001. Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus. J. Cell Biol. 155: 885–891.
- Xiang, Y., and Y. Wang. 2010. GRASP55 and GRASP65 play complementary and essential roles in Golgi cisternal stacking. J. Cell Biol. 188: 237–251.
- Barr, F. A., N. Nakamura, and G. Warren. 1998. Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae. *EMBO J.* 17: 3258–3268.
- Zhao, J., B. Li, X. Huang, X. Morelli, and N. Shi. 2017. Structural basis for the interaction between Golgi reassembly-stacking protein GRASP55 and Golgin45. *J. Biol. Chem.* 292: 2956–2965.
- Bekier, M. E., II, L. Wang, J. Li, H. Huang, D. Tang, X. Zhang, and Y. Wang. 2017. Knockout of the Golgi stacking proteins GRASP55 and GRASP65 impairs Golgi structure and function. *Mol. Biol. Cell* 28: 2833–2842.
- Xiang, Y., X. Zhang, D. B. Nix, T. Katoh, K. Aoki, M. Tiemeyer, and Y. Wang. 2013. Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65. [Published erratum appears in 2013 Nat. Commun. 4: 2310.] Nat. Commun. 4: 1659.
- Zhang, X., L. Wang, B. Lak, J. Li, E. Jokitalo, and Y. Wang. 2018. GRASP55 senses glucose deprivation through O-GlcNAcylation to promote autophagosomelysosome fusion. *Dev. Cell* 45: 245–261.e6.
- Nickel, W., and C. Rabouille. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. [Published erratum appears in 2009 Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10: 234.] Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10: 148–155.
- Giuliani, F., A. Grieve, and C. Rabouille. 2011. Unconventional secretion: a stress on GRASP. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 498–504.
- Gee, H. Y., S. H. Noh, B. L. Tang, K. H. Kim, and M. G. Lee. 2011. Rescue of ΔF508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell* 146: 746–760.
- Chiritoiu, M., N. Brouwers, G. Turacchio, M. Pirozzi, and V. Malhotra. 2019. GRASP55 and UPR control interleukin-1β aggregation and secretion. *Dev. Cell* 49: 145–155.e4.

- 24. D'Angelo, G., L. Prencipe, L. Iodice, G. Beznoussenko, M. Savarese, P. Marra, G. Di Tullio, G. Martire, M. A. De Matteis, and S. Bonatti. 2009. GRASP65 and GRASP55 sequentially promote the transport of C-terminal valine-bearing cargos to and through the Golgi complex. J. Biol. Chem. 284: 34849–34860.
- Kuo, A., C. Zhong, W. S. Lane, and R. Derynck. 2000. Transmembrane transforming growth factor-alpha tethers to the PDZ domain-containing, Golgi membrane-associated protein p59/GRASP55. *EMBO J.* 19: 6427–6439.
- Stein, M. F., K. Blume, C. S. Heilingloh, M. Kummer, B. Biesinger, H. Sticht, and A. Steinkasserer. 2015. CD83 and GRASP55 interact in human dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459: 42–48.
- Dupont, N., S. Jiang, M. Pilli, W. Ornatowski, D. Bhattacharya, and V. Deretic. 2011. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1β. *EMBO J.* 30: 4701–4711.
- Nickel, W., and M. Seedorf. 2008. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24: 287–308.
- Roghi, C., L. Jones, M. Gratian, W. R. English, and G. Murphy. 2010. Golgi reassembly stacking protein 55 interacts with membrane-type (MT) 1-matrix metalloprotease (MMP) and furin and plays a role in the activation of the MT1-MMP zymogen. *FEBS J.* 277: 3158–3175.
- Amaravadi, R. K., D. Yu, J. J. Lum, T. Bui, M. A. Christophorou, G. I. Evan, A. Thomas-Tikhonenko, and C. B. Thompson. 2007. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J. Clin. Invest.* 117: 326–336.
- Hart, L. S., J. T. Cunningham, T. Datta, S. Dey, F. Tameire, S. L. Lehman, B. Qiu, H. Zhang, G. Cerniglia, M. Bi, et al. 2012. ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. J. Clin. Invest. 122: 4621–4634.
- Chiche, J., S. Pommier, M. Beneteau, L. Mondragón, O. Meynet, B. Zunino, A. Mouchotte, E. Verhoeyen, M. Guyot, G. Pagès, et al. 2015. GAPDH enhances the aggressiveness and the vascularization of non-Hodgkin's B lymphomas via NF-κB-dependent induction of HIF-1α. *Leukemia* 29: 1163–1176.
- Morrison, S. J., D. E. Wright, and I. L. Weissman. 1997. Cyclophosphamide/ granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1908–1913.
- Waterstrat, A., Y. Liang, C. F. Swiderski, B. J. Shelton, and G. Van Zant. 2010. Congenic interval of CD45/Ly-5 congenic mice contains multiple genes that may influence hematopoietic stem cell engraftment. *Blood* 115: 408–417.
- Adams, J. M., A. W. Harris, C. A. Pinkert, L. M. Corcoran, W. S. Alexander, S. Cory, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318: 533–538.
- 36. He, W., S. Holtkamp, S. M. Hergenhan, K. Kraus, A. de Juan, J. Weber, P. Bradfield, J. M. P. Grenier, J. Pelletier, D. Druzd, et al. 2018. Circadian expression of migratory factors establishes lineage-specific signatures that guide the homing of leukocyte subsets to tissues. *Immunity* 49: 1175–1190.e7.
- Zhang, X., and Y. Wang. 2018. GRASP55 facilitates autophagosome maturation under glucose deprivation. *Mol. Cell. Oncol.* 5: e1494948.
- Maclean, K. H., F. C. Dorsey, J. L. Cleveland, and M. B. Kastan. 2008. Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis. J. Clin. Invest. 118: 79–88.
- Imhof, B. A., C. Zimmerli, G. Gliki, D. Ducrest-Gay, P. Juillard, P. Hammel, R. Adams, and M. Aurrand-Lions. 2007. Pulmonary dysfunction and impaired granulocyte homeostasis result in poor survival of Jam-C-deficient mice. *J. Pathol.* 212: 198–208.
- Zhang, X., and Y. Wang. 2016. Glycosylation quality control by the Golgi structure. J. Mol. Biol. 428: 3183–3193.
- 41. Rabouille, C., and A. D. Linstedt. 2016. GRASP: a multitasking tether. Front. Cell Dev. Biol. 4: 1.
- Nishida, C., K. Kusubata, Y. Tashiro, I. Gritli, A. Sato, M. Ohki-Koizumi, Y. Morita, M. Nagano, T. Sakamoto, N. Koshikawa, et al. 2012. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/ cytokine gene transcription within niche cells. *Blood* 119: 5405–5416.
- Baramova, E. N., K. Bajou, A. Remacle, C. L'Hoir, H. W. Krell, U. H. Weidle, A. Noel, and J. M. Foidart. 1997. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett.* 405: 157–162.
- 44. Pietras, E. M., C. Mirantes-Barbeito, S. Fong, D. Loeffler, L. V. Kovtonyuk, S. Zhang, R. Lakshminarasimhan, C. P. Chin, J. M. Techner, B. Will, et al. 2016. Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 18: 607–618.
- Duran, J. M., C. Anjard, C. Stefan, W. F. Loomis, and V. Malhotra. 2010. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. J. Cell Biol. 188: 527–536.
- Ivarsson, Y. 2012. Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. FEBS Lett. 586: 2638–2647.
- Zhang, X., and Y. Wang. 2018. The Golgi stacking protein GORASP2/GRASP55 serves as an energy sensor to promote autophagosome maturation under glucose starvation. *Autophagy* 14: 1649–1651.
- Meynet, O., B. Zunino, L. Happo, L. A. Pradelli, J. Chiche, M. A. Jacquin, L. Mondragón, J. F. Tanti, B. Taillan, G. Garnier, et al. 2013. Caloric restriction modulates Mcl-1 expression and sensitizes lymphomas to BH3 mimetic in mice. *Blood* 122: 2402–2411.



Supplementary Figure 1: Hematopoietic stress response of *Grasp55^{-/-}* **mice. (A)** Experimental design for HSC exhaustion after 5-fluoro-uracil (5-FU) treatment: *Grasp55*^{fl/-} Vav-cre^{Neg} and *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Pos} mice were injected weekly with 120mg/kg 5-FU and bled one day later over five weeks. Mice were sacrificed at D35 after first injection. **(B)** Hematocrit levels of Grasp55^{fl/-}Vav-cre^{Neg} and Grasp55^{fl/-}Vav-cre^{Pos} mice at indicated time points. (n=3 per group). * p< 0.05, ** p< 0.01, *** p<0.0001. **(C)** Absolute numbers of bone marrow cells isolated from *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Neg} and *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Pos} animals at sacrifice. **(D-F)** Relative frequencies of LSK (D), HSC-MPP1, MPP2, MPP3-4 (E), CMP and GMP (F) found in the bone marrow of from *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Neg} and *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Pos}



Supplementary Figure 2: Induced deletion of Grasp55 in adult hematopoietic cells does not result in impaired hematopoiesis. (A) Agarose gel of the PCR-amplified products obtained from white blood cells isolated from Grasp55fl/- Mx1-CreNeg and Grasp55fl/- Mx1-CrePos fifteen days after injection with polyI:C or NaCl. (B-E) Absolute numbers of bone marrow cells (B) and relative frequencies of LSK (C) HSC-MPP1, MPP2, MPP3-4 (D) CMP and GMP (E) found in the bone marrow of from Grasp55fl/- Mx1-CreNeg and Grasp55fl/- Mx1-CrePos one month after Mx1-cre induction with polyI:C. NaCl injected animals and mice lacking Mx1-Cre expression are used as control. No significant difference between experimental groups is observed. Results represent the pool of two independent experiments with n=3 to 5 mice per group.



Supplementary Figure 3: GRASP-55 is dispensable for inflammatory cells recruitment in thioglycollate-induced peritonitis. Absolute number of total cells (left panel) and leukocytes frequencies (right panel) in peritoneal lavage fluids of Grasp55^{-/-} and Grasp55^{+/+} chimeric mice 18 hours after thioglycollate i.p. injection. One representative experiment is shown (from three independent experiments).



Supplementary Figure 4: Competitive bone marrow transplantation

(A) Representative dot plots showing the 1:1 ratio of donor and competitor cells for the indicated experimental group used in Figure 4 (Grasp55-/-, left panel and Grasp55+/+, right panel). (B) Absolute number of bone marrow cells in recipient mice 18 weeks after engraftment with $Grasp55^{+/+}$ and $Grasp55^{-/-}$ donor cells.

leukemic growth.

Anne-Laure Bailly^{*}, Julien M.P. Grenier^{*}, Amandine Cartier-Michaud^{*}, Florence Bardin^{*}, Marielle Balzano^{*}, Armelle Goubard^{*}, Jean-Claude Lissitzky^{*}, Maria De Grandis[†], Stéphane J.C. Mancini^{*}, Arnauld Sergé^{*} and Michel Aurrand-Lions^{*#}



Supplementary Figure 1: Hematopoietic stress response of *Grasp55^{-/-}* **mice. (A)** Experimental design for HSC exhaustion after 5-fluoro-uracil (5-FU) treatment: *Grasp55*^{fl/-} Vav-cre^{Neg} and *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Pos} mice were injected weekly with 120mg/kg 5-FU and bled one day later over five weeks. Mice were sacrificed at D35 after first injection. **(B)** Hematocrit levels of Grasp55^{fl/-}Vav-cre^{Neg} and Grasp55^{fl/-}Vav-cre^{Pos} mice at indicated time points. (n=3 per group). * p< 0.05, ** p< 0.01, *** p<0.0001. **(C)** Absolute numbers of bone marrow cells isolated from *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Neg} and *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Pos} animals at sacrifice. **(D-F)** Relative frequencies of LSK (D), HSC-MPP1, MPP2, MPP3-4 (E), CMP and GMP (F) found in the bone marrow of from *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Neg} and *Grasp55*^{fl/-}Vav-cre^{Pos}



Supplementary Figure 2: Induced deletion of Grasp55 in adult hematopoietic cells does not result in impaired hematopoiesis. (A) Agarose gel of the PCR-amplified products obtained from white blood cells isolated from Grasp55fl/- Mx1-CreNeg and Grasp55fl/- Mx1-CrePos fifteen days after injection with polyI:C or NaCl. (B-E) Absolute numbers of bone marrow cells (B) and relative frequencies of LSK (C) HSC-MPP1, MPP2, MPP3-4 (D) CMP and GMP (E) found in the bone marrow of from Grasp55fl/- Mx1-CreNeg and Grasp55fl/- Mx1-CrePos one month after Mx1-cre induction with polyI:C. NaCl injected animals and mice lacking Mx1-Cre expression are used as control. No significant difference between experimental groups is observed. Results represent the pool of two independent experiments with n=3 to 5 mice per group.



Supplementary Figure 3: GRASP-55 is dispensable for inflammatory cells recruitment in thioglycollate-induced peritonitis. Absolute number of total cells (left panel) and leukocytes frequencies (right panel) in peritoneal lavage fluids of Grasp55^{-/-} and Grasp55^{+/+} chimeric mice 18 hours after thioglycollate i.p. injection. One representative experiment is shown (from three independent experiments).



Supplementary Figure 4: Competitive bone marrow transplantation

(A) Representative dot plots showing the 1:1 ratio of donor and competitor cells for the indicated experimental group used in Figure 4 (Grasp55-/-, left panel and Grasp55+/+, right panel). (B) Absolute number of bone marrow cells in recipient mice 18 weeks after engraftment with $Grasp55^{+/+}$ and $Grasp55^{-/-}$ donor cells.
ARTICLE 2 : JAM-C intracellular domain interacts with spliceosome and alters transcriptional networks in Acute Myeloid Leukemia initiating cells.

Julien M.P. Grenier, Céline Testut, Florence Bardin, Julien Vernerey, Josée Hébert, Jean-François Spinella, Triantafyllos Chavakis, Stéphane Audebert, Maria De Grandis, Stéphane J.C. Mancini, Marie-Anne Hospital, Cyril Fauriat, Norbert Vey, Jürg Schwaller, Guy Sauvageau and Michel Aurrand-lions.

Cette publication contient la plus grande partie des résultats expérimentaux de mon travail de thèse et décrit le mécanisme moléculaire probable par lequel la protéine JAM-C pourrait jouer un rôle dans l'initiation de la LAM. En effet, nous avons pu mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation passant par le clivage de JAM-C et la libération de son domaine intracellulaire (ICD), capable d'interragir avec le complexe U2 de l'épissage. En accord avec ce résultat, nous avons identifié un profil d'épissage spécifique des CSL exprimant JAM-C par rapport aux autres cellules leucémiques. Cet épissage différenciel nous a permis d'établir un score pronostique de la réponse thérapeutique. Nous pensons que les altérations de l'épissage sont à l'origine des dérégulations transcriptionnelles observées dans le modèle de souris iMLL-AF9 inactivé de façon conditionnelle pour l'expression de Jam-C avant l'initiation de la leucémie. Cet article est en cpours de finalisation pour soumission.

JAM-C intracellular domain interacts with spliceosome and alters transcriptional networks in Acute Myeloid Leukemia initiating cells.

Julien M.P. Grenier¹, Céline Testut¹, Florence Bardin¹, Julien Vernerey¹, Josée Hébert⁴, Jean-François Spinella³, Triantafyllos Chavakis^{7,8}, Stéphane Audebert¹, Maria De Grandis^{5,6}, Stéphane J.C. Mancini⁹, Marie-Anne Hospital¹, Cyril Fauriat¹, Norbert Vey¹, Jürg Schwaller², Guy Sauvageau³ and Michel Aurrand-lions¹.

³ Laboratory of Molecular Genetics of Stem Cells, Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

- ⁴ Leukemia Cell Bank of Quebec, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC, Canada
- ⁵ Aix-Marseille University, CNRS, EFS, ADES, "Biologie des Groupes Sanguins", Marseille, France
- ⁶ Etablissement Français du Sang PACA Corse, Marseille, France.
- ⁷ Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Technische Universität Dresden, 01307 Dresden, Germany
- ⁸ Centre for Cardiovascular Science, Queen's Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edinburgh, EH16 4TJ, UK
- ⁹ UMR 1236, University of Rennes, INSERM, Etablissement Français du Sang Bretagne, Rennes, France.

Summary

Leukemic stem cells (LSC) of Acute Myeloid Leukemia (AML) are characterized by their capacity to self renew and propagate the disease upon transplantation. However, our understanding of the relationships between LSC and pre-leukemic cell of origin is still incomplete. In particular, it is not known whether "niche-anchoring" adhesion molecules expression by LSC plays a role in leukemia initiation. To address this question, we took advantage of an inducible mouse model of *MLL-AF9*-driven leukemia which we crossed with a conditional knock-out strain for the LSC marker Jam-C. We found that Jam-C deletion in leukemic mice resulted in a shift from long-term haematopoietic stem cell (LT-HSC) expansion to short-term HSC expansion. This was accompanied by upregulation of several genes (*Jun, Fos, Junb, Jund*) encoding proteins of the Activation Protein-1 (AP-1) transcription factor which defined a regulon conserved in human and mouse. We further show that the intracellular domain of JAM-C is cleaved and interacts with proteins of the 17S U2 snRNP complex resulting in a specific splicing signature associated to stemness and poor prognosis. Our findings establish a role for splicing and AP-1 regulation by JAM-C in AML.

¹ Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France. Equipe Labellisée Ligue 2020

² Department of Biomedicine, University Children's Hospital (UKBB), University of Basel, 4031 Basel, Switzerland

INTRODUCTION

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a heterogeneous disease that originates from genetic alterations and clonal expansion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSPC)(Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013; Papaemmanuil et al., 2016). The organization of leukemic cells in AML is similar to normal haematopoiesis with Leukemic Stem Cells (LSC) at the apex that are able to reconstitute the clonal heterogeneity, maintain and propagate AML in xenograft experiments (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). LSC possess self-renewal capacity and produce immature progeny that accumulate because genetic alterations result in a block of differentiation which is one of the characteristics of AML (Tenen, 2003). Therefore, the idea that AML cure cannot be achieved without eradication of LSC has emerged at the end of the last century.

Similar to normal Haematopoietic Stem Cells (HSC), the LSCs have been initially found to be enriched within the CD34⁺/CD38⁻ compartment (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). However, LSCs are not restricted to the CD34⁺/CD38⁻ compartment indicating that leukemic transformation may alter the stem cell surface phenotype or that the paucity of LSC within the CD34⁺/CD38⁻ compartment may hamper their isolation (Eppert et al., 2011; Taussig et al., 2008). This led to the search and discovery of several other markers of LSCs such as CD123 (Jordan et al., 2000), CD96 (Hosen et al., 2007), CD93 (Iwasaki et al., 2015) or GPR56 (Pabst et al., 2016). Expression of GPR56 allowed LSC isolation irrespective of CD34 expression and was correlated with expression of DNMT3B, a gene known to be highly expressed in LSC (Mizuno et al., 2001). Recently, we found that JAM-C expression identifies a subset of CD34⁺/CD38⁻ cells in AML with high engraftment capacities and exacerbated Src kinase activity (De Grandis et al., 2017). Although, most of these markers have the capacity to discriminate between LSC and cells devoid of leukemia initiating activity, their function in stemness maintenance during AML initiation has remained poorly studied. This was likely due to the lack of suitable experimental model in which leukemic initiation and loss of function can be combined without the need of adoptive transfer.

Transplantation of cells that express a leukemogenic oncogene upon retroviral infection of HSPC isolated from the bone marrow of wild-type or knock-out mice for the gene of interest

has remained the gold standard for a while (Almosailleakh and Schwaller, 2019). It is only in 2014 that the first transgenic mouse model allowing conditional activation of the MLL-ENL oncogene in normal haematopoietic cells was published (Ugale et al., 2014). Using this model, the authors demonstrated that the MLL-ENL oncogene does not transform normal HSC defined as Lin⁻Sca⁺Kit⁺ (LSK) CD150⁺ CD48⁻ cells but initiate leukemia in more differentiated cells defined as granulocyte-monocyte-lymphoid progenitors (GMLP: LSK CD48⁺ CD150⁻). A second study using a similar doxycycline-inducible model to drive MLL-AF9 oncogene expression was published two years later (Stavropoulou et al., 2016). In this model (iMLL-AF9), leukemic initiation occurred in the most immature HSC compartment but also in the granulocyte-monocyte progenitor (GMP) compartment suggesting that AML disease heterogeneity reflected the nature of the cell of origin. This is consistent with the fact that the leukemia derived from HSC transformation were more aggressive than those derived from GMP and expressed high levels of the bad prognosis markers *Evi1 (Mecom)* and *Erg*. This prompted us to use this mouse model in order to test the function of Jam-C in leukemic initiation.

Jam-C is an adhesion molecule belonging to the immunoglobulin superfamily highly expressed by HSCs and encoded by *Jam3* (Forsberg et al., 2005). Jam-C expression is lost upon HSC mobilization in the periphery and *Jam3*-deficient mice harbour an increase in common myeloid progenitor (CMP) frequencies (Arcangeli et al., 2014; Praetor et al., 2009). Such a function in early haematopoiesis is thought to be due to the contribution of Jam-C/Jam-B interaction to HSC dormancy (Arcangeli et al., 2011; Roch et al., 2017). This raises the question whether Jam-C expression in the cell of origin may contribute to AML disease aggressiveness that would explain the prognosis value of JAM-C expression in AML patients (von Bonin et al., 2018). We thus crossed the haematopoietic conditional knock-out of Jam-C (Mx-1 Cre/*Jam3*^{fl/fl}) with the iMLL-AF9 model (Stavropoulou et al., 2016) and found that *Jam3*deficiency rewire transcriptional program of HSPCs. This is likely due to the loss of Jam-C interaction with the spliceosome as demonstrated by proteomic approach and differential splice analysis (DSA).

RESULTS

Jam3 deletion in hematopoietic cells leads to altered gene expression networks in leukemia initiating cells and their progeny.

We have previously shown that JAM-C, encoded by JAM3, is expressed by human and mouse haematopoietic stem cells (HSC) and by a subset of human leukemic stem cells (LSC) in de novo acute myeloid leukemia (AML) (De Grandis et al., 2017). LSC expressing JAM-C are ten times more efficient in initiating leukemia as compared to LSC lacking JAM-C expression in limit dilution assays. This prompted us to test whether JAM-C plays an active role in leukemic initiation. To this end, we set-up an inducible mouse model of AML in which conditional knockout of Jam3 can be achieved before leukemic onset. This was done by crossing iMLL-AF9 mice with Mx1-Cre Jam3^{fl/fl} mice resulting in iMLL-AF9 Mx1-Cre Jam3^{fl/fl} mice (called iMLL Jam3^{fl/fl} thereafter). Specific deletion of Jam3 in hematopoietic cells was induced upon polyI:C injection and leukemic initiation was driven by MLL-AF9 expression under the control of the reversed tetracycline transactivator (rtTA) induced by doxycycline (Stavropoulou et al., 2016). Leukemia burden was measured by white blood cells count (WBC) and experiments were stopped when a value of 30 000 cells/ μ l was reached. Since this value was not reached at the same time by all leukemic animals (Supplementary Fig. 1A), the time scale was set backward starting from endpoint in order to compare different animals (Figure. 1A). We first checked whether Jam-C expression in hematopoietic cells was lost upon polyI:C treatment of iMLL Jam3^{fl/fl} animals as compared to non-treated leukemic mice or treated animals lacking Mx1-Cre expression. We found efficient deletion of Jam-C in long-term HSC (LT-HSC), short-term HSC (ST-HSC) and multipotent progenitors 3 (MPP3) as measured by flow cytometry (Figure. 1B). Of note, the progressive down-regulation of JAM-C expression between the most immature LT-HSC compartment and most mature MPP3 progenitors was not affected by iMLL-AF9 expression in leukemic mice (Fig 1B, squares) as compared to non-leukemic animals (Fig 1B, circles). Exposition to doxycycline (DOX) led to similar WBC increase in leukemic mice lacking Jam-C expression in hematopoietic cells (iMLL Jam3^{ko/ko}) or not (iMLL Jam3^{fl/fl}) as compared to non-leukemic animals (WT) (Figure 1C). Because WBC is a late hallmark of leukemogenesis, we looked at red blood cells distribution width (RDW) which is known to raise several years before leukemic onset in humans (Abelson et al., 2018). A trend toward increased RDW measurements in iMLL Jam3^{fl/fl} as compared to iMLL Jam3^{ko/ko} mice was observed without reaching significance (Figure. 1D). Collectively, these data demonstrate the suitability of this mouse model to study the function of Jam-C in acute myeloid leukemia initiation.

Previous reports have shown that leukemic initiating cells (LIC) upon MLL-AF9 expression are found both in LT-HSC and GMP compartments (Krivtsov et al., 2006; Somervaille and Cleary, 2006; Stavropoulou et al., 2016). We thus explored early hematopoiesis in iMLL Jam3^{fl/fl} and iMLL Jam3^{ko/ko} mice. We found a twofold reduction in the frequency of LSK cells in leukemic mice as compared to healthy animals irrespective of Jam-C deficiency (Figure. 1E & Supplementary Fig. 1B). Within the LSK compartment, the twofold expansion of the LT-HSC compartment in leukemic mice as compared to healthy animals appeared to be Jam-Cdependent (Figure 1F). In contrast, expansion of the ST-HSC observed in leukemic animals was even further increased in Jam-C-deficient leukemic mice, reaching more than 60% of the LSK compartment (Figure. 1F). This was at the expense of the multipotent progenitors, MPP-2, -3 and -4 (Supplementary Fig. 1C). Similar to LT-HSC, the twofold expansion of the GMP compartment observed in leukemic mice as compared to healthy animals was abolished in Jam-C-deficient leukemic mice (Figure. 1G). These results were confirmed by Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) analysis showing that iMLL-AF9 Jam3^{ko/ko} mice were biased toward myeloid differentiation whereas iMLL-AF9 Jam3^{fl/fl} mice presented a more immature phenotype (Figure. 1H and Supplementary Fig. 1D). This observation was confirmed by pseudo time analysis showing that differentiation is accelerated in iMLL-AF9 Jam3^{ko/ko} mice with a loss of CD34 expressing cells within the most immature compartment (Supplementary Fig. 1E). These results suggest that JAM-C acts as a brake for leukemic expansion in the stem cell compartment at the transition between LT- and ST-HSC.

To test this hypothesis, we performed mRNAseq on HSCs and GMPs isolated from the bone marrow of leukemic Jam-C-proficient and Jam-C-deficient mice. Thirty-nine genes were differentially expressed between iMLL-AF9 Jam3^{fl/fl} HSCs and Jam3^{ko/ko} HSCs (Figure. 2A-B & Table 1). Most of them were upregulated in HSC isolated from Jam-C-deficient leukemic mice, while only six genes including Jam3 were down-regulated. Such a difference in the number of up- and down-regulated genes was likely due to the upregulation of several genes (Jun, Fos, Junb, Jund) encoding proteins of the Activation protein-1 (AP-1) transcription factor which controls expression of target genes such as CD69 or Egr1. This is consistent with the finding

that differentially expressed genes between Jam-C-proficient and -deficient leukemic mice were also present in the GMP compartment even though GMP do not express Jam-C (Figure. 2C-D) (Arcangeli et al., 2011, 2014; Praetor et al., 2009). Taken together, these results indicate that JAM-C controls transcription networks in leukemic initiating cells in the HSC compartment with downstream consequences in more differentiated myeloid progenitors.

Gene expression networks associated to JAM-C expression are conserved in human

Given the results of gene expression obtained in Jam-C-deficient mouse AML model, we questioned whether transcriptional regulons associated to JAM-C expression and/or stemness were also found in human datasets. To this end, we carried out gene expression correlation analysis on three independent AML cohorts (TCGA, Leucegene and OHSU). Genes used for these analysis were selected from the present study, from the list of genes used to calculate the LSC17 stemness score and from list of genes associated to iMLL-AF9 aggressiveness as compared to non-leukemic animals (Ng et al., 2016; Stavropoulou et al., 2016) (Table 2). Two major clusters were identified and named respectively cluster I and cluster II (Figure. 3A & Supplementary Fig. 2). JAM3 was found in cluster I and its expression was correlated to several genes used to calculate the LSC17 stemness core (GPR56, DNMT3B, NYNRIN, MMRN1, ...) irrespective of the dataset. Genes identified to be upregulated in iMLL Jam3^{ko/ko} leukemic mice formed the cluster II which contained most of the genes from the AP-1 regulon (JUN, JUNB, FOS, FOSB, EGR1,....). These data suggest that the spontaneous downregulation of JAM-C protein expression may reflect the transition of leukemic initiating cells from a stemness gene expression program to a more differentiated state. We thus verified that JAM3 expression correlated with GPR56 expression which has been used as LSC marker in order to set a flow cytometry panel combining both markers (Figure 3B& Supplementary Fig. 3A-C). Flow cytometry analysis performed on frozen AML patient samples revealed that frequencies of cells expressing JAM-C or GPR56 were enriched in the CD34⁺ compartment as compared to more mature leukemic cell lacking CD34 expression (Figure. 4A & Supplementary Fig. 3B-C). Since the ranges of frequencies were different for the two markers (up to 0,6% for JAM-C versus up to 70% for GPR56 in the CD34⁺CD38⁻ compartment), we tested if JAM-C-expressing cells represented a small fraction of GPR56-expressing cells which was indeed the case (Figure. **4B)**. These observations were confirmed by UMAP analysis on five patients (Supplementary Fig. 3D), showing that most of the JAM-C⁺ cells are within the GPR56-expressing compartment (Figure. 4C). This was not due to JAM-C expression by platelets stuck on leukemic blasts or isotypic bias, since CD41⁺ cells were removed from the analysis and control isotype antibody was used to control JAM-C expression (Supplementary Fig. 3E). In conclusion, our results strongly suggest that JAM-C signalling contributes to the maintenance of a genetic stemness program in leukemic cell of origin and that loss of JAM-C expression imprints a transcriptional genetic program transmitted to the leukemic cell progeny expressing GPR56.

JAM-C intracellular domain interacts with proteins of the 17S U2 snRNP, a major subunit of the spliceosomal complex.

In order to identify the molecular mechanisms of JAM-C signaling, we used a proteomic approach and peptide pull-down to identify proteins that bind the cytoplasmic tail of JAM-C (called JAM-C^{ICD} thereafter). More than 200 proteins interacting with beads loaded with JAM-C peptide as compared to beads alone were identified (Table 3). As expected from such experimental approach, known interactors of the c-terminal PDZ binding motif of JAM-C such as PARD3, TJP2, GORASP1 or GORASP2 were found. When protein-protein interaction networks were considered using STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Proteins, https://string-db.org/), functional enrichment for interaction networks related to endocytosis and spliceosome were found (Figure. 5A). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using intensities of Label Free Quantification (LFQ) revealed that the endocytic and spliceosome pathways were the top scoring KEGG gene sets (Figure. 5B). Interaction of JAM-C peptide with the top list spliceosome interactor DDX46 (PRP5) was then confirmed by western blotting (Figure. 5C). Since the DEAD-box RNA helicase DDX46 is associated to the 17S U2 snRNP in the nucleus (Hirabayashi et al., 2013; Will et al., 2002; Zhang et al., 2020), this result raised the question on how the cytoplasmic tail of JAM-C can interact with the U2 spliceosome complex. We thus hypothesized that JAM-C may be cleaved to release a functional intracellular domain since JAM-C is a known substrate of ADAM-10 and -17 proteases (Rabquer et al., 2010) and because we previously found that the protease BACE-2 is overexpressed with JAM-C in AML cells (De Grandis et al., 2017). We therefore overexpressed a C-terminus flagged form of human JAM-C (JAM-C^{flag}) with or without BACE-2 (BACE-2^{HA}) in Cos7 cells and analyzed JAM-C protein by western-blot using an antibody directed against the FLAG tag. We found a fragment of 12kDa that was only detected when BACE-2 was co-transfected indicating that JAM-C is a substrate for the protease BACE-2 (Figure. 5D). We then searched for a model cell line in which JAM-C is constitutively cleaved in order to perform biochemical studies. To this end, stable clones expressing JAM-C^{flag} were established in HELA cells and leukemic cell lines TF-1 and K562. A flow-cytometry strategy consisting in extracellular staining of JAM-C followed by intracellular staining of JAM-C using anti-FLAG was used to analyze cleavage at single cell level. Several clones of transfected HELA cells lacked intracellular staining while expression of extracellular and intracellular epitopes was more homogeneous in leukemic cells (**Figure.5E**). This suggested that JAM-C was constitutively processed in HELA cells and that this model was suitable for further study. Sequential immuno-precipitation was then performed in transfected HELA cells using antibody against the extracellular domain of JAM-C in order to deplete the cell lysate from the full-length protein (**Figure. 5F**, **lanes #1 to #5**) before immunoprecipitation with anti-FLAG or isotype control. Immunoblotting with anti-SF3B1 confirmed that JAM-C^{ICD} was co-immunoprecipitated with SF3B1 which is part of the 175 U2 snRNP complex (**Figure. 5F**). Overall, these results point out toward a crosstalk between JAM-C^{ICD} generation and downstream events affecting post-transcriptional RNA processing.

GPR56 and JAM-C identify leukemic stem cells with specific mRNA splicing profiles.

Having found that JAM-C^{ICD} interacts with U2 snRNP complex and that JAM-C is co-expressed with GPR56 by a subset of LSC, we tested if specific splicing profiles can be identified for patients belonging to the GPR56^{High}/JAM-C^{High} quartile (upper quartile) as compared to the GPR56^{Low}/JAM-C^{Low} quartile (lower quartile). To this end, differential splice analysis using rMATS (Shen et al., 2014) was conducted on mRNA sequencing datasets from the Leucegene cohort (Lemieux et al., 2017). Global analysis did not reveal specific bias between the two groups for differential use of alternative 3' (A3SS), alternative 5' (A5SS), mutually exclusive exon (MXE), intron retention (RI) or exon skipping (SE) (Figure. 6A). Nevertheless, 747 significant differential alternative splicing events were found in 428 distinct genes (Table 4). Next, we evaluated if these differential splicing events affected expression of spliced transcripts. We found that most of the alternatively spliced transcripts were differentially expressed between lower and upper quartile (Supplementary Fig. 4). We therefore selected the genes among those used to calculate the LSC17 stemness core and those differentially spliced in order to extract genes that best explained patient outcome in the Leucegene training cohort (Figure. 6B). To this end we used the ELASTIC-NET algorithm to select a minimal subset of nine genes (JAM3, ADGRG1, DNMT3B, MMRN1, PLD3, PYM1, TBL1X, UNKL, WSB1) which were weighted by Cox regression coefficients to correlate with overall survival in the training cohort (**Figure. 6C**). This score was called SPL9 and patients were stratified in "high" and "low" groups depending on SPL9 score above or below median value. The SPL9 score remained significantly associated to overall survival in the TCGA validation cohort (**Figure. 6D**). Since obtaining complete remission (CR) is one of the primary endpoint to predict disease outcome and cure, we tested the ability of the SPL9 score to predict response to treatment. To this end, we quantified gene expression in samples from the HEMATO-BIO cohort (Clinical Trial #NCT 02320656) using nCounter Nanostring technology. The SPL9 score was a better predictor of response to treatment as compared to LSC17 score when calculated from Nanostring quantification of gene expression at diagnosis (Geiss et al., 2008) (**Figure. 7**). These results indicate that measuring gene expression of differentially spliced genes at diagnosis may help for clinical decision making, irrespective of genetic alterations.

DISCUSSION

Here we identified a molecular mechanism linking cell adhesion to splicing regulation which may have important implications for development of new therapeutic strategies aiming at LSC eradication.

From our mouse model study, we found that Jam3 deficiency results in transcriptional network alterations that propagate to LSC progeny. Such a result is consistent with the known physiological function of JAM-C as a niche anchoring molecule that contribute to maintenance of HSC quiescence (Roch et al., 2017; Zhang et al., 2018). Jam3 deletion before induction of MLL-AF9 expression results in upregulation of AP-1 transcription factor in leukemic HCS and GMP, although the latter do not express JAM-C (Arcangeli et al., 2011, 2014; Forsberg et al., 2005; Praetor et al., 2009). Therefore, it is likely that dysregulated transcriptional activity of AP-1 and downstream targets such as Egr1 in HSCs promotes myeloid differentiation and skewing in Jam3-deficient leukemic mice (Heinz et al., 2010; Krishnaraju et al., 2001). This would be consistent with the almost complete loss of MPP2 and MPP4 compartments which are respectively biased toward Megakaryocyte/ Erythrocyte and Lymphoid lineages in Jam3deficient leukemic mice (Pietras et al., 2015). These phenotypic changes are accompanied by accumulation of leukemic cells at the ST-HSC differentiation stage in iMLL Jam3^{ko/ko} leukemic mice instead of accumulation at LT-HSC and GMP stages as reported in the iMLL-AF9 Jam3proficient strain and confirmed in the present study (Stavropoulou et al., 2016). Leukemic initiation in the LT-HSC compartment of iMLL-AF9 as compared to leukemia of GMP origin is associated with expression of Evi1 (Mecom), Egr and the EMT-related gene Zeb1. We did not find differences in Evi1, Egr or Zeb1 gene expression when we compared iMLL Jam3-deficient and Jam3-proficient HSC gene expression indicating that the differentiation stage of the cell of origin controlled by JAM-C (i.e. LT-HSC versus ST-HSC) is independent of EMT gene expression. Nonetheless, when gene expression correlation analysis was performed using human datasets (Figure. 3 and Supplementary Fig. 2), ZEB1 expression correlated with the LSC signature of the cluster I containing JAM3 and GPR56 in two out of three cohorts. This likely reflects the higher expression of Zeb1 by non-transformed HSC as compared to multipotent progenitors (<u>https://www.immgen.org</u>) or indicates that leukemic transformation of dormant HSC requires Zeb1 upregulation for acquisition of novel adhesive properties. Indeed, LSC present a pro-adhesive phenotype as illustrated by specific expression of adhesion molecules

such as CD93 (Iwasaki et al., 2015), CD98 (Bajaj et al., 2016; Reinisch and Majeti, 2016), CD44 (Jin et al., 2006), CD96 (Hosen et al., 2007), $\alpha_4\beta_1$ Integrin (Matsunaga et al., 2003), GPR56 (Pabst et al., 2016) or JAM-C (von Bonin et al., 2018; De Grandis et al., 2017; Villatoro et al., 2020). It is therefore possible that the first step of leukemogenesis requires acquisition of promigratory properties before cells can reprogram transcriptional network. This will fit with our finding that *Jam3*-deletion up-regulates AP-1 transcription factor which has been identified as a conserved hallmark of leukemic blasts across genetically distinct types of AML (Assi et al., 2019). Even more remarkably, almost all *Jam3*-dependent up-regulated genes that we have identified (*FOS, JUN, FOSB, JUNB, JUND, BTG2, DUSP1, CD69, PTGS2, PPP1R15A, NFKBIZ, ZFP36*) are up-regulated in CD34⁺ blasts as compared to healthy HSPCs at the single cell level (Velten et al., 2021). This may indicate that down-regulation of JAM-C is necessary for up-regulation of AP-1 in pre-leukemic cells at the transition between normal HSPC and CD34⁺ blasts.

Several proteases including neutrophil elastase (Colom et al., 2015), ADAM10 and ADAM17 (Rabquer et al., 2010) have been involved in JAM-C extracellular domain shedding. However, none of these studies have addressed the question whether the protease activity may result in the production of an intracellular domain (ICD) endowed with biological function. In the present study, we have found that JAM-C^{ICD} interacts with proteins involved in RNA processing and in protein trafficking. This last result is consistent with a previous study showing that the function of JAM-C in endothelial cells relies on its coordinated trafficking between the cell surface and multivesicular bodies as demonstrated by the identification of VPS37 and kinesins using proximity labelling and proteomic (Kostelnik et al., 2019). The identification of the same proteins here validates our biochemical approach and highlights the power of this method to identify new unexpected signalling pathways. Indeed, the identification of snRNP U2 protein complex in JAM-C^{ICD} peptide pull-down is surprising but consistent with our current knowledge of pathway alterations in healthy individuals that are at risk for AML development years later. Indeed, two recent studies have shown that somatic mutations allow to identify premalignant AML state years before development of overt disease (Abelson et al., 2018; Desai et al., 2018). Among mutated genes in pre-AML cases are those that are also present in ARCH (Age Related Clonal Hematopoieisis) such as DNMT3A or TET2 and others such as IDH1/IDH2, TP53 or spliceosome genes. This indicates that alterations in pathways involving such genes may be required to progress from clonal hematopoiesis to overt disease. Our results suggest that

modulation of alternative splicing may occur through JAM-C^{ICD} interaction with the 17S U2 snRNP complex. Whether such an interaction mimics splicing alterations of pre-AML cells mutated in SRSF2, U2AF1 or SF3B1 remains to be addressed, but DSA between quartiles of samples enriched or not in JAM3 expressing cells already indicates that several genes isoforms are specifically found in one or the other quartile. Among them are specific isoforms of FYN which may explain our previous observation of over-activation of Src family kinases in JAM-C expressing cells (De Grandis et al., 2017) since alternative inclusion of exon 7A or 7B is known to affect autoinhibition and SH3 accessibility of the Src kinase Fyn (Brignatz et al., 2009). Another interesting observation drawn from our DSA analysis is the fact that most of the genes that are differentially spliced are also differentially expressed. This may be due to differential nonsense mediated decay (NMD) of RNA isoforms in LSC expressing JAM-C and more differentiated blasts since there is growing body of evidences that NMD plays a role in disease progression from myelodysplastic syndromes to AML (Maciejewski and Padgett, 2012; Pellagatti et al., 2018). Along this line, it is interesting to note that Jam3 is one of the most regulated gene in the mouse model of *Srsf2*^{P95H} mutation suggesting that *Jam3* transcript may be the target of feedback mechanisms regulating alternative splicing (Lee et al., 2016).

Altogether, our results show that *Jam3* acts as a gate keeper of leukemic progenitor cell differentiation and that deletion of *Jam3* in a mouse model of AML results in a shift of the transient amplification compartment from LT-HSC to ST-HSC. This is due to alterations in the splicing activity in LSC resulting in dysregulated transcriptional networks involving AP-1. This paves the way for new therapeutic avenues combining eradication of LSC expressing JAM-C and inhibition of downstream signals using available small molecules Inhibitors targeting Activator Protein 1 (AP-1) (Mognol et al., 2019; Ye et al., 2014).

METHODS

Human samples:

All biological samples were collected with informed consent according to the procedure approved by our institutional review board at Institut Paoli Calmettes (IPC). Vials were thawed in hot bath water and incubated 10min in 15mL of pre-heated RPMI 30% FCS + 1% Pen/strep + 100U/mL DNase and 10U/mL of heparin and centrifugated 10min at 1600 RPM. Cell pellets were washed with pre-heated RPMI 10% FCS + 1% Pen/strep + 100U/mL DNase and 10U/mL of heparin at 1600 RPM. Dead cells were removed by layering 1ml of cell suspension onto 2ml of FicoII and centrifugated 10min at 2000 RPM without brake. After centrifugation the ring containing living cells was recovered into RPMI 10% FCS + 1% Pen/strep. Living cells were then washed to remove excess FicoII and resuspended with 1mL of RPMI 10% FCS + 1% Pen/strep and numerated by trypan blue.

Mice experiments:

iMLL-AF9 mice were obtained from J.Schwaller lab (Basel) and bred in a pathogen free environment. IMLL *Jam3*^{fl/fl} mice were generated by crossing Mx1-Cre *Jam3*^{fl/fl} mice with iMLL-AF9 mice backcrossed for more than six generations on C57BL/6J background. All experiments were performed in compliance with the laws and protocols approved by animal ethics committees. Doxycycline (400µg/mL) (Sigma) was provided in water supplemented with 5% sucrose. *Jam3* gene deletion in IMLL *Jam3*^{fl/fl} mice was induced by three injections of 200µg poly (I:C) (InvivoGen) on Day 0, Day2, and Day4. Leukemic burden was monitored each week by following white blood cell count (WBC) using IDEXX ProCyte Dx Hematology Analyzer (IDEXX Laboratories) 4 weeks after Doxycycline induction. Mice were sacrificed when WBC was above 30 k/µL.

Cell culture:

HELA and Cos-7 cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin. KG-1 cells were cultured in IMDM supplemented with 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin. Stable transfected TF1 and K562 were cultured with RPMI supplemented with 10% FCS, 1% penicillin-streptomycin, 0.05mM 2-mercapto-ethanol, 1% non-essential amino acids and 1mg/mL of geneticin (all the cell culture products were supplied

by LifeTechnologies). GM-CSF (5ng/ml) (Peprotech) was added to the culture medium of TF1 JAM-C⁺ cells. TF1 and K562 transfected cell lines were amplified from one single JAM-C expressing cells sorted by flow cytometry in a 96-wells plate.

Cytometry and Cell sorting:

For flow cytometry experiments, single cell suspensions were incubated with antibodies (listed in the key resource table) in FACS buffer for 30min at 4°C. Dead cells were excluded using a fixable viability dye eFluor[™] 506 (ThermoFisher). To analyze human leukemic populations, the single cell suspension obtained from patient samples was stained with the following markers: CD33, CD45, CD38, CD34, CD41, GPR56 and JAM-C. To analyze hematopoietic stem and progenitor cells, BM cells from mice were recovered from two legs (femur and tibia), and red blood cells were lysed using 1X RBC lysing buffer (eBioscience). First, cells were stained with a lineage cocktail (Lin) that contains the following biotinylated antibodies: CD4, CD8, CD3, CD19, CD11c, DX5, Ter119, CD11b, B220 and Gr1. Hematopoietic subsets were defined as: LT-HSC: Lin⁻, Sca-1⁺, CD117⁺, CD135⁻, CD150⁺, CD48⁻; ST-HSC: Lin⁻, Sca-1⁺, CD117⁺, CD135⁻, CD150⁻, CD48⁻ ; MPP2 : Lin⁻, Sca-1⁺, CD117⁺, CD135⁻, CD150⁺, CD48⁺ ; MPP3 : Lin⁻, Sca-1⁺, CD117⁺, CD135⁻, CD150⁻, CD48⁺ ; MPP4 : Lin⁻, Sca-1⁺, CD117⁺, CD135⁺, CD150⁻, CD48⁺; GMP : Lin⁻, Sca-1⁻, CD117⁺, CD34⁺, CD16/32⁺; CMP : Lin⁻, Sca-1⁻, CD117⁺, CD34⁺, CD16/32⁻; MEP : Lin⁻, Sca-1⁻, CD117⁺, CD34⁻, CD16/32⁻. JAM-C staining was done using a polyclonal rabbit anti mouse JAM-C (homemade) and an AF647-conjugated Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Laboratories) were used as secondary antibodies.

To study the cleavage dynamics of JAM-C, cell surface staining of JAM-C was performed either on TF1-JAM-C^{flag}, K562⁻JAM-C^{flag} or HELA JAM-C^{flag} or wild-type cells with anti-JAM-C APC in FACS buffer for 20min at 4°C. Intracellular staining was performed after two steps of fixation and permeabilization. First, cells were incubated 20min with the cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences) followed by incubation 10mn with in TBS (Tris Buffered Saline) plus Triton 0,1%. Cells were then incubated another 5min with cytofix/cytoperm solution, washed twice in perm-wash buffer (BD Biosciences) and stained with the anti-flag FITC for 1h in perm-wash buffer at 4°C. FACS analysis was performed on a FACS LSRII (BD Biosciences) and cell sorting on a FACSAria III (BD Biosciences). Data were analyzed using DIVA V.8.01 (BD Biosciences) or OMIQ (Omiq Inc).

RNA sequencing:

HSCs and GMP were directly sorted in RLT buffer from mRNA purification kit using the RNeasy micro kit (QIAGEN). Samples were sent to the GenomEast platform (<u>http://genomeast.igbmc.fr/</u> Illkirch, France) for sequencing. mRNA quality was evaluated using an Agilent 2100 bioanalyzer (Pico chip) and libraries were prepared using the Nextera kit (Illumina) according to the manufacturer recommendations. Each library was paired-end sequenced (2 x 100bp) on a Hiseq4000 system (Illumina).

DSA analysis of samples from the Leucegene cohort (GSE67039) was conducted as follow. Samples were splited in quartiles based on the correlative gene expression of JAM-C and GPR56. Differential splicing analysis (DSA) was conducted between the lowest or the highest expression quartiles using rMATS algorithm (<u>http://rnaseq-mats.sourceforge.net/</u>).

Nanostring assay.

Total mRNA from patient samples was extracted using the RNeasy mini kit (QIAGEN) according to manufacturer recommendations. mRNA quantity and quality were evaluated using Nanodrop (ThermoFisher) and Agilent 2100 bioanalyzer (Pico chip). The custom CodeSet was designed in collaboration with Nanostring Technologies (the probes and the sequences are given in the supplemental material). Among the 87 probes that compose the CodeSet, 18 probes are housekeeping genes, 17 probes belong to the LCS17 (Ng et al, 2016). The remaining 52 probes were designed according to this study. For each hybridization reaction, 100ng (5 μ L) of mRNA sample were incubated with 3 μ L of reporter CodeSet, 5 μ L of hybridization buffer and 2 μ L of capture CodeSet at 65°C for 16 hours. Once hybridized, the samples were processed by the nCounter Prep Station resulting in the immobilization of the target/probes complex on the Nanostring cartridge. Thereafter, transcripts were counted using the nCounter Digital Analyzer. Normalization and quality controls were performed using the nSolver software (Version 4.0).

Expression vectors encoding for BACE-2^{HA} and JAM-C^{flag}

The cDNAs encoding for JAM-C and BACE-2 were obtained from plasmids encoding for the fulllength sequence of human JAM-C and human BACE-2. The flag and the HA tag were fused to the cDNA of JAM-C and BACE-2 respectively with a two-step PCR. Both cDNA were flanked with attB sequence (Gateway technology) and cloned into a pDONR221 using a BP clonase reaction (ThermoFisher). The resulting entry clones were cloned into a pCDNA3 GW pDEST by LR clonase (ThermoFisher) according to maufacturer's recommendations. Integrity of expression constructs was verified by sequencing the cDNA on both strands (Eurofins).

Transfection protocols:

Hela and Cos-7 cells were transfected either with hJAM-C^{flag}, or co-transfected with hJAM-C^{flag} and hBACE-2^{HA} using FuGENE HD transfection reagent (Promega) according to the manufacturer's protocol.

K562 and TF-1 cells were transfected with hJAM-C^{flag} by electroporation according to the Gene Pulser Electroprotocols. Cells were transferred into 800μ L of PBS at a concentration of $5x10^{6}$.mL⁻¹ and 5μ g of plasmid (100ng. μ L⁻¹ in TE buffer (10 mM Tris, 1 mM TEDTA, pH8.0)) was added to cell suspension. After 10min of incubation electroporation was performed in a 0.4cm Gap cuvette at 0.3kV with a field Strength of 0.75kV/cm and a constant time of 5 to 10msec using the Gene Pulser[®] apparatus. After transfection, cells were cultivated in the appropriate medium containing Geneticin (1mg.mL⁻¹).

Peptide pull down assay:

Streptavidin sepharose high-performance beads (GE Healthcare) were coupled with either with the biotinylated peptide corresponding to the carboxy-terminal sequences of JAM-C (Biotin-NYIRTSEEGDFRHKSSFVI) (Covalab) or with biotin. KG-1 cells were lysed with HNTG buffer (50mM HEPES pH 7, 150mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X100, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA and protease inhibitors) for 1h at 4°C with gentle shacking. The lysate was precleared with 100µL of non-coupled beads for 2h at 4°C, then 2 mg of proteins were added to 20µL of coupled beads and incubated for 2h at 4°C with gentle shacking. Thereafter, beads were washed 3 times with lysis buffer, boiled in 20µL of Laemmli buffer and proteins were analyzed by mass spectrometry or immunoblotting. To visualize proteins by silver staining, 10% of the denatured protein extracts were loaded in a 4–12% Bis-Tris gradient pre-cast NuPAGE gel and run with MOPS buffer according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

Mass spectrometry analysis:

Peptides pulldown extracts were loaded on NuPAGE 4-12% Bis-Tris acrylamide gels (Life Technologies) to stack proteins in a single band that was stained with Imperial Blue (Thermo Fisher Scientific) and cut from the gel. Gels pieces were submitted to an in-gel trypsin digestion after cysteines reduction and alkylation (Shevchenko et al., 1996¹). Peptides were extracted from the gel and dried under vacuum. Samples were reconstituted with 0.1% trifluoroacetic acid in 4% acetonitrile and analyzed by liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (MS/MS) using an Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Germany) both online with a nanoRSLC Ultimate 3000 chromatography system (Dionex, Sunnyvale, CA). Peptides were separated on a Thermo Scientific Acclaim PepMap RSLC C18 column (2µm, 100A, 75 µm x 50 cm). For peptide ionization in the EASY-Spray nanosource in front of the Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer, spray voltage was set at 2.2 kV and the capillary temperature at 275 °C. The Orbitrap Lumos was used in data dependent mode to switch consistently between MS and MS/MS. Time between Masters Scans was set to 3 seconds. MS spectra were acquired with the Orbitrap in the range of m/z 400-1600 at a FWHM resolution of 120 000 measured at 400 m/z. AGC target was set at 4.0e5 with a 50 ms Maximum Injection Time. For internal mass calibration the 445.120025 ions were used as lock mass. The more abundant precursor ions were selected and collisioninduced dissociation fragmentation was performed in the ion trap to have maximum sensitivity and yield a maximum amount of MS/MS data. Number of precursor ions was automatically defined along run in 3s windows using the "Inject Ions for All Available parallelizable time option" with a maximum injection time of 300 ms. The signal threshold for an MS/MS event was set to 5000 counts. Charge state screening was enabled to exclude precursors with 0 and 1 charge states. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1 and duration of 60 s.

Data Processing Protocol:

Relative intensity-based label-free quantification (LFQ) was processed using the MaxLFQ algorithm from the freely available MaxQuant computational proteomics platform, version 1.6.3.4. The acquired raw LC Orbitrap MS data were first processed using the integrated Andromeda search engine. . Spectra were searched against the Human database extracted

from UniProt on the 1th of September 2020 and containing 20375 entries (reviewed). This database was supplemented with a set of 245 frequently observed contaminants. The following parameters were used for searches: (i) trypsin allowing cleavage before proline; (ii) two missed cleavages were allowed; (ii) monoisotopic precursor tolerance of 20 ppm in the first search used for recalibration, followed by 4.5 ppm for the main search and 0.5 Da for fragment ions from MS/MS; (iii) cysteine carbamidomethylation (+57.02146) as a fixed modification and methionine oxidation (+15.99491) and N-terminal acetylation (+42.0106) as variable modifications; (iv) a maximum of five modifications per peptide allowed; and (v) minimum peptide length was 7 amino acids and a maximum mass of 4,600 Da. The match between runs option was enabled to transfer identifications across different LC-MS/MS replicates based on their masses and retention time within a match time window of 0.7 min and using an alignment time window of 20min. The quantification was performed using a minimum ratio count of 1 (unique+razor) and the second peptide option to allow identification of two co-fragmented co-eluting peptides with similar masses. The false discovery rate (FDR) at the peptide and protein levels were set to 1% and determined by searching a reverse database. For protein grouping, all proteins that cannot be distinguished based on their identified peptides were assembled into a single entry according to the MaxQuant rules. The statistical analysis was done with Perseus program (version 1.6.1.14) from the MaxQuant environment (www.maxquant.org). The LFQ normalised intensities were uploaded from the proteinGroups.txt file. First, proteins marked as contaminant, reverse hits, and "only identified by site" were discarded. Protein LFQ normalized intensities were base 2 logarithmized to obtain a normal distribution. Quantifiable proteins were defined as those detected in at least 70% of the samples in one or more condition. Missing values were replaced using data imputation by randomly selecting from a normal distribution centred on the lower edge of the intensity values that simulates signals of low abundant proteins using default parameters (a downshift of 1.8 standard deviation and a width of 0.3 of the original distribution).

Western Blot:

Cells were lysed with HNTG buffer (50mM HEPES pH 7, 150mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X100, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA and protease inhibitors) for 1h at 4°C with gentle shacking. Cell lysates were centrifuged at 21.000g during 15 min and transferred into precooled

Eppendorf tubes. Protein concentration was measured using bicinchoninic acid (BCA) kit (Pierce). Equal amount of proteins (30µg) were separated by a 12% SDS-PAGE gel and transferred onto a PVDF membrane (Millipore). The membranes were saturated with PBS containing 5% of nonfat dry milk during 1h at room temperature. Saturated membranes were incubated overnight at 4°C with either a mouse anti-flag (1:500 M2 clone Merck) or a mouse anti-HA (1:2000, 16B12 clone Biolegend) in PBS 5% nonfat milk. After 3 washes in PBS 0.05% Tween, the membranes were incubated for 1h at room temperature with a horse radish peroxidase sheep anti-Mouse IgG, secondary antibody (1:15000, Sigma).

Co-immunoprecipitation and immunoblotting:

For co-immunoprecipitation of JAM-C ICD, transfected HELA cells were lysed with HNTG buffer (50mM HEPES pH 7, 150mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X100, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA and protease inhibitors) for 1h at 4°C with gentle shacking. Protein G beads were coupled with a rabbit anti-human JAM-C (pAb 720) overnight at 4°C with gentle shacking. The extracellular domain of JAM-C was depleted by 5 sequential immunoprecipitations (3h each at 4°C) using the anti-hJAM-C coupled beads on the pre-cleared lysates. After the depletion, cell lysate was incubated with anti-flag M2 Affinity Gel (Merck) or protein G beads coupled with mouse IgG1 control isotype (MOPC-21). Denatured proteins were separated by a 16% gel and transferred onto a PVDF membrane (Millipore). Membranes were blocked with PBS containing 5% of nonfat dry milk during 1h at room temperature and incubated overnight at 4°C with mouse anti-flag antibody (1:500 M2 clone Merck) in PBS 5% nonfat milk. After 3 washes in PBS 0.05% Tween, membranes were incubated for 1h at room temperature with peroxidase AffiniPure goat anti-Mouse IgG, light chain specific secondary antibody (1:10000, Jackson Laboratories).

Statistical analysis:

Statistical analysis was performed using GraphPad 6 software and error bars represent the mean ±SEM. Normality was assayed using D'Agostino & Pearson omnibus normality test and sample were compared with a Mann-Whitney test when normality was not reached. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

REFERENCES

Abelson, S., Collord, G., Ng, S.W.K., Weissbrod, O., Mendelson Cohen, N., Niemeyer, E., Barda, N., Zuzarte, P.C., Heisler, L., Sundaravadanam, Y., et al. (2018). Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals. Nature *559*, 400–404.

Almosailleakh, M., and Schwaller, J. (2019). Murine Models of Acute Myeloid Leukaemia. Int. J. Mol. Sci. 20, E453.

Arcangeli, M.-L., Frontera, V., Bardin, F., Obrados, E., Adams, S., Chabannon, C., Schiff, C., Mancini, S.J.C., Adams, R.H., and Aurrand-Lions, M. (2011). JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. Blood *118*, 4609–4619.

Arcangeli, M.-L., Bardin, F., Frontera, V., Bidaut, G., Obrados, E., Adams, R.H., Chabannon, C., and Aurrand-Lions, M. (2014). Function of Jam-B/Jam-C interaction in homing and mobilization of human and mouse hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cells Dayt. Ohio *32*, 1043–1054.

Assi, S.A., Imperato, M.R., Coleman, D.J.L., Pickin, A., Potluri, S., Ptasinska, A., Chin, P.S., Blair, H., Cauchy, P., James, S.R., et al. (2019). Subtype-specific regulatory network rewiring in acute myeloid leukemia. Nat. Genet. *51*, 151–162.

Bajaj, J., Konuma, T., Lytle, N.K., Kwon, H.Y., Ablack, J.N., Cantor, J.M., Rizzieri, D., Chuah, C., Oehler, V.G., Broome, E.H., et al. (2016). CD98-Mediated Adhesive Signaling Enables the Establishment and Propagation of Acute Myelogenous Leukemia. Cancer Cell *30*, 792–805.

von Bonin, M., Moll, K., Kramer, M., Oelschlägel, U., Wermke, M., Röllig, C., Thiede, C., Ehninger, G., Krämer, A., Müller-Tidow, C., et al. (2018). JAM-C Expression as a Biomarker to Predict Outcome of Patients with Acute Myeloid Leukemia-Letter. Cancer Res. *78*, 6339–6341.

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.

Brignatz, C., Paronetto, M.P., Opi, S., Cappellari, M., Audebert, S., Feuillet, V., Bismuth, G., Roche, S., Arold, S.T., Sette, C., et al. (2009). Alternative splicing modulates autoinhibition and SH3 accessibility in the Src kinase Fyn. Mol. Cell. Biol. *29*, 6438–6448.

Cancer Genome Atlas Research Network, Ley, T.J., Miller, C., Ding, L., Raphael, B.J., Mungall, A.J., Robertson, A.G., Hoadley, K., Triche, T.J., Laird, P.W., et al. (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. *368*, 2059–2074.

Colom, B., Bodkin, J.V., Beyrau, M., Woodfin, A., Ody, C., Rourke, C., Chavakis, T., Brohi, K., Imhof, B.A., and Nourshargh, S. (2015). Leukotriene B4-Neutrophil Elastase Axis Drives Neutrophil Reverse Transendothelial Cell Migration In Vivo. Immunity *42*, 1075–1086.

De Grandis, M., Bardin, F., Fauriat, C., Zemmour, C., El-Kaoutari, A., Sergé, A., Granjeaud, S., Pouyet, L., Montersino, C., Chretien, A.-S., et al. (2017). JAM-C Identifies Src Family Kinase-Activated Leukemia-Initiating Cells and Predicts Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. Cancer Res. 77, 6627–6640.

Desai, P., Mencia-Trinchant, N., Savenkov, O., Simon, M.S., Cheang, G., Lee, S., Samuel, M., Ritchie, E.K., Guzman, M.L., Ballman, K.V., et al. (2018). Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. Nat. Med. *24*, 1015–1023.

Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E.R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K.H., Poeppl, A., Ling, V., Beyene, J., et al. (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. Nat. Med. *17*, 1086–1093.

Forsberg, E.C., Prohaska, S.S., Katzman, S., Heffner, G.C., Stuart, J.M., and Weissman, I.L. (2005). Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. PLoS Genet. 1, e28.

Geiss, G.K., Bumgarner, R.E., Birditt, B., Dahl, T., Dowidar, N., Dunaway, D.L., Fell, H.P., Ferree, S., George, R.D., Grogan, T., et al. (2008). Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. Nat. Biotechnol. *26*, 317–325.

Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C.K. (2010). Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cisregulatory elements required for macrophage and B cell identities. Mol. Cell *38*, 576–589.

Hirabayashi, R., Hozumi, S., Higashijima, S.-I., and Kikuchi, Y. (2013). Ddx46 is required for multilineage differentiation of hematopoietic stem cells in zebrafish. Stem Cells Dev. *22*, 2532–2542.

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.

Iwasaki, M., Liedtke, M., Gentles, A.J., and Cleary, M.L. (2015). CD93 Marks a Non-Quiescent Human Leukemia Stem Cell Population and Is Required for Development of MLL-Rearranged Acute Myeloid Leukemia. Cell Stem Cell *17*, 412–421.

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.

Jordan, C.T., Upchurch, D., Szilvassy, S.J., Guzman, M.L., Howard, D.S., Pettigrew, A.L., Meyerrose, T., Rossi, R., Grimes, B., Rizzieri, D.A., et al. (2000). The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. Leukemia *14*, 1777–1784.

Kostelnik, K.B., Barker, A., Schultz, C., Mitchell, T.P., Rajeeve, V., White, I.J., Aurrand-Lions, M., Nourshargh, S., Cutillas, P., and Nightingale, T.D. (2019). Dynamic trafficking and turnover of JAM-C is essential for endothelial cell migration. PLoS Biol. *17*, e3000554.

Krishnaraju, K., Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2001). Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. Blood *97*, 1298–1305.

Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., et al. (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. Nature *442*, 818–822.

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.

Lee, S.C.-W., Dvinge, H., Kim, E., Cho, H., Micol, J.-B., Chung, Y.R., Durham, B.H., Yoshimi, A., Kim, Y.J., Thomas, M., et al. (2016). Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. Nat. Med. *22*, 672–678.

Lemieux, S., Sargeant, T., Laperrière, D., Ismail, H., Boucher, G., Rozendaal, M., Lavallée, V.-P., Ashton-Beaucage, D., Wilhelm, B., Hébert, J., et al. (2017). MiSTIC, an integrated platform for the analysis of heterogeneity in large tumour transcriptome datasets. Nucleic Acids Res. *45*, e122.

Maciejewski, J.P., and Padgett, R.A. (2012). Defects in spliceosomal machinery: a new pathway of leukaemogenesis. Br. J. Haematol. *158*, 165–173.

Matsunaga, T., Takemoto, N., Sato, T., Takimoto, R., Tanaka, I., Fujimi, A., Akiyama, T., Kuroda, H., Kawano, Y., Kobune, M., et al. (2003). Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. Nat. Med. *9*, 1158–1165.

Mizuno, S., Chijiwa, T., Okamura, T., Akashi, K., Fukumaki, Y., Niho, Y., and Sasaki, H. (2001). Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. Blood *97*, 1172–1179.

Mognol, G.P., González-Avalos, E., Ghosh, S., Spreafico, R., Gudlur, A., Rao, A., Damoiseaux, R., and Hogan, P.G. (2019). Targeting the NFAT:AP-1 transcriptional complex on DNA with a small-molecule inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *116*, 9959–9968.

Ng, S.W.K., Mitchell, A., Kennedy, J.A., Chen, W.C., McLeod, J., Ibrahimova, N., Arruda, A., Popescu, A., Gupta, V., Schimmer, A.D., et al. (2016). A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. Nature *540*, 433–437.

Pabst, C., Bergeron, A., Lavallée, V.-P., Yeh, J., Gendron, P., Norddahl, G.L., Krosl, J., Boivin, I., Deneault, E., Simard, J., et al. (2016). GPR56 identifies primary human acute myeloid leukemia cells with high repopulating potential in vivo. Blood *127*, 2018–2027.

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Roberts, N.D., Potter, N.E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., et al. (2016). Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N. Engl. J. Med. *374*, 2209–2221.

Pellagatti, A., Armstrong, R.N., Steeples, V., Sharma, E., Repapi, E., Singh, S., Sanchi, A., Radujkovic, A., Horn, P., Dolatshad, H., et al. (2018). Impact of spliceosome mutations on RNA splicing in myelodysplasia: dysregulated genes/pathways and clinical associations. Blood *132*, 1225–1240.

Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., and Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. Cell Stem Cell *17*, 35–46.

Praetor, A., McBride, J.M., Chiu, H., Rangell, L., Cabote, L., Lee, W.P., Cupp, J., Danilenko, D.M., and Fong, S. (2009). Genetic deletion of JAM-C reveals a role in myeloid progenitor generation. Blood *113*, 1919–1928.

Rabquer, B.J., Amin, M.A., Teegala, N., Shaheen, M.K., Tsou, P.-S., Ruth, J.H., Lesch, C.A., Imhof, B.A., and Koch, A.E. (2010). Junctional adhesion molecule-C is a soluble mediator of angiogenesis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 1777–1785.

Reinisch, A., and Majeti, R. (2016). Sticking It to the Niche: CD98 Mediates Critical Adhesive Signals in AML. Cancer Cell *30*, 662–664.

Roch, A., Giger, S., Girotra, M., Campos, V., Vannini, N., Naveiras, O., Gobaa, S., and Lutolf, M.P. (2017). Single-cell analyses identify bioengineered niches for enhanced maintenance of hematopoietic stem cells. Nat. Commun. *8*, 221.

Shen, S., Park, J.W., Lu, Z., Lin, L., Henry, M.D., Wu, Y.N., Zhou, Q., and Xing, Y. (2014). rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, E5593-5601.

Somervaille, T.C.P., and Cleary, M.L. (2006). Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. Cancer Cell *10*, 257–268.

Stavropoulou, V., Kaspar, S., Brault, L., Sanders, M.A., Juge, S., Morettini, S., Tzankov, A., Iacovino, M., Lau, I.-J., Milne, T.A., et al. (2016). MLL-AF9 Expression in Hematopoietic Stem Cells Drives a Highly Invasive AML Expressing EMT-Related Genes Linked to Poor Outcome. Cancer Cell *30*, 43–58.

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.

Tenen, D.G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. Nat. Rev. Cancer *3*, 89–101.

Ugale, A., Norddahl, G.L., Wahlestedt, M., Säwén, P., Jaako, P., Pronk, C.J., Soneji, S., Cammenga, J., and Bryder, D. (2014). Hematopoietic stem cells are intrinsically protected against MLL-ENL-mediated transformation. Cell Rep. *9*, 1246–1255.

Velten, L., Story, B.A., Hernández-Malmierca, P., Raffel, S., Leonce, D.R., Milbank, J., Paulsen, M., Demir, A., Szu-Tu, C., Frömel, R., et al. (2021). Identification of leukemic and pre-leukemic stem cells by clonal tracking from single-cell transcriptomics. Nat. Commun. *12*, 1366.

Villatoro, A., Konieczny, J., Cuminetti, V., and Arranz, L. (2020). Leukemia Stem Cell Release From the Stem Cell Niche to Treat Acute Myeloid Leukemia. Front. Cell Dev. Biol. *8*, 607.

Will, C.L., Urlaub, H., Achsel, T., Gentzel, M., Wilm, M., and Lührmann, R. (2002). Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. EMBO J. *21*, 4978–4988.

Ye, N., Ding, Y., Wild, C., Shen, Q., and Zhou, J. (2014). Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1). J. Med. Chem. *57*, 6930–6948.

Zhang, Y., Xia, F., Liu, X., Yu, Z., Xie, L., Liu, L., Chen, C., Jiang, H., Hao, X., He, X., et al. (2018). JAM3 maintains leukemia-initiating cell self-renewal through LRP5/AKT/β-catenin/CCND1 signaling. J. Clin. Invest. *128*, 1737–1751.

Zhang, Z., Will, C.L., Bertram, K., Dybkov, O., Hartmuth, K., Agafonov, D.E., Hofele, R., Urlaub, H., Kastner, B., Lührmann, R., et al. (2020). Molecular architecture of the human 17S U2 snRNP. Nature *583*, 310–313.

FIGURE LEGEND

Figure 1. *Jam3* deficiency in LSC alters the transient amplification compartment of MLL-AF9 dependent AML

A: Scheme illustrating the experimental procedure used for generation and analysis of conditional *Jam3*-deficient leukemic mice (iMLL *Jam3^{ko/ko}*), wild type leukemic mice (iMLL *Jam3^{fi/fi}*) or non-leukemic control wild type mice (WT). **B**: Graph showing JAM-C mean of fluorescence intensity (MFI) on indicated subset isolated from bone marrow at endpoint of leukemic iMLL *Jam3^{fi/fi}* (filled circles), leukemic iMLL *Jam3^{ko/ko}* (empty squares) or age/sex matched C57/BI6 WT mice (filled squares). **C**: Graph showing evolution of white blood cell count (WBC) in indicated group of animals. Time scale is normalized to endpoint. **D**: Graph showing evolution of red cell distribution width (RDW) in indicated group of animals. **E-G**: relative frequencies of LSK **(E)**, LT-HSC, ST-HSC **(F)** and GMPs **(G)** isolated from bone marrow at endpoint of leukemic iMLL *Jam3^{fi/fi}* (filled squares). **H**: UMAP projection of Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1^{+/-} cells isolated from bone marrow of WT (left panel), iMLL *Jam3^{fi/fi}* (middle panel) or iMLL *Jam3^{ko/ko}* mice (right panel). Cell population are color-coded according to FACS gating. Data are represented with mean ±SEM, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 2. Jam3 deficiency results in up-regulation of AP-1 transcriptional network

A: Heatmap showing Log₂ normalized transcripts per million (tpm) of genes differentially expressed between leukemic HSC isolated from the bone marrow of indicated mice at endpoint (Adjusted p < 0.05). Genes in grey are differentially expressed between *Jam3*-deficient and *Jam3*-proficient mice both in HSC and GMP compartments. **B:** Volcano plot displaying differential expressed genes between HSCs isolated from the bone marrow of iMLL *Jam3*^{fl/fl} and iMLL *Jam3*^{ko/ko} as indicated. The vertical axis shows the mean expression value of Log₁₀ and the horizontal axis shows the Log₂ fold change value. Genes with log₂ FC >1 and Adjusted Pvalue <0.05, Adjusted P value <0.05 and Log₂ FC > 1 are represented in red, blue and green respectively. **C:** Same as (A) for leukemic GMP. **D:** same as (B) for leukemic GMP.

Figure 3. Genes associated to leukemic stemness and to JAM3-dependent signalling are grouped in independent regulons

A: Correlation plot showing expression of genes from Table 2 across samples from the TCGA cohort (n= 173). Red color indicates positive correlation and blue color negative correlation. Size of the circle and color intensity are proportional to correlation coefficient. Two gene expression correlation clusters are underlined and conserved across cohorts (see also supplementary Fig. 2). The first cluster corresponds to genes related to leukemic stemness (Cluster I) and the second to genes repressed in a *JAM3*-dependent manner (Cluster II). **B:** Plot showing pairwise correlation between the two leukemic stem cell markers *JAM3* and *GPR56* on three independent cohort: TCGA (n=173), OHSU (n=451) and Leucegene (n=263).

Figure 4. JAM-C-expressing cells represent a subset of GPR56-expressing LSC in AML patients

A: Histogram showing the frequency of cells expressing JAM-C (left panel) or GPR56 (right panel) within the indicated phenotypic compartment as defined in **supplementary Fig. 3A-B** (n=62). **B:** Histogram showing the frequency of cells expressing JAM-C within the indicated phenotypic compartment as defined in **supplementary Fig. 3C** (n=62). **C:** UMAP projection of bulk cells isolated from five independent patient sample. CD34⁺ CD38⁻, CD34⁻ CD38⁺, CD34⁻ CD38⁺ and CD34⁻ CD38⁻ cells (left panel) and CD34⁺ GPR56⁺, CD34⁻ GPR56⁺, CD34⁺ GPR56⁻ and JAM-C⁺ cells (right panel) are color-coded according to FACS gating strategy. Data are represented with mean ±SEM, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 5. The intracellular domain of JAM-C interacts with spliceosomal proteins

A: String analysis of protein neighbouring from the proteins identified by mass spectrometry after peptide pull down assay with JAM-C^{ICD} peptide (see Table 3). Nodes corresponding to the most significant enrichments of the protein network using KEGG database are shown (spliceosome FDR = 4.61 e⁻⁷ and endocytosis FDR = 0.0212). **B:** Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) results of JAM-C^{ICD} interactors using Label free quantitative values from Table 3. Results showing enrichment of spliceosome pathway (upper panel) and endocytosis pathway (lower panel) and heatmaps of the most significant protein of each pathway are shown (PMID: **16199517**, PMID: **12808457**). **C:** Western blot validation of DDX46 as a J JAM-C^{ICD} interactor. **D:** Western blot analysis showing the cleavage of JAM-C in Cos-7 cells transfected with hJAM-C^{flag}

or co-transfected with hJAM-C and hBACE-2^{HA} using anti-flag (upper panel) and anti-HA (bottom panel) antibodies. **E:** Phenotype of untransfected and hJAM-C^{flag} transfected HeLa, TF-1 and K562 cells by flow cytometry showing extra- (JAM-C) and intra- (FLAG) cellular staining of JAM-C after cell permeabilization. **F:** Western Blot analysis using flag (upper panel) and SF3B1 antibodies (bottom panel), after five sequential immunoprecipitations with an antibody directed against JAM-C ectodomain (upper panel line #1 to #5) followed either by flag or control immunoprecipitation.

Figure 6. Differential Splicing Analysis identifies differentially expressed isoforms of genes with prognosis value

A: Global representation of differential splicing analysis (DSA) results obtained by comparing RNAseq results from the Leucegene cohort between JAM-C^{high}/GPR56^{high} versus JAM-C^{low}/GPR56^{low} quartile. A3SS: alternative 3'splicing site; A5SS: alternative 5' splicing site; MXE: mutually exclusive exon; RI: intron retention; SE: exon skipping. **B:** Heatmap showing unsupervised clustering of normalized expression of genes selected from DSA results (see also Supplementary Fig 4). Belonging of the sample to the upper (JAM-C^{high}/GPR56^{high}) or lower quartile (JAM-C^{low}/GPR56^{low}) is indicated by the respective red and green annotation. **C-D:** Kaplan–Meier estimates of overall survival, according to SPL9 score on Leucegene **(C)** and TCGA **(D)** cohort. Stratification in "High" and "Low" was performed according to score values above and below the median value.

Figure 7. Validation of SPL9 score as a predictor of complete response

Heatmap showing gene expression and splicing event assessed by nCounter Nanostring technology. Each column represents a patient and each row correspond to the indicated gene or splicing event. Color code shows relative gene expression, high expression in red and low expression in blue. Patient were segregated on the basis of SPL9 score.

Supplementary Figure 1 related to Figure 1

A: Graph showing evolution after DOX induction of white blood cell count (WBC) for 6 independent iMLL Jam3^{fl/fl} and iMLL Jam3^{ko/ko} and five independent control littermate mice. **B**: Dot plots showing the gating strategy of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) in iMLL Jam3^{fl/fl} iMLL Jam3^{ko/ko} and non-leukemic wild type mice. **C**: Frequencies of MPP2, MPP3 and MPP4 cells within LSK compartment in iMLL Jam3^{fl/fl} (empty squares), iMLL Jam3^{ko/ko} (filled squares) and wild type mice (circles). Data are represented with mean ±SEM, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. **D**: UMAP projection of LSK cells isolated from bone marrow of three independent wild type mice, iMLL Jam3^{fl/fl} mice and iMLL Jam3^{ko/ko} mice. Cells are color-coded according to mice phenotype as indicated. **E**: Pseudo-time analysis of the indicated markers as a function of time based on hematopoietic differentiation.

Supplementary Figure 2 related to Figure 3

Correlation plot showing expression of genes from Table 2 across samples from the OHSU (n=451) and Leucegene (n=263) cohorts. Size of the circle and color intensity are proportional to correlation coefficient. Two gene expression correlation clusters are underlined and conserved across cohorts. The first cluster corresponds to genes related to leukemic stemness (Cluster I) and the second to genes repressed in a *JAM3*-dependent manner (Cluster II).

Supplementary Figure 3 related to Figure 4

A: Dot plots showing the gating strategy of bulk cells CD45^{Dim} CD33⁺ (left panel), CD34/CD38 expression (middle panel) and CD34/GPR56 (right panel) expression within the bulk. **B:** Dot plots showing the gating strategy to estimate the frequency of GPR56⁺ (right panel) and JAM-C⁺ (left panel) within each CD34/CD38 compartment. **C:** Dot plots showing the gating strategy to estimate the frequency of JAM-C⁺ (left panel) within each CD34/GPR56 compartment. For each experiment JAM-C expression was controlled with an isotypic staining (**B**, **C** middle and right panel respectively). Flow cytometry analysis was made from one representative patient sample. **D:** UMAP projection of bulk cells isolated from five independent patient samples. **E:** Box plot showing the frequency of isotypic control staining versus JAM-C staining within the bulk in each patient sample.

Supplementary Figure 4 related to Figure 6

Heatmap showing unsupervised clustering of normalized expression of all genes from DSA results (see also Table 4). Belonging of the sample to the upper (JAM-C^{high}/GPR56^{high}) or lower quartile (JAM-C^{low}/GPR56^{low}) is indicated by the respective red and green annotation.

F

Η





























GPR56 (ADGRG1) mRNA





















KG-1

JAM-C

Input

102

hJAM-C^{FLAG} cells

Beads

IB : α-DDX46



hJAM-C :

hBACE-2 :

24 17

52



<u>K562</u>

IB: α-Flag

IB: α-HA



F





D



p = 0.021




С

D









В

Gated on Lin⁷

Gated on LSK

CD135

1

c-kit

M

WT mice

LK

→ Sca-1

p-MPP4

→ CD150

LSK



→ CD34

1.0





Ε



iMLL Jam3^{fl/fl}



iMLL Jam3^{fl/fl}

p-MPP4 HSPC HSPC CD135 2 î đ m CD150 MPP2 MPP3 MPP2 CD48 1200 LT-HSC ſ ST-HSC LT-HSC м → CD150 MPP4 MPP4



iMLL Jam3^{fl/fl}

LSK

c-kit

LK

minini I.

→ Sca-1

c-kit

M





u Tr

→ Sca-1

p-MPP4

iMLL Jam3^{ko/ko}

LSK







CD48

î

CD16/32

î





- CD48



Cluster I

DNMT3B

VWF |

ARHGAP22

GPR56

Supp 2

-0.6

-0.8

-1







DISCUSSION

I Les fonctions moléculaires de JAM-C dans l'initiation leucémique

1 JAM-C est associé à l'activité souche dans la LAM.

Nos résultats dans le modèle iMLL-AF9 montrent que la délétion génique de JAM-C n'avait pas d'impact sur la latence d'apparition de la leucémie. Nos analyses phénotypiques ont montré que les souris iMLL Jam3^{-/-} présentent un phénotype de leucémie plus mature. Ces observations ont été confirmées par nos analyses de mRNAseq montrant une "up-régulation" de marqueurs de maturation dans les souris iMLL Jam3^{-/-}. Ces résultats laissent penser que JAM-C est impliqué dans le blocage de différentiation des blastes au cours de l'initiation leucémique. Chez les patients, l'expression de JAM-C est associé à un groupe de gènes souche comprenant notamment GPR56 (Pabst et al. 2016). Ces observations chez l'homme et chez la souris confirment l'association entre JAM-C et l'activité souche leucémique. Toutefois il serait judicieux de confirmer, à l'aide d'un panel de cytométrie mêlant marqueurs souches et marqueurs de maturation, la corrélation entre perte d'expression de JAM-C et maturation leucémique. Il serait également pertinent d'explorer cette question à travers les données des cohortes publiques síl existe un lien entre l'expression de JAM-C et la classification FAB. Par ailleurs nous n'avons pas adressé la question de l'agressivité leucémique, or l'expression de JAM-C dans les CSLs de patients est associée à un mauvais pronostic dans la LAM (De Grandis et al. 2017). Des études de survie à long terme entre les souris iMLL-AF9 Jam3^{fl/fl} et Jam3^{-/-} nous permettraient d'apporter des éléments de réponse. L'autre possibilité serait d'induire la leucémie puis de traiter les souris avec une combinaison de chimiothérapie. La validation de ce modèle pour étudier les fonctions de JAM-C dans l'initiation leucémique laisse entrevoir la possibilité de l'utiliser pour valider de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour ce travail, nous avons décidé de déléter l'expression de JAM-C avant d'initier la leucémie. Il pourrait être intéressant d'induire la leucémie avant d'induire la délétion de JAM-C. En se basant sur les données obtenues, nous pouvons supposer que dans cette configuration nous ayons un troisième phénotype leucémique à l'interface de ceux déjà observés. Cependant, nous ne pourrons pas éviter le risque d'un effet « off target » lié à l'injection de poly IC comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Zoughlami et al. 2012; De Grandis et al. 2017).

2 Le clivage de JAM-C^{ICD} en tant que régulateur de l'activité du spliceosome

La conclusion que le clivage de JAM-C^{ICD} régule l'activité de la machinerie d'épissage est sans doute celle qui demande le plus de travail pour être définitivement confirmée au niveau expérimental. En effet, nos résultats sont essentiellement corrélatifs à ce jour et la preuve formelle que la signalisation par la séquence JAM-C^{ICD} affecte l'activité du spliceosome doit encore être obtenue. Les résultats de DSA sur les mRNAseg révèlent l'existence d'un variant d'épissage de Fyn associé à l'expression de JAM-C, conservé entre l'Homme et la souris. Fyn fait partie des 9 protéines appartenant à la famille des Src-kinases (S. M. Thomas and Brugge 1997). L'épissage alternatif des exons 7A et 7B de Fyn peut conduire à deux isoformes principales, l'isoforme FynB (exon 7A) ou FynT (Exon 7B) (Brignatz et al. 2009). Cet évènement d'épissage alternatif affecte le domaine de liaison SH1/SH2. En effet, l'isoforme FynT possède un domaine de liaison plus court de trois acides aminés (Brignatz et al. 2009). D'un point de vue fonctionnel, l'isoforme FynT possède une activité kinase augmentée par rapport à l'isoforme FynB (Brignatz et al. 2009). Il est intéressant de noter que dans une étude récente du laboratoire nous avions montré que le domaine intracellulaire de JAM-C pouvait induire la phosphorylation des Src kinase (De Grandis et al. 2017). A la lumière de ces résultats, il est immaginable que la régulation de l'épissage du transcrit codant FynT par JAM-C^{ICD} soit responsable de cette différence. Il serait intéressant de valider cette hypothèse en transfectant des cellules avec FynB ou FynT puis de traiter ces cellules avec le peptide membrane perméant du domaine intracellulaire de JAM-C (De Grandis et al. 2017). Il est connu que FynT phosphoryle la protéine SAM68 et il a été proposé que la phosphorylation de SAM68 par FynT protégeait les cellules de l'apoptose (Brignatz et al. 2009). SAM68 est également un régulateur majeur de l'épissage, par exemple, SAM68 contrôle l'épissage de CD44 (Matter, Herrlich, and König 2002). En plus de ses fonctions sur la régulation de l'épissage, SAM68 est un cofacteur important des voies de signalisation wnt/βcatenine, p53 et NFkB (N. Li and Richard 2016; Benoit et al. 2017; Fu et al. 2016). Ces études suggèrent que SAM68 pourrait être un acteur majeur dans la régulation des cellules souche cancéreuses (CSCs). Il semblerait tout de même que le mode d'action de SAM68 soit assez complexe. L'inhibition pharmacologique de la voie wnt/β-

DISCUSSION

catenine induit la mort spécifique des CSCs et cet effet est potentialisé par SAM68. En effet, le « knock-out » de SAM68 entraîne une diminution de la mort cellulaire en réponse à l'inhibition de la voie wnt/β-catenine. Dès lors, il semblerait que selon le contexte, la protéine SAM68 soit à la fois un oncogène et un gène suppresseur de tumeur (Benoit et al. 2017). Dans la LAM, une analyse en bulk sur la cohorte TCGA montre que l'expression seule de SAM68 n'est pas associée à une valeur pronostique (BloodSpot). Néanmoins, il serait intéressant d'analyser l'expression de SAM68 dans un compartiment enrichi en CSLs. Par ailleurs, il serait pertinent de confirmer que la phosphorylation Src induite par JAM-C concerne bien l'isoforme FynT. Nous pourrions ainsi envisager d'aller explorer les niveaux protéiques de l'isoforme FynT dans les CSLs exprimant JAM-C et comparer ces niveaux d'expression aux cellules du bulk ou à des cellules CD34⁺/CD38⁻ leucémiques et saines. Enfin, au regard des données de la littérature, il serait intéressant de regarder les niveaux de phosphorylation de SAM68 dans les CSLs exprimant JAM-C. Nous pourrions imaginer un modèle hypothétique où le domaine intracellulaire de JAM-C participe à la phosphorylation de FynT qui induit la phosphorylation de SAM68 entrainant des altérations de l'épissage. De plus, Fyn induit une signalisation de type « inside-out » permettant l'activation des intégrines (Senis, Mazharian, and Mori 2014). Nos résultats et ceux de la littérature indiquent que l'expression de JAM-C est associée à une augmentation de l'activité de Fyn pouvant d'une part induire des modifications d'épissage via SAM68 et d'autre part moduler l'adhésion des CSLs au microenvironnement (Figure 36).





3 Les mécanismes d'adhésion JAM-C dépendant dans l'initiation leucémique.

Au-delà de ses propriétés cellulaires autonomes, la plupart des fonctions de JAM-C sont évidemment contrôlées par l'adhésion. Il s'agit d'un aspect des fonctions de JAM-C que je n'ai pas abordé directement au cours de mes travaux de thèse, je vais néanmoins en discuter dans cette partie de ma conclusion. Dans son étude sur le modèle iMLL AF9, V.Stavropoulou décrit une signature d'agressivité associée à la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) (Stavropoulou et al. 2016). L'EMT est un processus biologique se traduisant par la transformation de cellules épithéliales en cellules mésanchymateuses plus invasives qui participent à la dispertion tumorale et aux métastases dans les tumeurs solides. Cette signature EMT dans ce modèle est associée à une activité d'initiation leucémique et d'agressivité augmentée (Stavropoulou et al. 2016). Nos analyses de mRNAseg entre les CSHs iMLL Jam3-/et iMLL Jam3fl/fl indiquent que la délétion de JAM-C s'accompagne d'une uprégulation de certains gènes associés à l'EMT (Jun, Fos et Nfkbid), suggérant que l'EMT est augmentée à la suite de la délétion de JAM-C. Cette observation est cohérente dans la mesure où la dimérisation de JAM-C s'accompagne d'une perte d'adhésion, induisant l'EMT et la progression métastatique dans les carcinomes

DISCUSSION

(Garrido-Urbani et al. 2018). Toutefois, bien qu'au cours du développement embryonnaire la formation des CSHs définitives depuis l'aorta-gonad-mesonephrose fait intervenir l'EMT, dans le système hématopoïétique adulte les fonctions de l'EMT sur les CSHs restent à établir (Hamidi and Sheng 2018). En revanche, il est clairement établi que les CSHs migrent via des processus cellulaire faisant intervenir des molécules d'adhésions dont JAM-C (voir chapitre 1 paragraphe III.4). Dans ce contexte, il est possible que les cellules leucémiques n'exprimant pas JAM-C migrent différentiellement vers la circulation sanguine. Toutefois, nos suivis sanguins ne montrent pas de différence dans la latence d'apparition de la leucémie, suggérant qu'il n'y a pas de différence de mobilisation entre les blastes Jam3^{-/-} et Jam3^{fl/fl}. Cependant, il aurait été intéressant de phénotyper les CSHs circulantes afin de vérifier si les CSHs iMLL-AF9 Jam3^{-/-} sont plus mobilisées que les CSHs iMLL Jam3^{fl/fl}. Etant donnée que la mobilisation des CSHs s'accompagne d'une augmentation de la différenciation hématopoïétique, cela contribuerait à expliquer nos observations sur la maturation leucémique dans les souris iMLL Jam3^{-/-}.

Nous savons également que la migration des CSHs et des cellules leucémiques est controlée par le rythme circadien (He et al. 2018). D'ailleurs nos résultats préliminaires montrent que dans la lignée KG-1 l'expression de JAM-C s'accompagne d'un épissage différentiel des ARNm de PER3 et CSNK1e, des protéines essentielles à l'activité circadienne (**Figure 35**). Ces observations laissaient suggérer que JAM-C pouvait réguler l'activité circadienne des CSLs. Cependant, nous n'avons jamais réussi à démontrer au niveau protéique une régulation de l'expression de PER3 et CSNK1e dans les KG1^{JAM-C+} et KG1^{JAM-C-}. Néanmoins, il serait interessant de saigner les souris tôt le matin, à midi et tard le soir afin de vérifier si la délétion de JAM-C induit une modulation de la migration des cellules leucémiques en régulant l'activité circadienne.

Enfin, ce modèle pourrait nous permettre de répondre à l'interrogation concernant l'interaction JAM-C/JAM-B dans l'initiation leucémique. Il est clairement établi que dans l'hématopoïèse normale l'interaction entre JAM-C et JAM-B régule le maintien et la quiescence des CSHs murines (Arcangeli et al. 2014; 2011). Dans le contexte leucémique, le rôle de cette interaction reste à explorer. Ainsi nous pourrions greffer des CSHs iMLL Jam3^{-/-} et Jam3^{fl/fl} dans des récipients Jam2^{-/-}. Les résultats pourront nous conduire à reconsidérer le ciblage thérapeutique de JAM-B dans la LAM. Des approches en immunohistologie nous permettraient également d'explorer la localisation des CSHs iMLL-AF9 dans la moelle osseuse en fonction de l'expression de JAM-C. Il s'agirait d'expériences tout à fait pertinentes étant donné que la localisation des CSHs dans la niche permet de renseigner sur le type d'interactions et la quiescence des CSHs.

Chez les patients, l'ARNm de CXCR4 est anti-corrélé à celui de JAM-C. Ces observations laissent penser que CXCR4 et JAM-C ne sont pas exprimés sur les mêmes populations cellulaires ou que JAM-C régule l'expression de CXCR4. Les données de la littérature montrent que CXCR4 et JAM-C sont exprimés par les CSLs. Il est possible, dans ce contexte, que ces deux protéines aient les mêmes fonctions et soient donc mutuellement exclusives, à l'image de ce qui est observé pour les mutations TET2 et IDH1/2 (De Grandis et al. 2017; Spoo et al. 2007). Dès lors, il est possible que JAM-C et CXCR4 identifient deux populations de patients ayant un enrichissement différent en CSLs. Au niveau protéigue, il a été montré dans le glioblastome que l'arrestin-β1 induit l'internalisation de CXCR4 après stimulation avec CXCL12 (Clift et al. 2014). Il est d'ailleurs intéressant de constater que les complexes structuraux impliquants les arrestines sont régulés par les protéines à domaine PDZ (Romero, von Zastrow, and Friedman 2011). Or, JAM-C présente un motif de liaison aux PDZ et nos résultats de protéomiques montrent que JAM-C peut interagir avec l'arrestin-β1. Dès lors, Il est possible que JAM-C influe sur l'interaction de l'arrestin-β1 avec ses partenaires protéiques régulant indirectement l'expression de surface de CXCR4.Il serait intéressant de vérifier par cytométrie en flux sur nos cohortes de patients l'expression de CXCR4 et de JAM-C sur les CSLs. Il pourrait également être pertinent d'étudier si une forme mutée de JAM-C déplétée de son motif PDZ restaure l'expression de surface de CXCR4. Toutefois, cette régulation aurait lieu à l'échelle protéique et non pas à celle de l'ARN, n'expliquant pas pourquoi l'ARNm de JAM-C et celui de CXCR4 sont anti-corrélés. Par ailleurs dans le système hématopoïétique, JAM-C et CXCR4 sont exprimés par les CSHs (Zou et al. 1998; Praetor et al. 2009) suggérant qu'il n'existe pas de régulation protéigue de CXCR4 médiée par JAM-C. De plus, les données de la littérature montrent que l'inhibition de CXCR4 dans la LAM induit la mobilisation et la différenciation des blastes tout en les sensibilisant aux chimiothérapies (Tavor et al. 2008; Nervi et al. 2009). Cela irait donc contre nos observations montrant que l'expression de JAM-C est associée à l'agressivité dans la LAM. Je pense qu'il serait intéressant d'explorer le lien entre l'expression de JAM-C et la down-régulation de CXCR4. Nos résultats et ceux de la littérature pourrait argumenter vers l'hypothèse que JAM-C et CXCR4 identifient deux populations de patients ayant un enrichissement différent en CSLs. Cette dernière hypothèse pouvant être testée par des approches en DLA avec des cellules de patients triées.

4 Le clivage du domaine intracellulaire de JAM-C : un nouveau mécanisme JAM-C-dépendant ?

L'exemple le plus connu de clivage protéigue conduisant à la génération d'un ICD fonctionnel est celui de la voie Notch. La voie de signalisation Notch repose sur l'intéraction entre une cellule présentant un ligand Notch (Jag1-2, Dll1, Dll3 ou Dll4) avec une cellule exprimant le récepteur Notch (Notch 1-4). L'interaction entre le récepteur et son ligand induit deux clivages séquentiels médiés par ADAM et la ysecrétase conduisant à la libération de l'ICD de Notch (NICD). Le NICD agit alors comme un facteur de transcription après avoir translogué dans le noyau (Meurette and Mehlen 2018). Il a été rapporté dans la littérature que JAM-C est clivé par ADAM10/17 libérant une forme soluble de JAM-C (s-JAM-C) qui promeut l'angiogenèse (Rabguer et al. 2010). La présence du sJAM-C par ELISA dans les surnageants de moelle osseuse de souris iMLL-AF9 Jam3^{fl/fl} confirme que JAM-C est clivé dans le contexte leucémique (non montré). Il serait intéressant de regarder par immunohistologie le niveau de vascularisation des moelles osseuses iMLL-AF9 Jam3^{fl/fl} versus Jam3^{-/-} afin de voir si sJAM-C induit l'angiogenèse dans le contexte de la LAM. Il pourrait également être relevant de mesurer les niveaux sériques de sJAM-C dans la moelle osseuse de patient atteints de LAM. A l'instar de la voie Notch, nous pensions que ce clivage extracellulaire de JAM-C s'accompagnait d'un clivage intracellulaire libérant un ICD ayant des propriétés biologiques. Nous avons pu confirmer notre hypothèse initiale, selon laquelle BACE-2 pouvait cliver JAM-C. Les données actuelles de la littérature montrent que le BACE-2 clive les protéines au niveau de leur domaine juxtamembranaire (Esterházy et al. 2011; Yan 2017). Il n'existe pas de séquence consensus de clivage attribué à BACE-2, néanmoins il semble que BACE-2 clive de facon préférentielle après les phénylalanines, les leucines et les alanines, tout trois des acides aminés hydrophobes. De façon très intéressante un des substrats de BACE-2, TMEM27, est clivé au niveau d'un motif FLND (Esterházy et al. 2011) (Figure 37). Or, juste avant le domaine transmembranaire de JAM-C nous retrouvons un motif DLN pouvant représenter un potentiel site de clivage par BACE-2 (Figure 37).



Figure 37 Le site de clivage potentiel de JAM-C par BACE-2

Cependant, dans la LAM les niveaux d'expression de BACE-2 sont relativement faibles sauf dans les LAM à caryotype complexe (BloodSpot), suggérant que le clivage de JAM-C dans la LAM n'est pas uniquement dépendant de BACE-2. Dans l'organisme, JAM-C et BACE-2 sont très coexprimés dans le tissu cérébral, il pourrait-être pertinent dans ce contexte d'étudier le clivage de JAM-C par BACE-2. En effet dans le gliome, l'expression de BACE-2 est associée au mauvais pronostic (ProteinAtlas). Il pourrait-être intéressant d'explorer le rôle de JAM-C dans ce cancer.

Plusieurs exemples dans la littératures tels que CD44, Notch et APP montre que le clivage de l'ectodomaine d'une protéine s'accompagne de la génération d'un ICD (Farzan et al. 2000; Okamoto et al. 2001; Meurette and Mehlen 2018). Nos expériences en western-blot confirment que le clivage de JAM-C s'accompagne de la génération d'un ICD. Théoriquement, la taille de notre ICD devrait au maximum atteindre les 3,9kDa. Jusqu'alors, par western-blot, nous n'avons pas réussi à identifier un tel fragment. En revanche, nous avons pu confirmer par spectrométrie de masse l'existence d'un ICD correspondant à la taille théorique attendue. D'un point de vue fonctionnel, nous savons que l'ICD de JAM-C est seul et suffisant pour induire la phosphorylation des Src kinases et augmenter la clonogénicité des CSLs dérivées de

KG-1 exprimant JAM-C (De Grandis et al. 2017). D'autre part, mes expériences de peptide pull-down démontrent que l'ICD de JAM-C interagit à la fois avec les protéines à PDZ et avec des protéines de la machinerie d'épissage. De plus, des résultats préliminaires en PLA (proximity ligation assay) et de co-immunoprécipitation séquentielle montrent que l'ICD de JAM-C interagit avec la protéine de l'épissage SF3B1. La séquence de l'ICD de JAM-C présente un motif NYIRT qui est absent de JAM-A, suggérant que ce motif puisse être responsable de l'interaction spécifique de l'ICD de JAM-C avec les protéines de l'épissage. Cette observation est d'autant plus intéressante que la seule autre protéine possédant un motif NYIRT dans tout le protéome est une hélicase (DHX15) capable de se lier à l'ARN et faisant partie du spliceosome (X. Zhang et al. 2018). Nos résultats préliminaires, montrent que la séquence NYIRT est nécessaire et suffisante pour l'interaction de l'ICD de JAM-C avec les protéines du spliceosome. D'autre part, le peptide NYIRT augmente la clonogénicité des CSLs KG-1 exprimant JAM-C alors qu'un peptide aléatoire TRIYN n'a aucun effet. Par ailleurs, l'expression transitoire d'une forme tronquée de JAM-C où le motif NYIRT est remplacé par cing Alanine induit une diminution de la phosphorylation de certaines protéines. Ensemble, ces données suggèrent que les fonctions de l'ICD sont induites par l'interaction de l'ICD via la séquence NYIRT. Dès lors, il est légitime de se demander si ce motif protéique spécifique à JAM-C n'est pas impliqué dans les mécanismes d'initiation leucémique. Il serait intéressant de répondre à cette question en utilisant le modèle iMLL-AF9. En effet, chez la souris le motif NYIRT est porté par l'exon 8. Il serait envisageable de faire un Knock-out spécifique (par édition génomique) de cet exon dans le modèle iMLL-AF9 pour étudier l'influence de la délétion du motif NYIRT dans l'initiation leucémique et sur l'activité d'épissage. L'ensemble de ces observations ont été faite en utilisant une forme recombinante de JAM-C exprimant un flag en C-terminal. Nous avons lancé une production d'anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine C-terminal de JAM-C pour vérifier l'hypothèse du clivage dans des conditions d'expression endogène de JAM-C. Les perspectives relatives à ces découvertes ont découlé sur un nouveau projet de thèse mené par C.Testut dans le laboratoire.

II L'épissage alternatif, une nouvelle caractéristique de la CSL de LAM ?

1 L'épissage alternatif est une valeur pronostique dans la LAM.

Nos résultats montrent qu'il existe une signature d'épissage directement associée au caractère souche et au pronostic dans la LAM. Ces observations sont en adéguation avec les données récente de la littérature montrant que certains évènements d'épissage alternatifs étaient associés à un mauvais pronostic dans la LAM (Anande et al. 2020; P. Jin et al. 2020). Par exemple, Le groupe de J.Pimanda décrit une signature de 4 variants d'épissage permettant de stratifier les patients plus efficacement que la classification ELN (Anande et al. 2020). Curieusement, aucun variant d'épissage de leur signature n'est commun à ceux utilisés pour le score SPL9. Plus surprenant encore, un seul de leur 4 variants d'épissage (MYOB9) est commun à nos analyses d'épissage différentiel (DSA) sur la cohorte leucegene. Cette différence doit probablement provenir de la facon dont ont été sélectionnés les patients. Dans l'étude de G.Anande, les DSA ont été réalisées sur 63 patients de la cohorte TCGA, 21 ELN-défavorable contre 41 ELN-favorable (Anande et al. 2020). Dans notre étude nous avons fait le choix de faire nos DSA en fonction de l'expression des marqueurs de CSLs, JAM-C et GPR56 associés au caractère "souche" des échantillons. Il serait donc intéressant de comparer l'efficacité de chacune de ces signatures à prédire le risque de rechute. Il s'agit d'un paramètre permettant de mesurer indirectement l'activité des CSLs. En effet, alors que notre signature a été validée expérimentalement par Nanostring sur une cohorte rétrospective de l'IPC, la signature de Anande n'a pour l'heure été validé qu'in silico. Je pense qu'il est essentiel de valider expérimentalement la présence de ces variants d'épissage dans les échantillons. En effet, nous savons que les ARNm sont soumis à un contrôle qualité drastique lors de l'épissage et la traduction par les ribosomes pouvant impacter sur le niveau global d'expression des ARNm. L'insertion d'un codon stop prémature, au cours de l'épissage entraine une cascade d'évènements moléculaires conduisant à la dégradation des ARNm via la voie du NMD (Non-sense mediated decay). Par exemple, la rétention d'introns est très souvent associée à une dérégulation génique car les ARNm sont dégradés via le NMD (A. G. Jacob and Smith 2017). Or, parmi les 4 variants d'épissage sélectionnés par Anande, l'ARNm de GAS5 présente une rétention d'intron. Par conséquent, il serait intéressant de confirmer expérimentalement la présence de ce variant d'épissage,

DISCUSSION

dans des échantillons de patients, soit par Nanostring ou même par gPCR. Toutefois, ces résultats démontrent qu'au delà des profils d'expression géniques et épigénétiques, l'épissage représente une composante moléculaire essentielle dans la biologie des LAM (Anande et al. 2020; P. Jin et al. 2020). Récemment, il a été montré que c-myc est un modulateur indirect de l'épissage en contrôlant l'expression de la protéine PRMT5 une arginine méthyl transférase essentielle dans les fonctions d'épissage (Koh et al. 2015). Il apparaît alors que certains oncogènes peuvent indirectement moduler les fonctions d'épissage, confortant l'idée que l'épissage est régulé indépendamment des statuts mutationnels. Enfin, plusieurs travaux dans la LAM ont montré une dérégulation de l'expression des protéines se liant au spliceosome chez les patients atteints de LAM (Crews et al. 2016; E. Wang et al. 2019). Nos données et celles de la littérature tendent à montrer que les altérations de l'épissage ne sont pas directement associées aux mutations de la machinerie de l'épissage. Ces données sont cohérentes avec le paysage mutationnel de la LAM montrant que seuls 14% des patients présentent une mutation pour l'épissage (DiNardo and Cortes 2016; Papaemmanuil et al. 2016).

2 L'épissage alternatif est-il associé à un état pré-leucémique ?

Au cours du vieillissement, les profils d'épissage des CSHs et des progéniteurs hématopoïétiques (HPC) changent (Crews et al. 2016). Les HPC vieillissant présentent des profils d'épissage associés à la survie (isoforme longue de Bcl-2) tandis que les CSHs « vieilles » expriment une isoforme pro-apoptotique de Bcl-2 (Crews et al. 2016). D'ailleurs, le phénotype des souris mutées pour U2AF1 présentent une expansion du compartiment HPC associé à un profil d'épissage pro-MDS/LAM (Shirai et al. 2015). Ces observations suggèrent que les modulations de l'épissage induisent l'apparition d'un terrain propice à l'expansion clonale du compartiment HPC et que ce risque augmente avec l'apparition d'une mutation. Nos résultats préliminaires sur des échantillons de LMMC montrent que la signature SPL9 est capable de prédire la transformation en sLAM (non montrés). Ces résultats tendent à démontrer que l'épissage alternatif est un événement précoce permettant de prédire la transformation leucémique. Ces résultats, qui sont à confirmer sur de plus nombreux échantillons, feraient de la SPL9 la seule signature à ma connaissance pouvant prédire le risque d'évolution leucémique toutes hémopathies confondues. Il serait également intéressant de tester le pouvoir prédictif de cette signature dans des échantillons pairés

d'individus ayant développé une LAM après un diagnostic ARCH. Les études de S.Abelson et P.Desai montrent que l'acquisition de mutation de l'épissage durant l'ARCH augmente le risque de développer une LAM *de novo* (Abelson et al. 2018; Desai et al. 2018). Cette observation est à première vue contradictoire car contrairement aux SMD et aux sLAM, les mutations de l'épissage sont très rares dans les LAM de novo (Sperling, Gibson, and Ebert 2017). Toutefois, ces études décrivent le pouvoir d'une mutation ARCH à prédire l'apparition d'une LAM. En d'autres termes, parmi toutes les mutations ARCH, celles de l'épissage permettent de prédire la transformation leucémique. Ces résultats, en accord avec les nôtres, confirment que les altérations d'épissage peuvent témoigner d'un état pré-leucémique conférant aux cellules une permissivité d'évolution vers la LAM.

III La place des CSLs et des signatures pronostiques dans la pratique clinique

Bien que ces trois dernières années aient marqué un tournant dans la prise en charge thérapeutique des LAM avec l'apparition de nouveaux traitements approuvés par la FDA (Estey 2018), le ciblage thérapeutique des CSLs reste un enjeu majeur pour la prise en charge des patients atteints de LAM. En effet, les phénomènes de rechutes fréquemment observés dans la LAM persistent, suggérant que ces traitements n'ont que très peu d'effet sur les CSLs. Pourtant, ces dernières années ont été riches en découvertes de nouvelles cibles thérapeutiques. Comment expliquer alors qu'en 2021 si peu de progrès ont été faits concernant le ciblage thérapeutique des CSLs ? Un premier élément de réponse vient de la façon dont les essais cliniques sont conçus. Les essais cliniques évaluent les candidats médicaments en fonction de leur efficacité à induire une CR en ayant le moins d'effets secondaires possible (Pollyea et al. 2014). Bien que le nombre de CSLs soit un facteur pronostic de survie, le taux de rémission n'est pas corrélé à leur fréquence (van Rhenen et al. 2005). Ainsi, ce critère de réponse semble inefficace à mesurer l'efficacité d'un traitement sur les CSLs. Au contraire, ce critère peut pousser à recaler un traitement alors que celui-ci est efficace sur les CSLs, un des exemples les plus emblématiques étant celui de la mise sur le marché des anti-CD33 (GO). Les premiers résultats des essais cliniques du GO en monothérapie n'ont pas montré d'améliorations notables du taux de RC conduisant la FDA à ne pas autoriser ce traitement (Sievers et al. 2001). Cependant, des essais cliniques ultérieurs ont montré qu'en combinaison avec des chimiothérapies le GO améliorait nettement

DISCUSSION

la survie globale (OS) et la survie sans rechute (RFS) (Hills et al. 2014). Ce dernier paramètre permet de démontrer que le GO semble avoir un effet sur le compartiment des CSLs. Ces observations ont conduit la FDA à revenir sur sa décision initiale en approuvant l'utilisation du GO pour le traitement des LAM. C'est pourquoi le choix du point final lors d'un essai clinique est un critère primordial pour adresser l'efficacité d'un médicament sur le long terme. En effet les critères d'OS et de RFS permettent de mieux juger de l'efficacité d'un traitement sur les CSLs. Cependant, pour être efficaces ces critères doivent être mesurés sur des cohortes avec un long suivi dans le temps sur un grand nombre de patients, chose qui n'est possible que dans le cadre d'un essai clinique de phase III (Stahl, Kim, and Zeidan 2016; Pollyea et al. 2014). Cependant, les critères d'OS et de RFS restent simplement corrélatifs et ils ne permettent pas de réellement mesurer concrètement l'activité des CSLs après un traitement. A première vue la MRD serait un critère de choix pour mesurer l'activité des CSLs chez un patient. En ce sens, dans la LAM la MRD est un facteur de mauvais pronostic associé à la rechute suggérant un enrichissement en CSLs (Feller et al. 2004). En clinique, la MRD est mesurée par cytométrie en flux multiparamétrique et/ou par des approches cytogénétique (gPCR et NGS) (Schuurhuis et al. 2018). D'ailleurs, l'ELN a dressé de nouvelles recommandations pour standardiser la mesure de la MRD dans la LAM (Schuurhuis et al. 2018). Dans les recommandations de l'ELN, il est surprenant de noter qu'hormis CD33 aucun marqueur des CSLs ne figure dans le panel de cytométrie dédié à la mesure de la MRD (Schuurhuis et al. 2018). Ce problème soulève la question suivante, comment distinguer au sein de la MRD les simples clones leucémiques de ceux ayant un potentiel d'initiation leucémique ?

Pour répondre à cette problématique, il a été proposé la possibilité de récupérer, pour chaque essai clinique, des échantillons de cellules de patient avant et après traitement, puis de pratiquer des greffes en dilution limite dans des souris NSG (Pollyea et al. 2014). Il apparait clairement qu'une telle approche est inenvisageable dans un essai clinique prospectif, tant sur le plan éthique (3R) que matériel. Il s'agit d'un type d'approche envisageable en recherche fondamentale pour justement trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Finalement, le principal enjeu est de réussir à concilier les découvertes de la science fondamentale avec la réalité d'un essai clinique. L'élaboration en 2016 du score LSC17 par le groupe de J.Dick a permis de faire un pas de plus vers cette réalité (Ng et al. 2016). De la même manière, le score SPL9,

nous a permis de démontrer l'efficacité de ces scores pour stratifier les patients de bon et de mauvais pronostics (voir article 2), l'avantage majeur de ces approches étant de pouvoir s'appliquer facilement à la routine clinique.

Sur cet aspect de mon travail de thèse, je pense qu'il serait intéressant d'évaluer l'efficacité du score SPL9 en prospectif en combinaison avec la signature LSC17. Il est en effet possible que la cumulation des deux signatures nous permette d'améliorer considérablement la portée pronostique du système. Il serait également intéressant de vérifier si notre signature SPL9 permet de mesurer l'activité initiatrice de leucémie. Pour répondre à cette interrogation, il serait intéressant de réaliser une expérience consistant à xénogreffer des cellules leucémiques (triées et non triées) de 3 patients SPL9^{High} et 3 patients SPL9^{Low} avant et après rémission en dilution limite dans des souris NSG. En plus de jouer un rôle d'aide à la décision thérapeutique, ces signatures pourront être utilisées lors d'essais cliniques pour mesurer rapidement et efficacement l'effet d'un candidat médicament sur l'activité des CSLs. Néanmoins, il faudra à l'avenir réussir à répondre au défi de l'hétérogénéité des CSLs dans le but d'aller vers une médecine de plus en plus personnalisée. Cette réussite passera par l'élaboration d'outils diagnostics prédictifs de plus en plus performant et compatibles avec la routine clinique.

CONCLUSION

Bien que le taux de rémission complète soit plutôt bon en première ligne de traitement, les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) restent de mauvais pronostic à cause des rechutes. Il est admis que la rechute dans la LAM est due aux cellules souches leucémique (CSLs) quiescentes nichées dans la moelle osseuse. Les résultats de ce travail démontrent l'existence d'évènements d'épissage alternatif associés à l'expression de JAM-C et à l'activité d'initiation leucémique. En effet, il semble que l'activité de la machinerie d'épissage dans les CSLs soit régulée par l'interaction de la séquence cytosolique de JAM-C avec des protéines du spliceosome. Dans ce contexte, nous avons identifié une signature d'épissage pronostique associée à l'expression de JAM-C et à l'activité souche dans la LAM. Cette signature permet de stratifier les patients et pourrait être utilisée dans le futur en routine clinique pour l'aide à la décision thérapeutique. Nos données suggèrent que l'épissage alternatif est un mécanisme fondamental dans la biologie de la LAM et des CSLs. Il est donc essentiel de reconsidérer la place de l'épissage dans la LAM car, en plus des marques épigénétiques et des mutations géniques, l'épissage représente un niveau de régulation supplémentaire du protéome qui pourrait contribuer à l'hétérogénéité des CSLs. La découverte de nouveaux variants d'épissage associés à l'activité souche leucémique permet d'envisager la découverte de variants protéigues spécifiquement exprimées chez les individus à haut risque de développer une LAM et exploitables dans des approches de thérapies ciblées.

BIBLIOGRAPHIE

- Abelson, Sagi, Grace Collord, Stanley W. K. Ng, Omer Weissbrod, Netta Mendelson Cohen, Elisabeth Niemeyer, Noam Barda, et al. 2018. "Prediction of Acute Myeloid Leukaemia Risk in Healthy Individuals." *Nature* 559 (7714): 400–404. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0317-6.
- Abrahamsson, Annelie E., Ifat Geron, Jason Gotlib, Kim-Hien T. Dao, Charlene F. Barroga, Isabel G. Newton, Francis J. Giles, et al. 2009. "Glycogen Synthase Kinase 3beta Missplicing Contributes to Leukemia Stem Cell Generation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (10): 3925–29. https://doi.org/10.1073/pnas.0900189106.
- Adamia, Sophia, Benjamin Haibe-Kains, Patrick M. Pilarski, Michal Bar-Natan, Samuel Pevzner, Herve Avet-Loiseau, Laurence Lode, et al. 2014. "A Genome-Wide Aberrant RNA Splicing in Patients with Acute Myeloid Leukemia Identifies Novel Potential Disease Markers and Therapeutic Targets." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (5): 1135–45. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0956.
- Adams, J. M., A. W. Harris, C. A. Pinkert, L. M. Corcoran, W. S. Alexander, S. Cory, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1985. "The C-Myc Oncogene Driven by Immunoglobulin Enhancers Induces Lymphoid Malignancy in Transgenic Mice." *Nature* 318 (6046): 533–38. https://doi.org/10.1038/318533a0.
- Adolfsson, Jörgen, Robert Månsson, Natalija Buza-Vidas, Anne Hultquist, Karina Liuba, Christina T. Jensen, David Bryder, et al. 2005. "Identification of Flt3+ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential a Revised Road Map for Adult Blood Lineage Commitment." *Cell* 121 (2): 295– 306. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.013.
- Ahat, Erpan, Jie Li, and Yanzhuang Wang. 2019. "New Insights Into the Golgi Stacking Proteins." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7: 131. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00131.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I. L. Weissman. 2000. "A Clonogenic Common Myeloid Progenitor That Gives Rise to All Myeloid Lineages." *Nature* 404 (6774): 193–97. https://doi.org/10.1038/35004599.
- Almosailleakh, Marwa, and Juerg Schwaller. 2019. "Murine Models of Acute Myeloid Leukaemia." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2). https://doi.org/10.3390/ijms20020453.
- Anande, Govardhan, Nandan P. Deshpande, Sylvain Mareschal, Aarif M. N. Batcha, Henry R. Hampton, Tobias Herold, Soren Lehmann, et al. 2020. "RNA Splicing Alterations Induce a Cellular Stress Response Associated with Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 26 (14): 3597–3607. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0184.
- Andrews, R. G., J. W. Singer, and I. D. Bernstein. 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 (3): 842– 45.
- Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari, and R. L. Juliano. 1998. "Signal Transduction and Signal Modulation by Cell Adhesion Receptors: The Role of Integrins,

Cadherins, Immunoglobulin-Cell Adhesion Molecules, and Selectins." *Pharmacological Reviews* 50 (2): 197–263.

- Arai, Fumio, Atsushi Hirao, Masako Ohmura, Hidetaka Sato, Sahoko Matsuoka, Keiyo Takubo, Keisuke Ito, Gou Young Koh, and Toshio Suda. 2004.
 "Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche." *Cell* 118 (2): 149–61. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.004.
- Arai, Fumio, Osamu Ohneda, Takeshi Miyamoto, Xiu Qin Zhang, and Toshio Suda.
 2002. "Mesenchymal Stem Cells in Perichondrium Express Activated Leukocyte
 Cell Adhesion Molecule and Participate in Bone Marrow Formation." *The Journal of Experimental Medicine* 195 (12): 1549–63. https://doi.org/10.1084/jem.20011700.
- Arber, Daniel A., Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, and James W. Vardiman. 2016. "The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia." *Blood* 127 (20): 2391–2405. https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544.
- Arcangeli, Marie-Laure, Florence Bardin, Vincent Frontera, Ghislain Bidaut, Elodie Obrados, Ralf H. Adams, Christian Chabannon, and Michel Aurrand-Lions. 2014. "Function of Jam-B/Jam-C Interaction in Homing and Mobilization of Human and Mouse Hematopoietic Stem and Progenitor Cells." *Stem Cells* (*Dayton, Ohio*) 32 (4): 1043–54. https://doi.org/10.1002/stem.1624.
- Arcangeli, Marie-Laure, Vincent Frontera, Florence Bardin, Elodie Obrados, Susanne Adams, Christian Chabannon, Claudine Schiff, Stephane J. C. Mancini, Ralf H. Adams, and Michel Aurrand-Lions. 2011. "JAM-B Regulates Maintenance of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow." *Blood* 118 (17): 4609–19. https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-323972.
- Arrate, M. P., J. M. Rodriguez, T. M. Tran, T. A. Brock, and S. A. Cunningham. 2001. "Cloning of Human Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM3) and Its Identification as the JAM2 Counter-Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (49): 45826–32. https://doi.org/10.1074/jbc.M105972200.
- Arroyo, A. G., J. T. Yang, H. Rayburn, and R. O. Hynes. 1996. "Differential Requirements for Alpha4 Integrins during Fetal and Adult Hematopoiesis." *Cell* 85 (7): 997–1008. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81301-x.
- Askmyr, Maria, Helena Ågerstam, Nils Hansen, Sandra Gordon, Alexandros Arvanitakis, Marianne Rissler, Gunnar Juliusson, Johan Richter, Marcus Järås, and Thoas Fioretos. 2013. "Selective Killing of Candidate AML Stem Cells by Antibody Targeting of IL1RAP." *Blood* 121 (18): 3709–13. https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-458935.
- Aurrand-Lions, M. A., L. Duncan, L. Du Pasquier, and B. A. Imhof. 2000. "Cloning of JAM-2 and JAM-3: An Emerging Junctional Adhesion Molecular Family?" *Current Topics in Microbiology and Immunology* 251: 91–98. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57276-0_12.
- Aurrand-Lions, M., C. Johnson-Leger, C. Wong, L. Du Pasquier, and B. A. Imhof. 2001. "Heterogeneity of Endothelial Junctions Is Reflected by Differential Expression and Specific Subcellular Localization of the Three JAM Family Members." *Blood* 98 (13): 3699–3707. https://doi.org/10.1182/blood.v98.13.3699.
- Aurrand-Lions, Michel, Chrystelle Lamagna, John P. Dangerfield, Shijun Wang, Pedro Herrera, Sussan Nourshargh, and Beat A. Imhof. 2005. "Junctional Adhesion Molecule-C Regulates the Early Influx of Leukocytes into Tissues during

Inflammation." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (10): 6406–15. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6406.

- Aurrand-Lions, Michel, and Stéphane J. C. Mancini. 2018. "Murine Bone Marrow Niches from Hematopoietic Stem Cells to B Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8). https://doi.org/10.3390/ijms19082353.
- Bailly, Anne-Laure, Julien M. P. Grenier, Amandine Cartier-Michaud, Florence Bardin, Marielle Balzano, Armelle Goubard, Jean-Claude Lissitzky, et al. 2020.
 "GRASP55 Is Dispensable for Normal Hematopoiesis but Necessary for Myc-Dependent Leukemic Growth." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 204 (10): 2685–96. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901124.
- Bajaj, Jeevisha, Takaaki Konuma, Nikki K. Lytle, Hyog Young Kwon, Jailal N. Ablack, Joseph M. Cantor, David Rizzieri, et al. 2016. "CD98-Mediated Adhesive Signaling Enables the Establishment and Propagation of Acute Myelogenous Leukemia." *Cancer Cell* 30 (5): 792–805. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.003.
- Balzano, Marielle, Maria De Grandis, Thien-Phong Vu Manh, Lionel Chasson, Florence Bardin, Anne Farina, Arnauld Sergé, et al. 2019. "Nidogen-1 Contributes to the Interaction Network Involved in Pro-B Cell Retention in the Peri-Sinusoidal Hematopoietic Stem Cell Niche." *Cell Reports* 26 (12): 3257-3271.e8. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.065.
- Barbier, Valerie, Johanna Erbani, Corrine Fiveash, Julie M. Davies, Joshua Tay, Michael R. Tallack, Jessica Lowe, et al. 2020. "Endothelial E-Selectin Inhibition Improves Acute Myeloid Leukaemia Therapy by Disrupting Vascular Niche-Mediated Chemoresistance." *Nature Communications* 11 (1): 2042. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15817-5.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Sahar, Claudia Erpelinck, Wim L. J. van Putten, Peter J. M. Valk, Sonja van der Poel-van de Luytgaarde, Ronald Hack, Rosalyn Slater, et al. 2003. "High EVI1 Expression Predicts Poor Survival in Acute Myeloid Leukemia: A Study of 319 de Novo AML Patients." *Blood* 101 (3): 837–45. https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1459.
- Baum, C. M., I. L. Weissman, A. S. Tsukamoto, A. M. Buckle, and B. Peault. 1992. "Isolation of a Candidate Human Hematopoietic Stem-Cell Population." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (7): 2804–8. https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2804.
- Beghini, A., C. B. Ripamonti, P. Peterlongo, G. Roversi, R. Cairoli, E. Morra, and L. Larizza. 2000. "RNA Hyperediting and Alternative Splicing of Hematopoietic Cell Phosphatase (PTPN6) Gene in Acute Myeloid Leukemia." *Human Molecular Genetics* 9 (15): 2297–2304. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.hmg.a018921.
- Behrens, Kira, Ioanna Triviai, Maike Schwieger, Nilgün Tekin, Malik Alawi, Michael Spohn, Daniela Indenbirken, et al. 2016. "Runx1 Downregulates Stem Cell and Megakaryocytic Transcription Programs That Support Niche Interactions." *Blood* 127 (26): 3369–81. https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-668129.
- Bendall, L. J., K. F. Bradstock, and D. J. Gottlieb. 2000. "Expression of CD44 Variant Exons in Acute Myeloid Leukemia Is More Common and More Complex than That Observed in Normal Blood, Bone Marrow or CD34+ Cells." *Leukemia* 14 (7): 1239–46. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401830.
- Bendall, L. J., K. Kortlepel, and D. J. Gottlieb. 1993. "Human Acute Myeloid Leukemia Cells Bind to Bone Marrow Stroma via a Combination of Beta-1 and Beta-2 Integrin Mechanisms." *Blood* 82 (10): 3125–32.

- Benoit, Yannick D., Ryan R. Mitchell, Ruth M. Risueño, Luca Orlando, Borko Tanasijevic, Allison L. Boyd, Lili Aslostovar, et al. 2017. "Sam68 Allows Selective Targeting of Human Cancer Stem Cells." *Cell Chemical Biology* 24 (7): 833-844.e9. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.026.
- Berget, S. M., C. Moore, and P. A. Sharp. 1977. "Spliced Segments at the 5' Terminus of Adenovirus 2 Late MRNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (8): 3171–75. https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3171.
- Bernt, Kathrin M., Nan Zhu, Amit U. Sinha, Sridhar Vempati, Joerg Faber, Andrei V. Krivtsov, Zhaohui Feng, et al. 2011. "MLL-Rearranged Leukemia Is Dependent on Aberrant H3K79 Methylation by DOT1L." *Cancer Cell* 20 (1): 66–78. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.010.
- Bhatia, M., D. Bonnet, U. Kapp, J. C. Wang, B. Murdoch, and J. E. Dick. 1997. "Quantitative Analysis Reveals Expansion of Human Hematopoietic Repopulating Cells after Short-Term Ex Vivo Culture." *The Journal of Experimental Medicine* 186 (4): 619–24. https://doi.org/10.1084/jem.186.4.619.
- Bindels, Eric M. J., Marije Havermans, Sanne Lugthart, Claudia Erpelinck, Elizabeth Wocjtowicz, Andrei V. Krivtsov, Elwin Rombouts, et al. 2012. "EVI1 Is Critical for the Pathogenesis of a Subset of MLL-AF9-Rearranged AMLs." *Blood* 119 (24): 5838–49. https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-393827.
- Boer, Jasper de, Adam Williams, George Skavdis, Nicola Harker, Mark Coles, Mauro Tolaini, Trisha Norton, et al. 2003. "Transgenic Mice with Hematopoietic and Lymphoid Specific Expression of Cre." *European Journal of Immunology* 33 (2): 314–25. https://doi.org/10.1002/immu.200310005.
- Bonin, Malte von, Katharina Moll, Michael Kramer, Uta Oelschlägel, Martin Wermke, Christoph Röllig, Christian Thiede, et al. 2018. "JAM-C Expression as a Biomarker to Predict Outcome of Patients with Acute Myeloid Leukemia-Letter." *Cancer Research* 78 (21): 6339–41. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0642.
- Bonnet, D., and J. E. Dick. 1997. "Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell." *Nature Medicine* 3 (7): 730–37. https://doi.org/10.1038/nm0797-730.
- Brignatz, C., M. P. Paronetto, S. Opi, M. Cappellari, S. Audebert, V. Feuillet, G. Bismuth, et al. 2009. "Alternative Splicing Modulates Autoinhibition and SH3 Accessibility in the Src Kinase Fyn." *Molecular and Cellular Biology* 29 (24): 6438–48. https://doi.org/10.1128/MCB.00398-09.
- Bromberg, Olga, Benjamin J. Frisch, Jonathan M. Weber, Rebecca L. Porter, Roberto Civitelli, and Laura M. Calvi. 2012. "Osteoblastic N-Cadherin Is Not Required for Microenvironmental Support and Regulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells." *Blood* 120 (2): 303–13. https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-377853.
- Broudy, V. C. 1997. "Stem Cell Factor and Hematopoiesis." Blood 90 (4): 1345-64.
- Brown, D., S. Kogan, E. Lagasse, I. Weissman, M. Alcalay, P. G. Pelicci, S. Atwater, and J. M. Bishop. 1997. "A PMLRARalpha Transgene Initiates Murine Acute Promyelocytic Leukemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (6): 2551–56. https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2551.
- Bruijn, Marella de, and Elaine Dzierzak. 2017. "Runx Transcription Factors in the Development and Function of the Definitive Hematopoietic System." *Blood* 129 (15): 2061–69. https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-689109.

- Buckanovich, R. J., Y. Y. Yang, and R. B. Darnell. 1996. "The Onconeural Antigen Nova-1 Is a Neuron-Specific RNA-Binding Protein, the Activity of Which Is Inhibited by Paraneoplastic Antibodies." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (3): 1114–22.
- Bungartz, Gerd, Sebastian Stiller, Martina Bauer, Werner Müller, Angela Schippers, Norbert Wagner, Reinhard Fässler, and Cord Brakebusch. 2006. "Adult Murine Hematopoiesis Can Proceed without Beta1 and Beta7 Integrins." *Blood* 108 (6): 1857–64. https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-007658.
- Calabretta, Bruno, and Danilo Perrotti. 2004. "The Biology of CML Blast Crisis." *Blood* 103 (11): 4010–22. https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4111.
- Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, et al. 2003. "Osteoblastic Cells Regulate the Haematopoietic Stem Cell Niche." *Nature* 425 (6960): 841–46. https://doi.org/10.1038/nature02040.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Timothy J. Ley, Christopher Miller, Li Ding, Benjamin J. Raphael, Andrew J. Mungall, A. Gordon Robertson, et al. 2013. "Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 368 (22): 2059–74. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1301689.
- Cantor, Joseph, Cecille D. Browne, Raphael Ruppert, Chloé C. Féral, Reinhard Fässler, Robert C. Rickert, and Mark H. Ginsberg. 2009. "CD98hc Facilitates B Cell Proliferation and Adaptive Humoral Immunity." *Nature Immunology* 10 (4): 412–19. https://doi.org/10.1038/ni.1712.
- Cardier, J. E., and E. Barberá-Guillem. 1997. "Extramedullary Hematopoiesis in the Adult Mouse Liver Is Associated with Specific Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 26 (1): 165–75. https://doi.org/10.1002/hep.510260122.
- Cartier-Michaud, Amandine, Anne-Laure Bailly, Stéphane Betzi, Xiaoli Shi, Jean-Claude Lissitzky, Ana Zarubica, Arnauld Sergé, et al. 2017. "Genetic, Structural, and Chemical Insights into the Dual Function of GRASP55 in Germ Cell Golgi Remodeling and JAM-C Polarized Localization during Spermatogenesis." *PLoS Genetics* 13 (6): e1006803. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006803.
- Cera, Maria Rosaria, Annalisa Del Prete, Annunciata Vecchi, Monica Corada, Ines Martin-Padura, Toshiyuki Motoike, Paolo Tonetti, et al. 2004. "Increased DC Trafficking to Lymph Nodes and Contact Hypersensitivity in Junctional Adhesion Molecule-A-Deficient Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 114 (5): 729– 38. https://doi.org/10.1172/JCI21231.
- Challen, Grant A., Deqiang Sun, Mira Jeong, Min Luo, Jaroslav Jelinek, Jonathan S. Berg, Christoph Bock, et al. 2011. "Dnmt3a Is Essential for Hematopoietic Stem Cell Differentiation." *Nature Genetics* 44 (1): 23–31. https://doi.org/10.1038/ng.1009.
- Chavakis, Triantafyllos, Tanja Keiper, Rachel Matz-Westphal, Karin Hersemeyer, Ulrich J. Sachs, Peter P. Nawroth, Klaus T. Preissner, and Sentot Santoso. 2004. "The Junctional Adhesion Molecule-C Promotes Neutrophil Transendothelial Migration in Vitro and in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (53): 55602–8. https://doi.org/10.1074/jbc.M404676200.
- Chen, Jiahao, Yun-Ruei Kao, Daqian Sun, Tihomira I. Todorova, David Reynolds, Swathi-Rao Narayanagari, Cristina Montagna, Britta Will, Amit Verma, and Ulrich Steidl. 2019. "Myelodysplastic Syndrome Progression to Acute Myeloid Leukemia at the Stem Cell Level." *Nature Medicine* 25 (1): 103–10. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0267-4.

- Chen, Weili, Ashish R. Kumar, Wendy A. Hudson, Quanzhi Li, Baolin Wu, Rodney A. Staggs, Erik A. Lund, Thien N. Sam, and John H. Kersey. 2008. "Malignant Transformation Initiated by MII-AF9: Gene Dosage and Critical Target Cells." *Cancer Cell* 13 (5): 432–40. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.03.005.
- Cheng, Hui, Zhaofeng Zheng, and Tao Cheng. 2020. "New Paradigms on Hematopoietic Stem Cell Differentiation." *Protein & Cell* 11 (1): 34–44. https://doi.org/10.1007/s13238-019-0633-0.
- Chitteti, Brahmananda Reddy, Michihiro Kobayashi, Yinghua Cheng, Huajia Zhang, Bradley A. Poteat, Hal E. Broxmeyer, Louis M. Pelus, et al. 2014. "CD166 Regulates Human and Murine Hematopoietic Stem Cells and the Hematopoietic Niche." *Blood* 124 (4): 519–29. https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-565721.
- Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker, and R. J. Roberts. 1977. "An Amazing Sequence Arrangement at the 5' Ends of Adenovirus 2 Messenger RNA." *Cell* 12 (1): 1–8. https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90180-5.
- Christensen, J. L., and I. L. Weissman. 2001. "Flk-2 Is a Marker in Hematopoietic Stem Cell Differentiation: A Simple Method to Isolate Long-Term Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (25): 14541–46. https://doi.org/10.1073/pnas.261562798.
- Chu, M. Y., and G. A. Fischer. 1962. "A Proposed Mechanism of Action of 1-Beta-D-Arabinofuranosyl-Cytosine as an Inhibitor of the Growth of Leukemic Cells." *Biochemical Pharmacology* 11 (June): 423–30. https://doi.org/10.1016/0006-2952(62)90225-3.
- Chung, Stephen S., William S. Eng, Wenhuo Hu, Mona Khalaj, Francine E. Garrett-Bakelman, Montreh Tavakkoli, Ross L. Levine, et al. 2017. "CD99 Is a Therapeutic Target on Disease Stem Cells in Myeloid Malignancies." *Science Translational Medicine* 9 (374). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj2025.
- Clift, Ian C., Adebowale O. Bamidele, Christie Rodriguez-Ramirez, Kimberly N. Kremer, and Karen E. Hedin. 2014. "β-Arrestin1 and Distinct CXCR4 Structures Are Required for Stromal Derived Factor-1 to Downregulate CXCR4 Cell-Surface Levels in Neuroblastoma." *Molecular Pharmacology* 85 (4): 542–52. https://doi.org/10.1124/mol.113.089714.
- Collins, E. C., R. Pannell, E. M. Simpson, A. Forster, and T. H. Rabbitts. 2000. "Inter-Chromosomal Recombination of MII and Af9 Genes Mediated by Cre-LoxP in Mouse Development." *EMBO Reports* 1 (2): 127–32. https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvd021.
- Colom, Bartomeu, Yannick Poitelon, Wenlong Huang, Abigail Woodfin, Sharon Averill, Ubaldo Del Carro, Desirée Zambroni, et al. 2012. "Schwann Cell-Specific JAM-C-Deficient Mice Reveal Novel Expression and Functions for JAM-C in Peripheral Nerves." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (3): 1064–76. https://doi.org/10.1096/fj.11-196220.
- Cook, Wendy D., Benjamin J. McCaw, Christopher Herring, Deborah L. John, Simon J. Foote, Stephen L. Nutt, and Jerry M. Adams. 2004. "PU.1 Is a Suppressor of Myeloid Leukemia, Inactivated in Mice by Gene Deletion and Mutation of Its DNA Binding Domain." *Blood* 104 (12): 3437–44. https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2234.
- Corral, J., I. Lavenir, H. Impey, A. J. Warren, A. Forster, T. A. Larson, S. Bell, A. N. McKenzie, G. King, and T. H. Rabbitts. 1996. "An MII-AF9 Fusion Gene Made by Homologous Recombination Causes Acute Leukemia in Chimeric Mice: A

Method to Create Fusion Oncogenes." *Cell* 85 (6): 853–61. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81269-6.

- Cory, S. 1986. "Activation of Cellular Oncogenes in Hemopoietic Cells by Chromosome Translocation." *Advances in Cancer Research* 47: 189–234. https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60200-6.
- Crews, Leslie A., Larisa Balaian, Nathaniel P. Delos Santos, Heather S. Leu, Angela C. Court, Elisa Lazzari, Anil Sadarangani, et al. 2016. "RNA Splicing Modulation Selectively Impairs Leukemia Stem Cell Maintenance in Secondary Human AML." *Cell Stem Cell* 19 (5): 599–612. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.003.
- Cunningham, Sonia A., Jose M. Rodriguez, M. Pia Arrate, Tuan M. Tran, and Tommy A. Brock. 2002. "JAM2 Interacts with Alpha4beta1. Facilitation by JAM3." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (31): 27589–92. https://doi.org/10.1074/jbc.C200331200.
- Czabanka, Marcus, Lucia Lisa Petrilli, Susanne Elvers-Hornung, Karen Bieback, Beat Albert Imhof, Peter Vajkoczy, and Maria Vinci. 2020. "Junctional Adhesion Molecule-C Mediates the Recruitment of Embryonic-Endothelial Progenitor Cells to the Perivascular Niche during Tumor Angiogenesis." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (4). https://doi.org/10.3390/ijms21041209.
- Czechowicz, Agnieszka, Daniel Kraft, Irving L. Weissman, and Deepta Bhattacharya. 2007. "Efficient Transplantation via Antibody-Based Clearance of Hematopoietic Stem Cell Niches." *Science (New York, N.Y.)* 318 (5854): 1296– 99. https://doi.org/10.1126/science.1149726.
- Dacquin, Romain, Michael Starbuck, Thorsten Schinke, and Gérard Karsenty. 2002. "Mouse Alpha1(I)-Collagen Promoter Is the Best Known Promoter to Drive Efficient Cre Recombinase Expression in Osteoblast." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 224 (2): 245–51. https://doi.org/10.1002/dvdy.10100.
- Dalla-Favera, R., M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R. C. Gallo, and C. M. Croce. 1982. "Human C-Myc Onc Gene Is Located on the Region of Chromosome 8 That Is Translocated in Burkitt Lymphoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (24): 7824–27. https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7824.
- Dam, G. B. ten, C. F. Zilch, D. Wallace, B. Wieringa, P. C. Beverley, L. G. Poels, and G. R. Screaton. 2000. "Regulation of Alternative Splicing of CD45 by Antagonistic Effects of SR Protein Splicing Factors." *Journal of Immunology* (*Baltimore, Md.: 1950*) 164 (10): 5287–95. https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5287.
- Dausset, J. 1958. "[Iso-leuko-antibodies]." Acta Haematologica 20 (1–4): 156–66. https://doi.org/10.1159/000205478.
- De Grandis, Maria, Florence Bardin, Cyril Fauriat, Christophe Zemmour, Abdessamad El-Kaoutari, Arnauld Sergé, Samuel Granjeaud, et al. 2017. "JAM-C Identifies Src Family Kinase-Activated Leukemia-Initiating Cells and Predicts Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia." *Cancer Research* 77 (23): 6627–40. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1223.
- De Grandis, Maria, Anne-Catherine Lhoumeau, Stéphane J. C. Mancini, and Michel Aurrand-Lions. 2016. "Adhesion Receptors Involved in HSC and Early-B Cell Interactions with Bone Marrow Microenvironment." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (4): 687–703. https://doi.org/10.1007/s00018-015-2064-2.

- Delgado, M. Dolores, Marta Albajar, M. Teresa Gomez-Casares, Ana Batlle, and Javier León. 2013. "MYC Oncogene in Myeloid Neoplasias." *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 15 (2): 87–94. https://doi.org/10.1007/s12094-012-0926-8.
- Desai, Pinkal, Nuria Mencia-Trinchant, Oleksandr Savenkov, Michael S. Simon, Gloria Cheang, Sangmin Lee, Michael Samuel, et al. 2018. "Somatic Mutations Precede Acute Myeloid Leukemia Years before Diagnosis." *Nature Medicine* 24 (7): 1015–23. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0081-z.
- Deshpande, Aniruddha J., Liying Chen, Maurizio Fazio, Amit U. Sinha, Kathrin M. Bernt, Deepti Banka, Stuart Dias, et al. 2013. "Leukemic Transformation by the MLL-AF6 Fusion Oncogene Requires the H3K79 Methyltransferase Dot1l." *Blood* 121 (13): 2533–41. https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-465120.
- Despeaux, Mathieu, Gaëtan Chicanne, Evelyne Rouer, Fabienne De Toni-Costes, Jessica Bertrand, Véronique Mansat-De Mas, Nathalie Vergnolle, et al. 2012. "Focal Adhesion Kinase Splice Variants Maintain Primitive Acute Myeloid Leukemia Cells through Altered Wnt Signaling." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 30 (8): 1597–1610. https://doi.org/10.1002/stem.1157.
- Dibner, Charna, Ueli Schibler, and Urs Albrecht. 2010. "The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks." *Annual Review of Physiology* 72: 517–49. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821.
- DiNardo, Courtney D., and Jorge E. Cortes. 2016. "Mutations in AML: Prognostic and Therapeutic Implications." *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2016 (1): 348–55. https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.348.
- DiNardo, Courtney D., Keith Pratz, Vinod Pullarkat, Brian A. Jonas, Martha Arellano, Pamela S. Becker, Olga Frankfurt, et al. 2019. "Venetoclax Combined with Decitabine or Azacitidine in Treatment-Naive, Elderly Patients with Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 133 (1): 7–17. https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-868752.
- DiNardo, Courtney D., Anthony S. Stein, Eytan M. Stein, Amir T. Fathi, Olga Frankfurt, Andre C. Schuh, Hartmut Döhner, et al. 2021. "Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 Inhibitor Ivosidenib in Combination With Azacitidine for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 39 (1): 57–65. https://doi.org/10.1200/JCO.20.01632.
- DiNardo, Courtney D., Eytan M. Stein, Stéphane de Botton, Gail J. Roboz, Jessica K. Altman, Alice S. Mims, Ronan Swords, et al. 2018. "Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML." *The New England Journal of Medicine* 378 (25): 2386–98. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716984.
- Ding, Lei, and Sean J. Morrison. 2013. "Haematopoietic Stem Cells and Early Lymphoid Progenitors Occupy Distinct Bone Marrow Niches." *Nature* 495 (7440): 231–35. https://doi.org/10.1038/nature11885.
- Ding, Lei, Thomas L. Saunders, Grigori Enikolopov, and Sean J. Morrison. 2012. "Endothelial and Perivascular Cells Maintain Haematopoietic Stem Cells." *Nature* 481 (7382): 457–62. https://doi.org/10.1038/nature10783.
- DiPersio, John F., Ivana N. Micallef, Patrick J. Stiff, Brian J. Bolwell, Richard T. Maziarz, Eric Jacobsen, Auayporn Nademanee, et al. 2009. "Phase III

Prospective Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Plerixafor plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor Compared with Placebo plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Autologous Stem-Cell Mobilization and Transplantation for Patients with Non-Hodgkin's Lymphoma." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (28): 4767–73. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.7209.

- Döhner, Hartmut, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, et al. 2017. "Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel." *Blood* 129 (4): 424–47. https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196.
- Dombret, Hervé, and Claude Gardin. 2016. "An Update of Current Treatments for Adult Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 127 (1): 53–61. https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-604520.
- Dombret, Hervé, John F. Seymour, Aleksandra Butrym, Agnieszka Wierzbowska, Dominik Selleslag, Jun Ho Jang, Rajat Kumar, et al. 2015. "International Phase 3 Study of Azacitidine vs Conventional Care Regimens in Older Patients with Newly Diagnosed AML with >30% Blasts." *Blood* 126 (3): 291–99. https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-621664.
- Domen, J., and I. L. Weissman. 2000. "Hematopoietic Stem Cells Need Two Signals to Prevent Apoptosis; BCL-2 Can Provide One of These, Kitl/c-Kit Signaling the Other." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (12): 1707–18. https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1707.
- Dovey, Oliver M., Jonathan L. Cooper, Annalisa Mupo, Carolyn S. Grove, Claire Lynn, Nathalie Conte, Robert M. Andrews, et al. 2017. "Molecular Synergy Underlies the Co-Occurrence Patterns and Phenotype of NPM1-Mutant Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 130 (17): 1911–22. https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-760595.
- Draper, Julia E., Patrycja Sroczynska, Hui Sun Leong, Muhammad Z. H. Fadlullah, Crispin Miller, Valerie Kouskoff, and Georges Lacaud. 2017. "Mouse RUNX1C Regulates Premegakaryocytic/Erythroid Output and Maintains Survival of Megakaryocyte Progenitors." *Blood* 130 (3): 271–84. https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-723635.
- Draper, Julia E., Patrycja Sroczynska, Olga Tsoulaki, Hui Sun Leong, Muhammad Z. H. Fadlullah, Crispin Miller, Valerie Kouskoff, and Georges Lacaud. 2016. "RUNX1B Expression ls Highly Heterogeneous and Distinguishes Megakaryocytic and Erythroid Lineage Fate in Adult Mouse Hematopoiesis." PLoS (1): Genetics 12 e1005814. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005814.
- Drynan, Lesley F., Richard Pannell, Alan Forster, Nicole M. M. Chan, Florencia Cano, Angelika Daser, and Terence H. Rabbitts. 2005. "Mll Fusions Generated by Cre-LoxP-Mediated de Novo Translocations Can Induce Lineage Reassignment in Tumorigenesis." *The EMBO Journal* 24 (17): 3136–46. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600760.
- Dujardin, Gwendal, Élisabeth Daguenet, Delphine G. Bernard, Marion Flodrops, Stéphanie Durand, Aurélie Chauveau, Flaria El Khoury, Catherine Le Jossic-Corcos, and Laurent Corcos. 2016. "[Pre-mRNA splicing: when the spliceosome loses ground]." *Medecine Sciences: M/S* 32 (12): 1103–10. https://doi.org/10.1051/medsci/20163212014.

- Dulaney, A. D., M. Maxey, M. G. Schillig, and M. F. Goss. 1957. "Neoplasms in C3H Mice Which Received AK-Leukemic Extracts When Newborn." *Cancer Research* 17 (8): 809–14.
- Dustin, M. L., and T. A. Springer. 1988. "Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 (LFA-1) Interaction with Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Is One of at Least Three Mechanisms for Lymphocyte Adhesion to Cultured Endothelial Cells." *The Journal of Cell Biology* 107 (1): 321–31. https://doi.org/10.1083/jcb.107.1.321.
- Dykstra, Brad, David Kent, Michelle Bowie, Lindsay McCaffrey, Melisa Hamilton, Kristin Lyons, Shang-Jung Lee, Ryan Brinkman, and Connie Eaves. 2007. "Long-Term Propagation of Distinct Hematopoietic Differentiation Programs in Vivo." *Cell Stem Cell* 1 (2): 218–29. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.015.
- Dziennis, S., R. A. Van Etten, H. L. Pahl, D. L. Morris, T. L. Rothstein, C. M. Blosch, R. M. Perlmutter, and D. G. Tenen. 1995. "The CD11b Promoter Directs High-Level Expression of Reporter Genes in Macrophages in Transgenic Mice." *Blood* 85 (2): 319–29.
- Ebnet, K., C. U. Schulz, M. K. Meyer Zu Brickwedde, G. G. Pendl, and D. Vestweber. 2000. "Junctional Adhesion Molecule Interacts with the PDZ Domain-Containing Proteins AF-6 and ZO-1." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 27979– 88. https://doi.org/10.1074/jbc.M002363200.
- Ebnet, Klaus, Michel Aurrand-Lions, Annegret Kuhn, Friedemann Kiefer, Stefan Butz, Kerstin Zander, Maria-Katharina Meyer zu Brickwedde, Atsushi Suzuki, Beat A. Imhof, and Dietmar Vestweber. 2003. "The Junctional Adhesion Molecule (JAM) Family Members JAM-2 and JAM-3 Associate with the Cell Polarity Protein PAR-3: A Possible Role for JAMs in Endothelial Cell Polarity." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 19): 3879–91. https://doi.org/10.1242/jcs.00704.
- Ehninger, A., M. Kramer, C. Röllig, C. Thiede, M. Bornhäuser, M. von Bonin, M. Wermke, et al. 2014. "Distribution and Levels of Cell Surface Expression of CD33 and CD123 in Acute Myeloid Leukemia." *Blood Cancer Journal* 4 (June): e218. https://doi.org/10.1038/bcj.2014.39.
- Ema, Hideo, Yohei Morita, and Toshio Suda. 2014. "Heterogeneity and Hierarchy of Hematopoietic Stem Cells." *Experimental Hematology* 42 (2): 74-82.e2. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2013.11.004.
- Eppert, Kolja, Katsuto Takenaka, Eric R. Lechman, Levi Waldron, Björn Nilsson, Peter van Galen, Klaus H. Metzeler, et al. 2011. "Stem Cell Gene Expression Programs Influence Clinical Outcome in Human Leukemia." *Nature Medicine* 17 (9): 1086–93. https://doi.org/10.1038/nm.2415.
- Erpenbeck, Luise, Simone Rubant, Katja Hardt, Sentot Santoso, Wolf-Henning Boehncke, Michael P. Schön, and Ralf J. Ludwig. 2010. "Constitutive and Functionally Relevant Expression of JAM-C on Platelets." *Thrombosis and Haemostasis* 103 (4): 857–59. https://doi.org/10.1160/TH09-08-0572.
- Esterházy, Daria, Ina Stützer, Haiyan Wang, Markus P. Rechsteiner, Jeremy Beauchamp, Heinz Döbeli, Hans Hilpert, et al. 2011. "Bace2 Is a β Cell-Enriched Protease That Regulates Pancreatic β Cell Function and Mass." *Cell Metabolism* 14 (3): 365–77. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.018.
- Estey, Elihu H. 2018. "Acute Myeloid Leukemia: 2019 Update on Risk-Stratification and Management." *American Journal of Hematology* 93 (10): 1267–91. https://doi.org/10.1002/ajh.25214.
- Farzan, M., C. E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung, and H. Choe. 2000. "BACE2, a Beta -Secretase Homolog, Cleaves at the Beta Site and within the Amyloid-Beta

Region of the Amyloid-Beta Precursor Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17): 9712–17. https://doi.org/10.1073/pnas.160115697.

- Fazekas de St Groth, null. 1982. "The Evaluation of Limiting Dilution Assays." *Journal of Immunological Methods* 49 (2): R11-23. https://doi.org/10.1016/0022-1759(82)90269-1.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, and P. Chambon. 1996. "Ligand-Activated Site-Specific Recombination in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20): 10887– 90. https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10887.
- Feller, N., M. A. van der Pol, A. van Stijn, G. W. D. Weijers, A. H. Westra, B. W. Evertse, G. J. Ossenkoppele, and G. J. Schuurhuis. 2004. "MRD Parameters Using Immunophenotypic Detection Methods Are Highly Reliable in Predicting Survival in Acute Myeloid Leukaemia." *Leukemia* 18 (8): 1380–90. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403405.
- Féral, Chloé C., Andries Zijlstra, Eugene Tkachenko, Gerald Prager, Margaret L. Gardel, Marina Slepak, and Mark H. Ginsberg. 2007. "CD98hc (SLC3A2) Participates in Fibronectin Matrix Assembly by Mediating Integrin Signaling." *The Journal of Cell Biology* 178 (4): 701–11. https://doi.org/10.1083/jcb.200705090.
- Figueroa, Maria E., Omar Abdel-Wahab, Chao Lu, Patrick S. Ward, Jay Patel, Alan Shih, Yushan Li, et al. 2010. "Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Disrupt Hypermethylation Phenotype, TET2 Function, and Impair 553-67. Hematopoietic Differentiation." Cancer Cell 18 (6): https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.015.
- Ford, C. E., J. L. Hamerton, D. W. Barnes, and J. F. Loutit. 1956. "Cytological Identification of Radiation-Chimaeras." *Nature* 177 (4506): 452–54. https://doi.org/10.1038/177452a0.
- Forster, Alan, Richard Pannell, Lesley F. Drynan, Matthew McCormack, Emma C. Collins, Angelika Daser, and Terence H. Rabbitts. 2003. "Engineering de Novo Reciprocal Chromosomal Translocations Associated with Mll to Replicate Primary Events of Human Cancer." *Cancer Cell* 3 (5): 449–58. https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00106-5.
- Frenette, P. S., T. N. Mayadas, H. Rayburn, R. O. Hynes, and D. D. Wagner. 1996. "Susceptibility to Infection and Altered Hematopoiesis in Mice Deficient in Both P- and E-Selectins." *Cell* 84 (4): 563–74. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81032-6.
- Frenette, P. S., S. Subbarao, I. B. Mazo, U. H. von Andrian, and D. D. Wagner. 1998. "Endothelial Selectins and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Promote Hematopoietic Progenitor Homing to Bone Marrow." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (24): 14423– 28. https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14423.
- Friend, C. 1957. "Cell-Free Transmission in Adult Swiss Mice of a Disease Having the Character of a Leukemia." *The Journal of Experimental Medicine* 105 (4): 307– 18. https://doi.org/10.1084/jem.105.4.307.
- Frisch, Benjamin J., John M. Ashton, Lianping Xing, Michael W. Becker, Craig T. Jordan, and Laura M. Calvi. 2012. "Functional Inhibition of Osteoblastic Cells in an in Vivo Mouse Model of Myeloid Leukemia." *Blood* 119 (2): 540–50. https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348151.

- Fu, Kai, Xin Sun, Eric M. Wier, Andrea Hodgson, Ryan P. Hobbs, and Fengyi Wan. 2016. "Sam68/KHDRBS1-Dependent NF-KB Activation Confers Radioprotection to the Colon Epithelium in γ-Irradiated Mice." *ELife* 5 (December). https://doi.org/10.7554/eLife.21957.
- Furth, P. A., L. St Onge, H. Böger, P. Gruss, M. Gossen, A. Kistner, H. Bujard, and L. Hennighausen. 1994. "Temporal Control of Gene Expression in Transgenic Mice by a Tetracycline-Responsive Promoter." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (20): 9302–6. https://doi.org/10.1073/pnas.91.20.9302.
- Gabut, Mathieu, Payman Samavarchi-Tehrani, Xinchen Wang, Valentina Slobodeniuc, Dave O'Hanlon, Hoon-Ki Sung, Manuel Alvarez, et al. 2011. "An Alternative Splicing Switch Regulates Embryonic Stem Cell Pluripotency and Reprogramming." *Cell* 147 (1): 132–46. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.023.
- Galli, S. J. 1993. "New Concepts about the Mast Cell." *The New England Journal of Medicine* 328 (4): 257–65. https://doi.org/10.1056/NEJM199301283280408.
- Garrido-Urbani, Sarah, Alain Vonlaufen, Jimmy Stalin, Maria De Grandis, Patricia Ropraz, Stéphane Jemelin, Florence Bardin, Holger Scheib, Michel Aurrand-Lions, and Beat A. Imhof. 2018. "Junctional Adhesion Molecule C (JAM-C) Dimerization Aids Cancer Cell Migration and Metastasis." *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1865 (4): 638–49. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.01.008.
- Genovese, Giulio, Anna K. Kähler, Robert E. Handsaker, Johan Lindberg, Samuel A. Rose, Samuel F. Bakhoum, Kimberly Chambert, et al. 2014. "Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence." *The New England Journal of Medicine* 371 (26): 2477–87. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405.
- Georgiades, Pantelis, Sarah Ogilvy, Hélène Duval, Diana R. Licence, D. Stephen Charnock-Jones, Stephen K. Smith, and Cristin G. Print. 2002. "VavCre Transgenic Mice: A Tool for Mutagenesis in Hematopoietic and Endothelial Lineages." *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 34 (4): 251–56. https://doi.org/10.1002/gene.10161.
- Giagounidis, A. a. N., U. Germing, J. S. Wainscoat, J. Boultwood, and C. Aul. 2004. "The 5q- Syndrome." *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 9 (4): 271–77. https://doi.org/10.1080/10245330410001723824.
- Glass, Carolyn, Michael Wilson, Ruby Gonzalez, Yi Zhang, and Archibald S. Perkins. 2014. "The Role of EVI1 in Myeloid Malignancies." *Blood Cells, Molecules & Diseases* 53 (1–2): 67–76. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2014.01.002.
- Gliki, Georgia, Klaus Ebnet, Michel Aurrand-Lions, Beat A. Imhof, and Ralf H. Adams. 2004. "Spermatid Differentiation Requires the Assembly of a Cell Polarity Complex Downstream of Junctional Adhesion Molecule-C." *Nature* 431 (7006): 320–24. https://doi.org/10.1038/nature02877.
- Gong, J. K. 1978. "Endosteal Marrow: A Rich Source of Hematopoietic Stem Cells." *Science* (*New York, N.Y.*) 199 (4336): 1443–45. https://doi.org/10.1126/science.75570.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Müller, W. Hillen, and H. Bujard. 1995. "Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells." *Science (New York, N.Y.)* 268 (5218): 1766–69. https://doi.org/10.1126/science.7792603.
- Göthert, Joachim R., Sonja E. Gustin, Mark A. Hall, Anthony R. Green, Berthold Göttgens, David J. Izon, and C. Glenn Begley. 2005. "In Vivo Fate-Tracing

Studies Using the Scl Stem Cell Enhancer: Embryonic Hematopoietic Stem Cells Significantly Contribute to Adult Hematopoiesis." *Blood* 105 (7): 2724–32. https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3037.

- Graf, Michaela, Susanne Reif, Tanja Kröll, Karin Hecht, Volkmar Nuessler, and Helga Schmetzer. 2006. "Expression of MAC-1 (CD11b) in Acute Myeloid Leukemia (AML) Is Associated with an Unfavorable Prognosis." *American Journal of Hematology* 81 (4): 227–35. https://doi.org/10.1002/ajh.20526.
- Greenbaum, Adam, Yen-Michael S. Hsu, Ryan B. Day, Laura G. Schuettpelz, Matthew J. Christopher, Joshua N. Borgerding, Takashi Nagasawa, and Daniel C. Link. 2013. "CXCL12 in Early Mesenchymal Progenitors Is Required for Haematopoietic Stem-Cell Maintenance." *Nature* 495 (7440): 227–30. https://doi.org/10.1038/nature11926.
- Greenblatt, Sarah, Li Li, Christopher Slape, Bao Nguyen, Rachel Novak, Amy Duffield, David Huso, et al. 2012. "Knock-in of a FLT3/ITD Mutation Cooperates with a NUP98-HOXD13 Fusion to Generate Acute Myeloid Leukemia in a Mouse Model." *Blood* 119 (12): 2883–94. https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-382283.
- Grenier, Julien M. P., Marjorie C. Delahaye, Stéphane J. C. Mancini, and Michel Aurrand-Lions. 2021. "Flow Cytometry Analysis of Mouse Hematopoietic Stem and Multipotent Progenitor Cells." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2308: 73–81. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1425-9_6.
- Grisolano, J. L., R. L. Wesselschmidt, P. G. Pelicci, and T. J. Ley. 1997. "Altered Myeloid Development and Acute Leukemia in Transgenic Mice Expressing PML-RAR Alpha under Control of Cathepsin G Regulatory Sequences." *Blood* 89 (2): 376–87.
- Gros, F., H. Hiatt, W. Gilbert, C. G. Kurland, R. W. Risebrough, and J. D. Watson. 1961. "Unstable Ribonucleic Acid Revealed by Pulse Labelling of Escherichia Coli." *Nature* 190 (May): 581–85. https://doi.org/10.1038/190581a0.
- Gross, L. 1951. "Spontaneous' Leukemia Developing in C3H Mice Following Inoculation in Infancy, with AK-Leukemic Extracts, or AK-Embrvos." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 76 (1): 27–32.
- ———. 1953. "Neck Tumors, or Leukemia, Developing in Adult C3H Mice Following Inoculation, in Early Infancy, with Filtered (Berkefeld N), or Centrifugated (144,000 X g), Ak-Leukemic Extracts." *Cancer* 6 (5): 948–58. https://doi.org/10.1002/1097-0142(195309)6:5<948::aidcncr2820060513>3.0.co;2-j.
- Grossmann, V., A. Kohlmann, M. Zenger, S. Schindela, C. Eder, S. Weissmann, S. Schnittger, et al. 2011. "A Deep-Sequencing Study of Chronic Myeloid Leukemia Patients in Blast Crisis (BC-CML) Detects Mutations in 76.9% of Cases." *Leukemia* 25 (3): 557–60. https://doi.org/10.1038/leu.2010.298.
- Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann, and K. Rajewsky. 1994. "Deletion of a DNA Polymerase Beta Gene Segment in T Cells Using Cell Type-Specific Gene Targeting." *Science (New York, N.Y.)* 265 (5168): 103–6. https://doi.org/10.1126/science.8016642.
- Hamazaki, Yoko, Masahiko Itoh, Hiroyuki Sasaki, Mikio Furuse, and Shoichiro Tsukita. 2002. "Multi-PDZ Domain Protein 1 (MUPP1) Is Concentrated at Tight Junctions through Its Possible Interaction with Claudin-1 and Junctional Adhesion Molecule." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (1): 455–61. https://doi.org/10.1074/jbc.M109005200.

- Hamidi, Sofiane, and Guojun Sheng. 2018. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Haematopoietic Stem Cell Development and Homeostasis." *Journal of Biochemistry* 164 (4): 265–75. https://doi.org/10.1093/jb/mvy063.
- Han, Hong, Manuel Irimia, P. Joel Ross, Hoon-Ki Sung, Babak Alipanahi, Laurent David, Azadeh Golipour, et al. 2013. "MBNL Proteins Repress ES-Cell-Specific Alternative Splicing and Reprogramming." *Nature* 498 (7453): 241–45. https://doi.org/10.1038/nature12270.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57– 70. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hanekamp, Diana, Jacqueline Cloos, and Gerrit Jan Schuurhuis. 2017. "Leukemic Stem Cells: Identification and Clinical Application." *International Journal of Hematology* 105 (5): 549–57. https://doi.org/10.1007/s12185-017-2221-5.
- Haran-Ghera, N., M. Kotler, and A. Meshorer. 1967. "Studies on Leukemia Development in the SJL/J Strain of Mice." *Journal of the National Cancer Institute* 39 (4): 653–61.
- Hatta, K., A. Nose, A. Nagafuchi, and M. Takeichi. 1988. "Cloning and Expression of CDNA Encoding a Neural Calcium-Dependent Cell Adhesion Molecule: Its Identity in the Cadherin Gene Family." *The Journal of Cell Biology* 106 (3): 873– 81. https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.873.
- Haug, Jeffrey S., Xi C. He, Justin C. Grindley, Joshua P. Wunderlich, Karin Gaudenz, Jason T. Ross, Ariel Paulson, et al. 2008. "N-Cadherin Expression Level Distinguishes Reserved versus Primed States of Hematopoietic Stem Cells." *Cell Stem Cell* 2 (4): 367–79. https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.01.017.
- Hayata, I., T. Ishihara, K. Hirashima, T. Sado, and J. Yamagiwa. 1979. "Partial Deletion of Chromosome No. 2 in Myelocytic Leukemias of Irradiated C3H/He and RFM Mice." *Journal of the National Cancer Institute* 63 (3): 843–48. https://doi.org/10.1093/jnci/63.3.843.
- Haynes, B. F., M. E. Hemler, D. L. Mann, G. S. Eisenbarth, J. Shelhamer, H. S. Mostowski, C. A. Thomas, J. L. Strominger, and A. S. Fauci. 1981.
 "Characterization of a Monoclonal Antibody (4F2) That Binds to Human Monocytes and to a Subset of Activated Lymphocytes." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 126 (4): 1409–14.
- He, Wenyan, Stephan Holtkamp, Sophia Martina Hergenhan, Kerstin Kraus, Alba de Juan, Jasmin Weber, Paul Bradfield, et al. 2018. "Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures That Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues." *Immunity* 49 (6): 1175-1190.e7. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.007.
- Heaney, M. L., and D. W. Golde. 1999. "Myelodysplasia." *The New England Journal of Medicine* 340 (21): 1649–60. https://doi.org/10.1056/NEJM199905273402107.
- Heckl, Dirk, Monika S. Kowalczyk, David Yudovich, Roger Belizaire, Rishi V. Puram, Marie E. McConkey, Anne Thielke, Jon C. Aster, Aviv Regev, and Benjamin L. Ebert. 2014. "Generation of Mouse Models of Myeloid Malignancy with Combinatorial Genetic Lesions Using CRISPR-Cas9 Genome Editing." *Nature Biotechnology* 32 (9): 941–46. https://doi.org/10.1038/nbt.2951.
- Hills, Robert K., Sylvie Castaigne, Frederick R. Appelbaum, Jacques Delaunay, Stephen Petersdorf, Megan Othus, Elihu H. Estey, et al. 2014. "Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Induction Chemotherapy in Adult Patients with Acute Myeloid Leukaemia: A Meta-Analysis of Individual Patient Data from

Randomised Controlled Trials." *The Lancet. Oncology* 15 (9): 986–96. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70281-5.

- Holm, Frida, Eva Hellqvist, Cayla N. Mason, Shawn A. Ali, Nathaniel Delos-Santos, Christian L. Barrett, Hye-Jung Chun, et al. 2015. "Reversion to an Embryonic Alternative Splicing Program Enhances Leukemia Stem Cell Self-Renewal." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (50): 15444–49. https://doi.org/10.1073/pnas.1506943112.
- Hong, D. S., R. Kurzrock, A. Naing, J. J. Wheler, G. S. Falchook, J. S. Schiffman, N. Faulkner, M. J. Pilat, J. O'Brien, and P. LoRusso. 2014. "A Phase I, Open-Label, Single-Arm, Dose-Escalation Study of E7107, a Precursor Messenger Ribonucleic Acid (Pre-MRNA) Splicesome Inhibitor Administered Intravenously on Days 1 and 8 Every 21 Days to Patients with Solid Tumors." *Investigational New Drugs* 32 (3): 436–44. https://doi.org/10.1007/s10637-013-0046-5.
- Hosen, Naoki, Christopher Y. Park, Naoya Tatsumi, Yusuke Oji, Haruo Sugiyama, Martin Gramatzki, Alan M. Krensky, and Irving L. Weissman. 2007. "CD96 Is a Leukemic Stem Cell-Specific Marker in Human Acute Myeloid Leukemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (26): 11008–13. https://doi.org/10.1073/pnas.0704271104.
- Hosokawa, Kentaro, Fumio Arai, Hiroki Yoshihara, Hiroko Iwasaki, Yuka Nakamura, Yumiko Gomei, and Toshio Suda. 2010. "Knockdown of N-Cadherin Suppresses the Long-Term Engraftment of Hematopoietic Stem Cells." *Blood* 116 (4): 554–63. https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-224857.
- Hu, Yifang, and Gordon K. Smyth. 2009. "ELDA: Extreme Limiting Dilution Analysis for Comparing Depleted and Enriched Populations in Stem Cell and Other Assays." *Journal of Immunological Methods* 347 (1–2): 70–78. https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.008.
- Hynes, R. O. 1992. "Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion." *Cell* 69 (1): 11–25. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90115-s.
- Hynes, Richard O. 2002. "Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines." *Cell* 110 (6): 673–87. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6.
- Ip, Joanna Y., Dominic Schmidt, Qun Pan, Arun K. Ramani, Andrew G. Fraser, Duncan T. Odom, and Benjamin J. Blencowe. 2011. "Global Impact of RNA Polymerase II Elongation Inhibition on Alternative Splicing Regulation." *Genome Research* 21 (3): 390–401. https://doi.org/10.1101/gr.111070.110.
- Itskovich, Svetlana S., Arun Gurunathan, Jason Clark, Matthew Burwinkel, Mark Wunderlich, Mikaela R. Berger, Aishwarya Kulkarni, et al. 2020. "MBNL1 Regulates Essential Alternative RNA Splicing Patterns in MLL-Rearranged Leukemia." *Nature Communications* 11 (1): 2369. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15733-8.
- Iurlo, Alessandra, Daniele Cattaneo, and Umberto Gianelli. 2019. "Blast Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: Risk Factors, Biological Findings, and Targeted Therapeutic Options." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (8). https://doi.org/10.3390/ijms20081839.
- Iwasaki, Masayuki, Michaela Liedtke, Andrew J. Gentles, and Michael L. Cleary. 2015. "CD93 Marks a Non-Quiescent Human Leukemia Stem Cell Population and Is Required for Development of MLL-Rearranged Acute Myeloid Leukemia." *Cell Stem Cell* 17 (4): 412–21. https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.008.
- Jacamo, Rodrigo, Ye Chen, Zhiqiang Wang, Wencai Ma, Min Zhang, Erika L. Spaeth, Ying Wang, et al. 2014. "Reciprocal Leukemia-Stroma VCAM-1/VLA-4-

Dependent Activation of NF-KB Mediates Chemoresistance." *Blood* 123 (17): 2691–2702. https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-511527.

- Jacob, Aishwarya G., and Christopher W. J. Smith. 2017. "Intron Retention as a Component of Regulated Gene Expression Programs." *Human Genetics* 136 (9): 1043–57. https://doi.org/10.1007/s00439-017-1791-x.
- Jacob, F., and J. Monod. 1961. "Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins." *Journal of Molecular Biology* 3 (June): 318–56. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80072-7.
- Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. 2014. "Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes." *The New England Journal of Medicine* 371 (26): 2488–98. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617.
- Jaiswal, Siddhartha, Catriona H. M. Jamieson, Wendy W. Pang, Christopher Y. Park, Mark P. Chao, Ravindra Majeti, David Traver, Nico van Rooijen, and Irving L. Weissman. 2009. "CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis." *Cell* 138 (2): 271–85. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.046.
- Jamieson, Catriona H. 2008. "Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells." *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 436–42. https://doi.org/10.1182/asheducation-2008.1.436.
- Jamieson, Catriona H. M., Laurie E. Ailles, Scott J. Dylla, Manja Muijtjens, Carol Jones, James L. Zehnder, Jason Gotlib, et al. 2004. "Granulocyte-Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML." *The New England Journal of Medicine* 351 (7): 657–67. https://doi.org/10.1056/NEJMoa040258.
- Jensen, K. B., B. K. Dredge, G. Stefani, R. Zhong, R. J. Buckanovich, H. J. Okano, Y. Y. Yang, and R. B. Darnell. 2000. "Nova-1 Regulates Neuron-Specific Alternative Splicing and Is Essential for Neuronal Viability." *Neuron* 25 (2): 359– 71. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80900-9.
- Jiang, R., and T. Gridley. 1997. "Gene Targeting: Things Go Better with Cre." *Current Biology: CB* 7 (5): R321-323. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00149-7.
- Jin, Liqing, Kristin J. Hope, Qiongli Zhai, Florence Smadja-Joffe, and John E. Dick. 2006. "Targeting of CD44 Eradicates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells." *Nature Medicine* 12 (10): 1167–74. https://doi.org/10.1038/nm1483.
- Jin, Peng, Yun Tan, Wei Zhang, Junmin Li, and Kankan Wang. 2020. "Prognostic Alternative MRNA Splicing Signatures and Associated Splicing Factors in Acute Myeloid Leukemia." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 22 (9): 447–57. https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.06.004.
- Jordan, C. T., D. Upchurch, S. J. Szilvassy, M. L. Guzman, D. S. Howard, A. L. Pettigrew, T. Meyerrose, et al. 2000. "The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is a Unique Marker for Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells." *Leukemia* 14 (10): 1777–84. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401903.
- Joseph, Chacko, Julie M. Quach, Carl R. Walkley, Steven W. Lane, Cristina Lo Celso, and Louise E. Purton. 2013. "Deciphering Hematopoietic Stem Cells in Their Niches: A Critical Appraisal of Genetic Models, Lineage Tracing, and Imaging Strategies." *Cell Stem Cell* 13 (5): 520–33. https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.10.010.
- Kadry, Yasmin A., and David A. Calderwood. 2020. "Chapter 22: Structural and Signaling Functions of Integrins." *Biochimica Et Biophysica Acta.*
Biomembranes 1862 (5): 183206. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183206.

- Kantarjian, H. M., M. J. Keating, M. Talpaz, R. S. Walters, T. L. Smith, A. Cork, K. B. McCredie, and E. J. Freireich. 1987. "Chronic Myelogenous Leukemia in Blast Crisis. Analysis of 242 Patients." *The American Journal of Medicine* 83 (3): 445– 54. https://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90754-6.
- Kassim, Adetola A., and Bipib N. Savani. 2017. "Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: A Review." *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 10 (4): 245–51. https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2017.05.021.
- Kataoka, Keisuke, Tomohiko Sato, Akihide Yoshimi, Susumu Goyama, Takako Tsuruta, Hiroshi Kobayashi, Munetake Shimabe, et al. 2011. "Evi1 Is Essential for Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal, and Its Expression Marks Hematopoietic Cells with Long-Term Multilineage Repopulating Activity." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (12): 2403–16. https://doi.org/10.1084/jem.20110447.
- Katsumura, Koichi R., Emery H. Bresnick, and GATA Factor Mechanisms Group. 2017. "The GATA Factor Revolution in Hematology." *Blood* 129 (15): 2092–2102. https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-687871.
- Kawasaki, Yasushi, Yoko Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Jun Kanno, Yukio Kodama, Yuuko Matsushima, Yukio Ogawa, et al. 2009. "Benzene-Induced Hematopoietic Neoplasms Including Myeloid Leukemia in Trp53-Deficient C57BL/6 and C3H/He Mice." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 110 (2): 293–306. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp107.
- Kent, David G., Michael R. Copley, Claudia Benz, Stefan Wöhrer, Brad J. Dykstra, Elaine Ma, John Cheyne, et al. 2009. "Prospective Isolation and Molecular Characterization of Hematopoietic Stem Cells with Durable Self-Renewal Potential." *Blood* 113 (25): 6342–50. https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-192054.
- Khorashad, Jamshid S., Hugues de Lavallade, Jane F. Apperley, Dragana Milojkovic, Alistair G. Reid, Marco Bua, Richard Szydlo, et al. 2008. "Finding of Kinase Domain Mutations in Patients with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia Responding to Imatinib May Identify Those at High Risk of Disease Progression." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (29): 4806–13. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.9953.
- Kiel, Mark J., Melih Acar, Glenn L. Radice, and Sean J. Morrison. 2009. "Hematopoietic Stem Cells Do Not Depend on N-Cadherin to Regulate Their Maintenance." *Cell Stem Cell* 4 (2): 170–79. https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.005.
- Kiel, Mark J., Glenn L. Radice, and Sean J. Morrison. 2007. "Lack of Evidence That Hematopoietic Stem Cells Depend on N-Cadherin-Mediated Adhesion to Osteoblasts for Their Maintenance." *Cell Stem Cell* 1 (2): 204–17. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.001.
- Kiel, Mark J., Omer H. Yilmaz, Toshihide Iwashita, Osman H. Yilmaz, Cox Terhorst, and Sean J. Morrison. 2005. "SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells." *Cell* 121 (7): 1109–21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.026.
- Kikushige, Yoshikane, Takahiro Shima, Shin-ichiro Takayanagi, Shingo Urata, Toshihiro Miyamoto, Hiromi Iwasaki, Katsuto Takenaka, et al. 2010. "TIM-3 Is a

Promising Target to Selectively Kill Acute Myeloid Leukemia Stem Cells." *Cell Stem Cell* 7 (6): 708–17. https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.014.

- Kim, Chang H. 2010. "Homeostatic and Pathogenic Extramedullary Hematopoiesis." *Journal of Blood Medicine* 1: 13–19. https://doi.org/10.2147/JBM.S7224.
- King, Katherine Y., and Margaret A. Goodell. 2011. "Inflammatory Modulation of HSCs: Viewing the HSC as a Foundation for the Immune Response." *Nature Reviews. Immunology* 11 (10): 685–92. https://doi.org/10.1038/nri3062.
- Kisanuki, Y. Y., R. E. Hammer, J. Miyazaki, S. C. Williams, J. A. Richardson, and M. Yanagisawa. 2001. "Tie2-Cre Transgenic Mice: A New Model for Endothelial Cell-Lineage Analysis in Vivo." *Developmental Biology* 230 (2): 230–42. https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0106.
- Koh, Cheryl M., Marco Bezzi, Diana H. P. Low, Wei Xia Ang, Shun Xie Teo, Florence P. H. Gay, Muthafar Al-Haddawi, et al. 2015. "MYC Regulates the Core Pre-MRNA Splicing Machinery as an Essential Step in Lymphomagenesis." *Nature* 523 (7558): 96–100. https://doi.org/10.1038/nature14351.
- Kondo, M., I. L. Weissman, and K. Akashi. 1997. "Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow." *Cell* 91 (5): 661–72. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80453-5.
- Kool, Jaap, and Anton Berns. 2009. "High-Throughput Insertional Mutagenesis Screens in Mice to Identify Oncogenic Networks." *Nature Reviews. Cancer* 9 (6): 389–99. https://doi.org/10.1038/nrc2647.
- Kopp, Hans-Georg, Scott T. Avecilla, Andrea T. Hooper, and Shahin Rafii. 2005. "The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization." *Physiology (Bethesda, Md.)* 20 (October): 349–56. https://doi.org/10.1152/physiol.00025.2005.
- Krause, Daniela S., Katherine Lazarides, Ulrich H. von Andrian, and Richard A. Van Etten. 2006. "Requirement for CD44 in Homing and Engraftment of BCR-ABL-Expressing Leukemic Stem Cells." *Nature Medicine* 12 (10): 1175–80. https://doi.org/10.1038/nm1489.
- Krivtsov, A. V., M. E. Figueroa, A. U. Sinha, M. C. Stubbs, Z. Feng, P. J. M. Valk, R. Delwel, et al. 2013. "Cell of Origin Determines Clinically Relevant Subtypes of MLL-Rearranged AML." *Leukemia* 27 (4): 852–60. https://doi.org/10.1038/leu.2012.363.
- Krivtsov, Andrei V., and Scott A. Armstrong. 2007. "MLL Translocations, Histone Modifications and Leukaemia Stem-Cell Development." *Nature Reviews. Cancer* 7 (11): 823–33. https://doi.org/10.1038/nrc2253.
- Krivtsov, Andrei V., David Twomey, Zhaohui Feng, Matthew C. Stubbs, Yingzi Wang, Joerg Faber, Jason E. Levine, et al. 2006. "Transformation from Committed Progenitor to Leukaemia Stem Cell Initiated by MLL-AF9." *Nature* 442 (7104): 818–22. https://doi.org/10.1038/nature04980.
- Kuehn, M. R., A. Bradley, E. J. Robertson, and M. J. Evans. 1987. "A Potential Animal Model for Lesch-Nyhan Syndrome through Introduction of HPRT Mutations into Mice." *Nature* 326 (6110): 295–98. https://doi.org/10.1038/326295a0.
- Kühn, R., F. Schwenk, M. Aguet, and K. Rajewsky. 1995. "Inducible Gene Targeting in Mice." *Science (New York, N.Y.)* 269 (5229): 1427–29. https://doi.org/10.1126/science.7660125.
- Kuo, A., C. Zhong, W. S. Lane, and R. Derynck. 2000. "Transmembrane Transforming Growth Factor-Alpha Tethers to the PDZ Domain-Containing, Golgi Membrane-Associated Protein P59/GRASP55." *The EMBO Journal* 19 (23): 6427–39. https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6427.

- Kwee, L., H. S. Baldwin, H. M. Shen, C. L. Stewart, C. Buck, C. A. Buck, and M. A. Labow. 1995. "Defective Development of the Embryonic and Extraembryonic Circulatory Systems in Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1) Deficient Mice." *Development (Cambridge, England)* 121 (2): 489–503.
- Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I. L. Weissman, and M. Grompe. 2000. "Purified Hematopoietic Stem Cells Can Differentiate into Hepatocytes in Vivo." *Nature Medicine* 6 (11): 1229–34. https://doi.org/10.1038/81326.
- Lam, Kentson, Alexander Muselman, Randal Du, Yuka Harada, Amanda G. Scholl, Ming Yan, Shinobu Matsuura, Stephanie Weng, Hironori Harada, and Dong-Er Zhang. 2014. "Hmga2 Is a Direct Target Gene of RUNX1 and Regulates Expansion of Myeloid Progenitors in Mice." *Blood* 124 (14): 2203–12. https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-554543.
- Lamagna, Chrystelle, Kairbaan M. Hodivala-Dilke, Beat A. Imhof, and Michel Aurrand-Lions. 2005. "Antibody against Junctional Adhesion Molecule-C Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth." *Cancer Research* 65 (13): 5703–10. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4012.
- Lamagna, Chrystelle, Paolo Meda, Guillaume Mandicourt, James Brown, Robert J. C. Gilbert, E. Yvonne Jones, Friedemann Kiefer, Pilar Ruga, Beat A. Imhof, and Michel Aurrand-Lions. 2005. "Dual Interaction of JAM-C with JAM-B and Alpha(M)Beta2 Integrin: Function in Junctional Complexes and Leukocyte Adhesion." *Molecular Biology of the Cell* 16 (10): 4992–5003. https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0310.
- Lancet, Jeffrey E., Geoffrey L. Uy, Jorge E. Cortes, Laura F. Newell, Tara L. Lin, Ellen K. Ritchie, Robert K. Stuart, et al. 2018. "CPX-351 (Cytarabine and Daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36 (26): 2684–92. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.77.6112.
- Langer, Harald F., Karin Daub, Gregor Braun, Tanja Schönberger, Andreas E. May, Martin Schaller, Gerburg M. Stein, et al. 2007. "Platelets Recruit Human Dendritic Cells via Mac-1/JAM-C Interaction and Modulate Dendritic Cell Function in Vitro." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (6): 1463–70. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.141515.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, and J. E. Dick. 1994. "A Cell Initiating Human Acute Myeloid Leukaemia after Transplantation into SCID Mice." *Nature* 367 (6464): 645–48. https://doi.org/10.1038/367645a0.
- Largaespada, D. A. 2000. "Genetic Heterogeneity in Acute Myeloid Leukemia: Maximizing Information Flow from MuLV Mutagenesis Studies." *Leukemia* 14 (7): 1174–84. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401852.
- Law, L. W., and T. B. Dunn. 1949. "Observations on the Effect of a Folic-Acid Antagonist on Transplantable Lymphoid Leukemias in Mice." *Journal of the National Cancer Institute* 10 (1): 179–92.
- Lawrence, H. Jeffrey, Julie Christensen, Stephen Fong, Yu-Long Hu, Irving Weissman, Guy Sauvageau, R. Keith Humphries, and Corey Largman. 2005. "Loss of Expression of the Hoxa-9 Homeobox Gene Impairs the Proliferation and Repopulating Ability of Hematopoietic Stem Cells." *Blood* 106 (12): 3988–94. https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2003.

- Lawrence, Michael S., Petar Stojanov, Paz Polak, Gregory V. Kryukov, Kristian Cibulskis, Andrey Sivachenko, Scott L. Carter, et al. 2013. "Mutational Heterogeneity in Cancer and the Search for New Cancer-Associated Genes." *Nature* 499 (7457): 214–18. https://doi.org/10.1038/nature12213.
- Lee, Stanley Chun-Wei, and Omar Abdel-Wahab. 2016. "Therapeutic Targeting of Splicing in Cancer." *Nature Medicine* 22 (9): 976–86. https://doi.org/10.1038/nm.4165.
- Lee, Stanley Chun-Wei, Heidi Dvinge, Eunhee Kim, Hana Cho, Jean-Baptiste Micol, Young Rock Chung, Benjamin H. Durham, et al. 2016. "Modulation of Splicing Catalysis for Therapeutic Targeting of Leukemia with Mutations in Genes Encoding Spliceosomal Proteins." *Nature Medicine* 22 (6): 672–78. https://doi.org/10.1038/nm.4097.
- Legras, S., U. Günthert, R. Stauder, F. Curt, S. Oliferenko, H. C. Kluin-Nelemans, J. P. Marie, S. Proctor, C. Jasmin, and F. Smadja-Joffe. 1998. "A Strong Expression of CD44-6v Correlates with Shorter Survival of Patients with Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 91 (9): 3401–13.
- Lerner, M. R., J. A. Boyle, S. M. Mount, S. L. Wolin, and J. A. Steitz. 1980. "Are SnRNPs Involved in Splicing?" *Nature* 283 (5743): 220–24. https://doi.org/10.1038/283220a0.
- Levanon, Ditsa, and Yoram Groner. 2004. "Structure and Regulated Expression of Mammalian RUNX Genes." *Oncogene* 23 (24): 4211–19. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207670.
- Lewis, E. B. 1978. "A Gene Complex Controlling Segmentation in Drosophila." *Nature* 276 (5688): 565–70. https://doi.org/10.1038/276565a0.
- Ley, Klaus, Carlo Laudanna, Myron I. Cybulsky, and Sussan Nourshargh. 2007. "Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated." *Nature Reviews. Immunology* 7 (9): 678–89. https://doi.org/10.1038/nri2156.
- Li, C. L., and G. R. Johnson. 1994. "Stem Cell Factor Enhances the Survival but Not the Self-Renewal of Murine Hematopoietic Long-Term Repopulating Cells." *Blood* 84 (2): 408–14.
- Li, Dantong, Wenzhi Xue, Mei Li, Mei Dong, Jianwei Wang, Xianda Wang, Xiyue Li, et al. 2018. "VCAM-1+ Macrophages Guide the Homing of HSPCs to a Vascular Niche." *Nature* 564 (7734): 119–24. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0709-7.
- Li, Naomi, and Stéphane Richard. 2016. "Sam68 Functions as a Transcriptional Coactivator of the P53 Tumor Suppressor." *Nucleic Acids Research* 44 (18): 8726–41. https://doi.org/10.1093/nar/gkw582.
- Lian, Xin-Yue, Wei Zhang, De-Hong Wu, Ji-Chun Ma, Jing-Dong Zhou, Zhi-Hui Zhang, Xiang-Mei Wen, Zi-Jun Xu, Jiang Lin, and Jun Qian. 2018. "Methylation-Independent ITGA2 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in de Novo Acute Myeloid Leukemia." *Journal of Cellular Physiology* 233 (12): 9584– 93. https://doi.org/10.1002/jcp.26866.
- Lin, Ying-Wei, Christopher Slape, Zhenhua Zhang, and Peter D. Aplan. 2005. "NUP98-HOXD13 Transgenic Mice Develop a Highly Penetrant, Severe Myelodysplastic Syndrome That Progresses to Acute Leukemia." *Blood* 106 (1): 287–95. https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4794.
- Liu, Fei, Henning W. Woitge, Alen Braut, Mark S. Kronenberg, Alexander C. Lichtler, Mina Mina, and Barbara E. Kream. 2004. "Expression and Activity of Osteoblast-Targeted Cre Recombinase Transgenes in Murine Skeletal

Tissues." *The International Journal of Developmental Biology* 48 (7): 645–53. https://doi.org/10.1387/ijdb.041816fl.

- Liu, Yu-Feng, Shao-Ying Zhang, Ying-Ying Chen, Kun Shi, Bin Zou, Jun Liu, Qiong Yang, et al. 2018. "ICAM-1 Deficiency in the Bone Marrow Niche Impairs Quiescence and Repopulation of Hematopoietic Stem Cells." *Stem Cell Reports* 11 (1): 258–73. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.05.016.
- Lo-Coco, Francesco, Giuseppe Avvisati, Marco Vignetti, Christian Thiede, Sonia Maria Orlando, Simona Iacobelli, Felicetto Ferrara, et al. 2013. "Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 369 (2): 111–21. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300874.
- López-Otín, Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, and Guido Kroemer. 2013. "The Hallmarks of Aging." *Cell* 153 (6): 1194–1217. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039.
- Lundberg, Pontus, Axel Karow, Ronny Nienhold, Renate Looser, Hui Hao-Shen, Ina Nissen, Sabine Girsberger, et al. 2014. "Clonal Evolution and Clinical Correlates of Somatic Mutations in Myeloproliferative Neoplasms." *Blood* 123 (14): 2220–28. https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-537167.
- Ma, Yupo, Wei Cui, Jianchang Yang, Jun Qu, Chunhui Di, Hesham M. Amin, Raymond Lai, Jerome Ritz, Diane S. Krause, and Li Chai. 2006. "SALL4, a Novel Oncogene, Is Constitutively Expressed in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) and Induces AML in Transgenic Mice." *Blood* 108 (8): 2726–35. https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-001594.
- Majeti, Ravindra, Christopher Y. Park, and Irving L. Weissman. 2007. "Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood." *Cell Stem Cell* 1 (6): 635–45. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.001.
- Major, I. R., and R. H. Mole. 1978. "Myeloid Leukaemia in X-Ray Irradiated CBA Mice." *Nature* 272 (5652): 455–56. https://doi.org/10.1038/272455a0.
- Malik, Priya, and Amanda F. Cashen. 2014. "Decitabine in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia in Elderly Patients." *Cancer Management and Research* 6: 53–61. https://doi.org/10.2147/CMAR.S40600.
- Mandell, Kenneth J., and Charles A. Parkos. 2005. "The JAM Family of Proteins." *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (6): 857–67. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.005.
- Maniatis, Tom, and Bosiljka Tasic. 2002. "Alternative Pre-MRNA Splicing and Proteome Expansion in Metazoans." *Nature* 418 (6894): 236–43. https://doi.org/10.1038/418236a.
- Matera, A. Gregory, and Zefeng Wang. 2014. "A Day in the Life of the Spliceosome." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (2): 108–21. https://doi.org/10.1038/nrm3742.
- Mathe, G., H. Jammet, B. Pendic, L. Schwarzenberg, J. F. Duplan, B. Maupin, R. Latarjet, M. J. Larrieu, D. Kalic, and Z. Djukic. 1959. "[Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]." *Revue Francaise D'etudes Cliniques Et Biologiques* 4 (3): 226–38.
- Matlin, Arianne J., Francis Clark, and Christopher W. J. Smith. 2005. "Understanding Alternative Splicing: Towards a Cellular Code." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (5): 386–98. https://doi.org/10.1038/nrm1645.
- Matsunaga, Takuya, Naofumi Takemoto, Tsutomu Sato, Rishu Takimoto, Ikuta Tanaka, Akihito Fujimi, Takehide Akiyama, et al. 2003. "Interaction between Leukemic-Cell VLA-4 and Stromal Fibronectin Is a Decisive Factor for Minimal

Residual Disease of Acute Myelogenous Leukemia." *Nature Medicine* 9 (9): 1158–65. https://doi.org/10.1038/nm909.

- Matter, Nathalie, Peter Herrlich, and Harald König. 2002. "Signal-Dependent Regulation of Splicing via Phosphorylation of Sam68." *Nature* 420 (6916): 691–95. https://doi.org/10.1038/nature01153.
- Mayadas, T. N., R. C. Johnson, H. Rayburn, R. O. Hynes, and D. D. Wagner. 1993. "Leukocyte Rolling and Extravasation Are Severely Compromised in P Selectin-Deficient Mice." *Cell* 74 (3): 541–54. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80055-j.
- Mayle, Allison, Liubin Yang, Benjamin Rodriguez, Ting Zhou, Edmund Chang, Choladda V. Curry, Grant A. Challen, et al. 2015. "Dnmt3a Loss Predisposes Murine Hematopoietic Stem Cells to Malignant Transformation." *Blood* 125 (4): 629–38. https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-594648.
- McCune, J. M., R. Namikawa, H. Kaneshima, L. D. Shultz, M. Lieberman, and I. L. Weissman. 1988. "The SCID-Hu Mouse: Murine Model for the Analysis of Human Hematolymphoid Differentiation and Function." *Science (New York, N.Y.)* 241 (4873): 1632–39. https://doi.org/10.1126/science.2971269.
- McMahon, Kathryn A., Samantha Y.-L. Hiew, Suzana Hadjur, Henrique Veiga-Fernandes, Ursula Menzel, Amanda J. Price, Dimitris Kioussis, Owen Williams, and Hugh J. M. Brady. 2007. "MII Has a Critical Role in Fetal and Adult Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal." *Cell Stem Cell* 1 (3): 338–45. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.07.002.
- Méndez-Ferrer, Simón, Daniel Lucas, Michela Battista, and Paul S. Frenette. 2008. "Haematopoietic Stem Cell Release Is Regulated by Circadian Oscillations." *Nature* 452 (7186): 442–47. https://doi.org/10.1038/nature06685.
- Menssen, Andrew J., and Matthew J. Walter. 2020. "Genetics of Progression from MDS to Secondary Leukemia." *Blood* 136 (1): 50–60. https://doi.org/10.1182/blood.2019000942.
- Meurette, Olivier, and Patrick Mehlen. 2018. "Notch Signaling in the Tumor Microenvironment." *Cancer Cell* 34 (4): 536–48. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.009.
- Meyer, C., T. Burmeister, D. Gröger, G. Tsaur, L. Fechina, A. Renneville, R. Sutton, et al. 2018. "The MLL Recombinome of Acute Leukemias in 2017." *Leukemia* 32 (2): 273–84. https://doi.org/10.1038/leu.2017.213.
- Michallet, M., T. Philip, I. Philip, H. Godinot, C. Sebban, G. Salles, A. Thiebaut, et al. 2000. "Transplantation with Selected Autologous Peripheral Blood CD34+Thy1+ Hematopoietic Stem Cells (HSCs) in Multiple Myeloma: Impact of HSC Dose on Engraftment, Safety, and Immune Reconstitution." *Experimental Hematology* 28 (7): 858–70. https://doi.org/10.1016/s0301-472x(00)00169-7.
- Miller, Peter G., Fatima Al-Shahrour, Kimberly A. Hartwell, Lisa P. Chu, Marcus Järås, Rishi V. Puram, Alexandre Puissant, et al. 2013. "In Vivo RNAi Screening Identifies a Leukemia-Specific Dependence on Integrin Beta 3 Signaling." *Cancer Cell* 24 (1): 45–58. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.004.
- Morrison, S. J., and I. L. Weissman. 1994. "The Long-Term Repopulating Subset of Hematopoietic Stem Cells Is Deterministic and Isolatable by Phenotype." *Immunity* 1 (8): 661–73. https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-x.
- Muller-Sieburg, C. E., C. A. Whitlock, and I. L. Weissman. 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 (4): 653–62. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90274-6.

- Müller-Sieburg, Christa E., Rebecca H. Cho, Marilyn Thoman, Becky Adkins, and Hans B. Sieburg. 2002. "Deterministic Regulation of Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation." *Blood* 100 (4): 1302–9.
- Mupo, A., L. Celani, O. Dovey, J. L. Cooper, C. Grove, R. Rad, P. Sportoletti, B. Falini, A. Bradley, and G. S. Vassiliou. 2013. "A Powerful Molecular Synergy between Mutant Nucleophosmin and Flt3-ITD Drives Acute Myeloid Leukemia in Mice." *Leukemia* 27 (9): 1917–20. https://doi.org/10.1038/leu.2013.77.
- Musilova, J., and K. Michalova. 1988. "Chromosome Study of 85 Patients with Myelodysplastic Syndrome." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 33 (1): 39–50. https://doi.org/10.1016/0165-4608(88)90048-9.
- Musselman, Catherine A., Marie-Eve Lalonde, Jacques Côté, and Tatiana G. Kutateladze. 2012. "Perceiving the Epigenetic Landscape through Histone Readers." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (12): 1218–27. https://doi.org/10.1038/nsmb.2436.
- Naci, Dalila, Sofiane Berrazouane, Frédéric Barabé, and Fawzi Aoudjit. 2019. "Cell Adhesion to Collagen Promotes Leukemia Resistance to Doxorubicin by Reducing DNA Damage through the Inhibition of Rac1 Activation." *Scientific Reports* 9 (1): 19455. https://doi.org/10.1038/s41598-019-55934-w.
- Nagamatsu, Go, Masako Ohmura, Takuo Mizukami, Isao Hamaguchi, Susumu Hirabayashi, Shosei Yoshida, Yutaka Hata, Toshio Suda, and Kazuyuki Ohbo. 2006. "A CTX Family Cell Adhesion Molecule, JAM4, Is Expressed in Stem Cell and Progenitor Cell Populations of Both Male Germ Cell and Hematopoietic Cell Lineages." *Molecular and Cellular Biology* 26 (22): 8498–8506. https://doi.org/10.1128/MCB.01502-06.
- Navarro, José-Tomás, Evarist Feliu, Javier Grau, Blanca Espinet, Dolors Colomer, Josep-Maria Ribera, Albert Oriol, Isabel Granada, Jordi Juncà, and Fuensanta Millá. 2007. "Monosomy 7 with Severe Myelodysplasia Developing during Imatinib Treatment of Philadelphia-Positive Chronic Myeloid Leukemia: Two Cases with a Different Outcome." *American Journal of Hematology* 82 (9): 849– 51. https://doi.org/10.1002/ajh.20859.
- Negrin, R. S., K. Atkinson, T. Leemhuis, E. Hanania, C. Juttner, K. Tierney, W. W. Hu, et al. 2000. "Transplantation of Highly Purified CD34+Thy-1+ Hematopoietic Stem Cells in Patients with Metastatic Breast Cancer." *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 6 (3): 262–71. https://doi.org/10.1016/s1083-8791(00)70008-5.
- Nervi, Bruno, Pablo Ramirez, Michael P. Rettig, Geoffrey L. Uy, Matthew S. Holt, Julie K. Ritchey, Julie L. Prior, et al. 2009. "Chemosensitization of Acute Myeloid Leukemia (AML) Following Mobilization by the CXCR4 Antagonist AMD3100." *Blood* 113 (24): 6206–14. https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162123.
- Ng, Stanley W. K., Amanda Mitchell, James A. Kennedy, Weihsu C. Chen, Jessica McLeod, Narmin Ibrahimova, Andrea Arruda, et al. 2016. "A 17-Gene Stemness Score for Rapid Determination of Risk in Acute Leukaemia." *Nature* 540 (7633): 433–37. https://doi.org/10.1038/nature20598.
- Nie, Yuchun, Yoon-Chi Han, and Yong-Rui Zou. 2008. "CXCR4 Is Required for the Quiescence of Primitive Hematopoietic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (4): 777–83. https://doi.org/10.1084/jem.20072513.
- Nikanjam, Mina, Edmund V. Capparelli, Jeffrey E. Lancet, Arthur Louie, and Gary Schiller. 2018. "Persistent Cytarabine and Daunorubicin Exposure after Administration of Novel Liposomal Formulation CPX-351: Population

Pharmacokinetic Assessment." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 81 (1): 171–78. https://doi.org/10.1007/s00280-017-3484-5.

- Nilsson, Lars, Ingbritt Astrand-Grundström, Kristina Anderson, Ingrid Arvidsson, Peter Hokland, David Bryder, Lars Kjeldsen, et al. 2002. "Involvement and Functional Impairment of the CD34(+)CD38(-)Thy-1(+) Hematopoietic Stem Cell Pool in Myelodysplastic Syndromes with Trisomy 8." *Blood* 100 (1): 259–67. https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0188.
- Nilsson, Lars, Patrik Edén, Eleonor Olsson, Robert Månsson, Ingbritt Astrand-Grundström, Bodil Strömbeck, Kim Theilgaard-Mönch, et al. 2007. "The Molecular Signature of MDS Stem Cells Supports a Stem-Cell Origin of 5q Myelodysplastic Syndromes." *Blood* 110 (8): 3005–14. https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079368.
- Nilsson, Susan K., Hayley M. Johnston, Genevieve A. Whitty, Brenda Williams, Ryan J. Webb, David T. Denhardt, Ivan Bertoncello, Linda J. Bendall, Paul J. Simmons, and David N. Haylock. 2005. "Osteopontin, a Key Component of the Hematopoietic Stem Cell Niche and Regulator of Primitive Hematopoietic Progenitor Cells." *Blood* 106 (4): 1232–39. https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4422.
- Ninomiya, M., A. Abe, A. Katsumi, J. Xu, M. Ito, F. Arai, T. Suda, et al. 2007. "Homing, Proliferation and Survival Sites of Human Leukemia Cells in Vivo in Immunodeficient Mice." *Leukemia* 21 (1): 136–42. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404432.
- Noshchenko, Andriy G., Oleksandra Y. Bondar, and Vira D. Drozdova. 2010. "Radiation-Induced Leukemia among Children Aged 0-5 Years at the Time of the Chernobyl Accident." *International Journal of Cancer* 127 (2): 412–26. https://doi.org/10.1002/ijc.24834.
- Notta, Faiyaz, Sergei Doulatov, Elisa Laurenti, Armando Poeppl, Igor Jurisica, and John E. Dick. 2011. "Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment." *Science (New York, N.Y.)* 333 (6039): 218–21. https://doi.org/10.1126/science.1201219.
- Notta, Faiyaz, Sasan Zandi, Naoya Takayama, Stephanie Dobson, Olga I. Gan, Gavin Wilson, Kerstin B. Kaufmann, et al. 2016. "Distinct Routes of Lineage Development Reshape the Human Blood Hierarchy across Ontogeny." *Science* (*New York, N.Y.*) 351 (6269): aab2116. https://doi.org/10.1126/science.aab2116.
- Nourshargh, Sussan, and Ronen Alon. 2014. "Leukocyte Migration into Inflamed Tissues." Immunity 41 (5): 694–707. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008.
- Ohanian, Maro, Uri Rozovski, Rashmi Kanagal-Shamanna, Lynne V. Abruzzo, Sanam Loghavi, Tapan Kadia, Andrew Futreal, et al. 2019. "MYC Protein Expression Is an Important Prognostic Factor in Acute Myeloid Leukemia." *Leukemia & Lymphoma* 60 (1): 37–48. https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1464158.
- Okamoto, I., Y. Kawano, D. Murakami, T. Sasayama, N. Araki, T. Miki, A. J. Wong, and H. Saya. 2001. "Proteolytic Release of CD44 Intracellular Domain and Its Role in the CD44 Signaling Pathway." *The Journal of Cell Biology* 155 (5): 755– 62. https://doi.org/10.1083/jcb.200108159.
- Omidvar, Nader, Scott Kogan, Stephanie Beurlet, Carole le Pogam, Anne Janin, Robert West, Maria-Elena Noguera, et al. 2007. "BCL-2 and Mutant NRAS Interact Physically and Functionally in a Mouse Model of Progressive

Myelodysplasia." *Cancer Research* 67 (24): 11657–67. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0196.

- Ooi, A. G. Lisa, Holger Karsunky, Ravindra Majeti, Stefan Butz, Dietmar Vestweber, Tatsuro Ishida, Thomas Quertermous, Irving L. Weissman, and E. Camilla Forsberg. 2009. "The Adhesion Molecule Esam1 Is a Novel Hematopoietic Stem Cell Marker." Stem Cells (Dayton, Ohio) 27 (3): 653–61. https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0824.
- Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, and H. Nakauchi. 1996. "Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell." *Science (New York, N.Y.)* 273 (5272): 242–45. https://doi.org/10.1126/science.273.5272.242.
- Pabst, Caroline, Anne Bergeron, Vincent-Philippe Lavallée, Jonathan Yeh, Patrick Gendron, Gudmundur L. Norddahl, Jana Krosl, et al. 2016. "GPR56 Identifies Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells with High Repopulating Potential in Vivo." *Blood* 127 (16): 2018–27. https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-683649.
- Papaemmanuil, Elli, Moritz Gerstung, Lars Bullinger, Verena I. Gaidzik, Peter Paschka, Nicola D. Roberts, Nicola E. Potter, et al. 2016. "Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia." *The New England Journal of Medicine* 374 (23): 2209–21. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192.
- Papayannopoulou, T., C. Craddock, B. Nakamoto, G. V. Priestley, and N. S. Wolf. 1995. "The VLA4/VCAM-1 Adhesion Pathway Defines Contrasting Mechanisms of Lodgement of Transplanted Murine Hemopoietic Progenitors between Bone Marrow and Spleen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United* States of America 92 (21): 9647–51. https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9647.
- Papayannopoulou, T., G. V. Priestley, B. Nakamoto, V. Zafiropoulos, L. M. Scott, and J. M. Harlan. 2001. "Synergistic Mobilization of Hemopoietic Progenitor Cells Using Concurrent Beta1 and Beta2 Integrin Blockade or Beta2-Deficient Mice." *Blood* 97 (5): 1282–88. https://doi.org/10.1182/blood.v97.5.1282.
- Paul, Franziska, Ya'ara Arkin, Amir Giladi, Diego Adhemar Jaitin, Ephraim Kenigsberg, Hadas Keren-Shaul, Deborah Winter, et al. 2015. "Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors." *Cell* 163 (7): 1663–77. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.013.
- Pellagatti, Andrea, and Jacqueline Boultwood. 2020. "Splicing Factor Mutant Myelodysplastic Syndromes: Recent Advances." *Advances in Biological Regulation* 75 (January): 100655. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.100655.
- Perl, Alexander E., Giovanni Martinelli, Jorge E. Cortes, Andreas Neubauer, Ellin Berman, Stefania Paolini, Pau Montesinos, et al. 2019. "Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML." *The New England Journal of Medicine* 381 (18): 1728–40. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1902688.
- Pietras, Eric M., Damien Reynaud, Yoon-A. Kang, Daniel Carlin, Fernando J. Calero-Nieto, Andrew D. Leavitt, Joshua M. Stuart, Berthold Göttgens, and Emmanuelle Passegué. 2015. "Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions." *Cell Stem Cell* 17 (1): 35–46. https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003.
- Pineault, Nicolas, Cheryl D. Helgason, H. Jeffrey Lawrence, and R. Keith Humphries. 2002. "Differential Expression of Hox, Meis1, and Pbx1 Genes in Primitive Cells

throughout Murine Hematopoietic Ontogeny." *Experimental Hematology* 30 (1): 49–57. https://doi.org/10.1016/s0301-472x(01)00757-3.

- Ploemacher, R. E., J. P. van der Sluijs, J. S. Voerman, and N. H. Brons. 1989. "An in Vitro Limiting-Dilution Assay of Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells in the Mouse." *Blood* 74 (8): 2755–63.
- Pollyea, Daniel A., Jonathan A. Gutman, Lia Gore, Clayton A. Smith, and Craig T. Jordan. 2014. "Targeting Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: A Review and Principles for the Development of Clinical Trials." *Haematologica* 99 (8): 1277– 84. https://doi.org/10.3324/haematol.2013.085209.
- Ponta, Helmut, Larry Sherman, and Peter A. Herrlich. 2003. "CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (1): 33–45. https://doi.org/10.1038/nrm1004.
- Povinelli, Benjamin J., Alba Rodriguez-Meira, and Adam J. Mead. 2018. "Single Cell Analysis of Normal and Leukemic Hematopoiesis." *Molecular Aspects of Medicine* 59 (February): 85–94. https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.08.006.
- Praetor, Asja, Jacqueline M. McBride, Henry Chiu, Linda Rangell, Lorena Cabote, Wyne P. Lee, James Cupp, Dimitry M. Danilenko, and Sherman Fong. 2009.
 "Genetic Deletion of JAM-C Reveals a Role in Myeloid Progenitor Generation." Blood 113 (9): 1919–28. https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-159574.
- Preston, D. L., S. Kusumi, M. Tomonaga, S. Izumi, E. Ron, A. Kuramoto, N. Kamada, H. Dohy, T. Matsuo, and T. Matsui T [corrected to Matsuo. 1994. "Cancer Incidence in Atomic Bomb Survivors. Part III. Leukemia, Lymphoma and Multiple Myeloma, 1950-1987." *Radiation Research* 137 (2 Suppl): S68-97.
- Priestley, Gregory V., Tatiana Ulyanova, and Thalia Papayannopoulou. 2007. "Sustained Alterations in Biodistribution of Stem/Progenitor Cells in Tie2Cre+ Alpha4(f/f) Mice Are Hematopoietic Cell Autonomous." *Blood* 109 (1): 109–11. https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-026427.
- Prochazka, Lubomir, Radek Tesarik, and Jaroslav Turanek. 2014. "Regulation of Alternative Splicing of CD44 in Cancer." *Cellular Signalling* 26 (10): 2234–39. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.011.
- Rabquer, Bradley J., Mohammad A. Amin, Nanditha Teegala, Matthew K. Shaheen, Pei-Suen Tsou, Jeffrey H. Ruth, Charles A. Lesch, Beat A. Imhof, and Alisa E. Koch. 2010. "Junctional Adhesion Molecule-C Is a Soluble Mediator of Angiogenesis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (3): 1777– 85. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000556.
- Reikvam, Håkon, Kimberley Joanne Hatfield, Philippe Lassalle, Astrid Olsnes Kittang, Elisabeth Ersvaer, and Øystein Bruserud. 2010. "Targeting the Angiopoietin (Ang)/Tie-2 Pathway in the Crosstalk between Acute Myeloid Leukaemia and Endothelial Cells: Studies of Tie-2 Blocking Antibodies, Exogenous Ang-2 and Inhibition of Constitutive Agonistic Ang-1 Release." *Expert Opinion on Investigational* Drugs 19 (2): 169–83. https://doi.org/10.1517/13543780903485659.
- Rhenen, Anna van, Guus A. M. S. van Dongen, Angèle Kelder, Elwin J. Rombouts, Nicole Feller, Bijan Moshaver, Marijke Stigter-van Walsum, Sonja Zweegman, Gert J. Ossenkoppele, and Gerrit Jan Schuurhuis. 2007. "The Novel AML Stem Cell Associated Antigen CLL-1 Aids in Discrimination between Normal and Leukemic Stem Cells." *Blood* 110 (7): 2659–66. https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-083048.
- Rhenen, Anna van, Nicole Feller, Angèle Kelder, August H. Westra, Elwin Rombouts, Sonja Zweegman, Marjolein A. van der Pol, Quinten Waisfisz, Gert J.

Ossenkoppele, and Gerrit Jan Schuurhuis. 2005. "High Stem Cell Frequency in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis Predicts High Minimal Residual Disease and Poor Survival." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (18): 6520–27. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0468.

- Rhoades, K. L., C. J. Hetherington, N. Harakawa, D. A. Yergeau, L. Zhou, L. Q. Liu, M. T. Little, D. G. Tenen, and D. E. Zhang. 2000. "Analysis of the Role of AML1-ETO in Leukemogenesis, Using an Inducible Transgenic Mouse Model." *Blood* 96 (6): 2108–15.
- Rivina, Leena, Michael Davoren, and Robert H. Schiestl. 2014. "Radiation-Induced Myeloid Leukemia in Murine Models." *Human Genomics* 8 (July): 13. https://doi.org/10.1186/1479-7364-8-13.
- Rockova, Veronika, Saman Abbas, Bas J. Wouters, Claudia A. J. Erpelinck, H. Berna Beverloo, Ruud Delwel, Wim L. J. van Putten, Bob Löwenberg, and Peter J. M. Valk. 2011. "Risk Stratification of Intermediate-Risk Acute Myeloid Leukemia: Integrative Analysis of a Multitude of Gene Mutation and Gene Expression Markers." *Blood* 118 (4): 1069–76. https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-334748.
- Romero, Guillermo, Mark von Zastrow, and Peter A. Friedman. 2011. "Role of PDZ Proteins in Regulating Trafficking, Signaling, and Function of GPCRs: Means, Motif, and Opportunity." *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)* 62: 279– 314. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385952-5.00003-8.
- Russell, E. S. 1979. "Hereditary Anemias of the Mouse: A Review for Geneticists." *Advances in Genetics* 20: 357–459.
- Saito, Yoriko, Hiroshi Kitamura, Atsushi Hijikata, Mariko Tomizawa-Murasawa, Satoshi Tanaka, Shinsuke Takagi, Naoyuki Uchida, et al. 2010. "Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells." *Science Translational Medicine* 2 (17): 17ra9. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000349.
- Salton, Maayan, and Tom Misteli. 2016. "Small Molecule Modulators of Pre-MRNA Splicing in Cancer Therapy." *Trends in Molecular Medicine* 22 (1): 28–37. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.11.005.
- Salvatori, Beatrice, Ilaria Iosue, Nkerorema Djodji Damas, Arianna Mangiavacchi, Sabina Chiaretti, Monica Messina, Fabrizio Padula, et al. 2011. "Critical Role of C-Myc in Acute Myeloid Leukemia Involving Direct Regulation of MiR-26a and Histone Methyltransferase EZH2." *Genes & Cancer* 2 (5): 585–92. https://doi.org/10.1177/1947601911416357.
- Santoso, Sentot, Ulrich J. H. Sachs, Hartmut Kroll, Monica Linder, Andreas Ruf, Klaus T. Preissner, and Triantafyllos Chavakis. 2002. "The Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM-3) on Human Platelets Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1." *The Journal of Experimental Medicine* 196 (5): 679–91. https://doi.org/10.1084/jem.20020267.
- Sato, A., A. Iwama, N. Takakura, H. Nishio, G. D. Yancopoulos, and T. Suda. 1998. "Characterization of TEK Receptor Tyrosine Kinase and Its Ligands, Angiopoietins, in Human Hematopoietic Progenitor Cells." *International Immunology* 10 (8): 1217–27. https://doi.org/10.1093/intimm/10.8.1217.
- Scheiermann, Christoph, Bartomeu Colom, Paolo Meda, Nimesh S. A. Patel, Mathieu-Benoit Voisin, Alessandra Marrelli, Abigail Woodfin, et al. 2009. "Junctional Adhesion Molecule-C Mediates Leukocyte Infiltration in Response to Ischemia

Reperfusion Injury." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (10): 1509–15. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.187559.

- Scheiermann, Christoph, Yuya Kunisaki, Daniel Lucas, Andrew Chow, Jung-Eun Jang, Dachuan Zhang, Daigo Hashimoto, Miriam Merad, and Paul S. Frenette. 2012.
 "Adrenergic Nerves Govern Circadian Leukocyte Recruitment to Tissues." *Immunity* 37 (2): 290–301. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.021.
- Scheiermann, Christoph, Paolo Meda, Michel Aurrand-Lions, Rime Madani, Yiangos Yiangou, Peter Coffey, Thomas E. Salt, et al. 2007. "Expression and Function of Junctional Adhesion Molecule-C in Myelinated Peripheral Nerves." *Science (New York, N.Y.)* 318 (5855): 1472–75. https://doi.org/10.1126/science.1149276.
- Schliemann, Christoph, Ralf Bieker, Teresa Padro, Torsten Kessler, Heike Hintelmann, Thomas Buchner, Wolfgang E. Berdel, and Rolf M. Mesters. 2006. "Expression of Angiopoietins and Their Receptor Tie2 in the Bone Marrow of Patients with Acute Myeloid Leukemia." *Haematologica* 91 (9): 1203–11.
- Schoch, Claudia, Susanne Schnittger, Mirjam Klaus, Wolfgang Kern, Wolfgang Hiddemann, and Torsten Haferlach. 2003. "AML with 11q23/MLL Abnormalities as Defined by the WHO Classification: Incidence, Partner Chromosomes, FAB Subtype, Age Distribution, and Prognostic Impact in an Unselected Series of 1897 Cytogenetically Analyzed AML Cases." *Blood* 102 (7): 2395–2402. https://doi.org/10.1182/blood-2003-02-0434.
- Schofield, R. 1978. "The Relationship between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell." *Blood Cells* 4 (1–2): 7–25.
- Schreiner, S., M. Birke, M. P. García-Cuéllar, O. Zilles, J. Greil, and R. K. Slany. 2001. "MLL-ENL Causes a Reversible and Myc-Dependent Block of Myelomonocytic Cell Differentiation." *Cancer Research* 61 (17): 6480–86.
- Schübeler, Dirk, David M. MacAlpine, David Scalzo, Christiane Wirbelauer, Charles Kooperberg, Fred van Leeuwen, Daniel E. Gottschling, et al. 2004. "The Histone Modification Pattern of Active Genes Revealed through Genome-Wide Chromatin Analysis of a Higher Eukaryote." *Genes & Development* 18 (11): 1263–71. https://doi.org/10.1101/gad.1198204.
- Schuurhuis, Gerrit J., Michael Heuser, Sylvie Freeman, Marie-Christine Béné, Francesco Buccisano, Jacqueline Cloos, David Grimwade, et al. 2018. "Minimal/Measurable Residual Disease in AML: A Consensus Document from the European LeukemiaNet MRD Working Party." *Blood* 131 (12): 1275–91. https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-801498.
- Scott, E. W., M. C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh. 1994. "Requirement of Transcription Factor PU.1 in the Development of Multiple Hematopoietic Lineages." *Science (New York, N.Y.)* 265 (5178): 1573–77. https://doi.org/10.1126/science.8079170.
- Scott, Linda M., Gregory V. Priestley, and Thalia Papayannopoulou. 2003. "Deletion of Alpha4 Integrins from Adult Hematopoietic Cells Reveals Roles in Homeostasis, Regeneration, and Homing." *Molecular and Cellular Biology* 23 (24): 9349–60. https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9349-9360.2003.
- Seiler, Michael, Akihide Yoshimi, Rachel Darman, Betty Chan, Gregg Keaney, Michael Thomas, Anant A. Agrawal, et al. 2018. "H3B-8800, an Orally Available Small-Molecule Splicing Modulator, Induces Lethality in Spliceosome-Mutant Cancers." *Nature Medicine* 24 (4): 497–504. https://doi.org/10.1038/nm.4493.

- Seki, M., K. Yoshida, M. Nishimura, and K. Nemoto. 1991. "Radiation-Induced Myeloid Leukemia in C3H/He Mice and the Effect of Prednisolone Acetate on Leukemogenesis." *Radiation Research* 127 (2): 146–49.
- Senis, Yotis A., Alexandra Mazharian, and Jun Mori. 2014. "Src Family Kinases: At the Forefront of Platelet Activation." *Blood* 124 (13): 2013–24. https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-453134.
- Shalek, Alex K., Rahul Satija, Xian Adiconis, Rona S. Gertner, Jellert T. Gaublomme, Raktima Raychowdhury, Schraga Schwartz, et al. 2013. "Single-Cell Transcriptomics Reveals Bimodality in Expression and Splicing in Immune Cells." *Nature* 498 (7453): 236–40. https://doi.org/10.1038/nature12172.
- Shapiro, L., A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grübel, J.
 F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman, and W. A. Hendrickson. 1995.
 "Structural Basis of Cell-Cell Adhesion by Cadherins." *Nature* 374 (6520): 327– 37. https://doi.org/10.1038/374327a0.
- Shirai, Cara Lunn, James N. Ley, Brian S. White, Sanghyun Kim, Justin Tibbitts, Jin Shao, Matthew Ndonwi, et al. 2015. "Mutant U2AF1 Expression Alters Hematopoiesis and Pre-MRNA Splicing In Vivo." *Cancer Cell* 27 (5): 631–43. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.008.
- Shlush, Liran I. 2018. "Age-Related Clonal Hematopoiesis." *Blood* 131 (5): 496–504. https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-746453.
- Shlush, Liran I., Sasan Zandi, Amanda Mitchell, Weihsu Claire Chen, Joseph M. Brandwein, Vikas Gupta, James A. Kennedy, et al. 2014. "Identification of Pre-Leukaemic Haematopoietic Stem Cells in Acute Leukaemia." *Nature* 506 (7488): 328–33. https://doi.org/10.1038/nature13038.
- Sievers, E. L., R. A. Larson, E. A. Stadtmauer, E. Estey, B. Löwenberg, H. Dombret, C. Karanes, et al. 2001. "Efficacy and Safety of Gemtuzumab Ozogamicin in Patients with CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia in First Relapse." *Journal* of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 19 (13): 3244–54. https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.13.3244.
- Sitnicka, Ewa, David Bryder, Kim Theilgaard-Mönch, Natalija Buza-Vidas, Jörgen Adolfsson, and Sten Eirik W. Jacobsen. 2002. "Key Role of Flt3 Ligand in Regulation of the Common Lymphoid Progenitor but Not in Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool." *Immunity* 17 (4): 463–72. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00419-3.
- Smithies, O., R. G. Gregg, S. S. Boggs, M. A. Koralewski, and R. S. Kucherlapati. 1985. "Insertion of DNA Sequences into the Human Chromosomal Beta-Globin Locus by Homologous Recombination." *Nature* 317 (6034): 230–34. https://doi.org/10.1038/317230a0.
- Soligo, D., R. Schiró, R. Luksch, G. Manara, N. Quirici, C. Parravicini, and G. Lambertenghi Deliliers. 1990. "Expression of Integrins in Human Bone Marrow." *British Journal of Haematology* 76 (3): 323–32. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1990.tb06363.x.
- Somervaille, Tim C. P., and Michael L. Cleary. 2006. "Identification and Characterization of Leukemia Stem Cells in Murine MLL-AF9 Acute Myeloid Leukemia." *Cancer Cell* 10 (4): 257–68. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.020.
- Song, Yan, Olga B. Botvinnik, Michael T. Lovci, Boyko Kakaradov, Patrick Liu, Jia L. Xu, and Gene W. Yeo. 2017. "Single-Cell Alternative Splicing Analysis with Expedition Reveals Splicing Dynamics during Neuron Differentiation." *Molecular Cell* 67 (1): 148-161.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.003.

- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, and I. L. Weissman. 1988. "Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells." *Science (New York, N.Y.)* 241 (4861): 58–62. https://doi.org/10.1126/science.2898810.
- Sperling, Adam S., Christopher J. Gibson, and Benjamin L. Ebert. 2017. "The Genetics of Myelodysplastic Syndrome: From Clonal Haematopoiesis to Secondary Leukaemia." *Nature Reviews. Cancer* 17 (1): 5–19. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.112.
- SPF. n.d. "Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim." Accessed June 10, 2021. /import/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-enfrance-metropolitaine-entre-1990-et-2018-tumeurs-solides-etude-a-partir.
- Spiers, A. S. 1995. "Clinical Manifestations of Chronic Granulocytic Leukemia." *Seminars in Oncology* 22 (4): 380–95.
- Spoo, Anke C., Michael Lübbert, William G. Wierda, and Jan A. Burger. 2007. "CXCR4 Is a Prognostic Marker in Acute Myelogenous Leukemia." *Blood* 109 (2): 786– 91. https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024844.
- Springer, T. A. 1994. "Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: The Multistep Paradigm." *Cell* 76 (2): 301–14. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90337-9.
- Stahl, Maximilian, Tae Kon Kim, and Amer M. Zeidan. 2016. "Update on Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: New Discoveries and Therapeutic Opportunities." *World Journal of Stem Cells* 8 (10): 316–31. https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i10.316.
- Stavropoulou, Vaia, Marwa Almosailleakh, Hélène Royo, Jean-François Spetz, Sabine Juge, Laurent Brault, Patrick Kopp, et al. 2018. "A Novel Inducible Mouse Model of MLL-ENL-Driven Mixed-Lineage Acute Leukemia." *HemaSphere* 2 (4): e51. https://doi.org/10.1097/HS9.000000000000051.
- Stavropoulou, Vaia, Susanne Kaspar, Laurent Brault, Mathijs A. Sanders, Sabine Juge, Stefano Morettini, Alexandar Tzankov, et al. 2016. "MLL-AF9 Expression in Hematopoietic Stem Cells Drives a Highly Invasive AML Expressing EMT-Related Genes Linked to Poor Outcome." *Cancer Cell* 30 (1): 43–58. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.011.
- Steensma, MULTILEARNING Group. n.d. "PHASE I DOSE ESCALATION CLINICAL TRIAL OF H3B-8800, A SPLICING... by Prof. David Steensma." Accessed June 10, 2021.

https://library.ehaweb.org/eha/2019/24th/266651/david.steensma.phase.i.dose .escalation.clinical.trial.of.h3b-

8800.a.splicing.html?f=listing%3D3%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D1%2A media%3D1.

- Stein, Eytan M., Courtney D. DiNardo, Daniel A. Pollyea, Amir T. Fathi, Gail J. Roboz, Jessica K. Altman, Richard M. Stone, et al. 2017. "Enasidenib in Mutant IDH2 Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 130 (6): 722–31. https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-779405.
- Stone, Richard M., Sumithra J. Mandrekar, Ben L. Sanford, Kristina Laumann, Susan Geyer, Clara D. Bloomfield, Christian Thiede, et al. 2017. "Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation." *The New England Journal of Medicine* 377 (5): 454–64. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614359.
- Sugano, Yasuyoshi, Masaki Takeuchi, Ayami Hirata, Hirokazu Matsushita, Toshio Kitamura, Minoru Tanaka, and Atsushi Miyajima. 2008. "Junctional Adhesion

Molecule-A, JAM-A, Is a Novel Cell-Surface Marker for Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells." *Blood* 111 (3): 1167–72. https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-081554.

- Sugiyama, Tatsuki, Hiroshi Kohara, Mamiko Noda, and Takashi Nagasawa. 2006. "Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches." *Immunity* 25 (6): 977–88. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.016.
- Sun, Deqiang, Min Luo, Mira Jeong, Benjamin Rodriguez, Zheng Xia, Rebecca Hannah, Hui Wang, et al. 2014. "Epigenomic Profiling of Young and Aged HSCs Reveals Concerted Changes during Aging That Reinforce Self-Renewal." *Cell Stem Cell* 14 (5): 673–88. https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.03.002.
- Taussig, David C., Farideh Miraki-Moud, Fernando Anjos-Afonso, Daniel J. Pearce, Kirsty Allen, Christopher Ridler, Debra Lillington, et al. 2008. "Anti-CD38 Antibody-Mediated Clearance of Human Repopulating Cells Masks the Heterogeneity of Leukemia-Initiating Cells." *Blood* 112 (3): 568–75. https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-118331.
- Tavassoli, M., and W. H. Crosby. 1968. "Transplantation of Marrow to Extramedullary Sites." *Science (New York, N.Y.)* 161 (3836): 54–56. https://doi.org/10.1126/science.161.3836.54.
- Tavor, S., M. Eisenbach, J. Jacob-Hirsch, T. Golan, I. Petit, K. Benzion, S. Kay, et al. 2008. "The CXCR4 Antagonist AMD3100 Impairs Survival of Human AML Cells and Induces Their Differentiation." *Leukemia* 22 (12): 2151–5158. https://doi.org/10.1038/leu.2008.238.
- Tefferi, A., and J. W. Vardiman. 2008. "Classification and Diagnosis of Myeloproliferative Neoplasms: The 2008 World Health Organization Criteria and Point-of-Care Diagnostic Algorithms." *Leukemia* 22 (1): 14–22. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404955.
- Terpstra, W., A. Prins, R. E. Ploemacher, B. W. Wognum, G. Wagemaker, B. Löwenberg, and J. J. Wielenga. 1996. "Long-Term Leukemia-Initiating Capacity of a CD34-Subpopulation of Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 87 (6): 2187–94.
- Terry, R. W., L. Kwee, H. S. Baldwin, and M. A. Labow. 1997. "Cre-Mediated Generation of a VCAM-1 Null Allele in Transgenic Mice." *Transgenic Research* 6 (5): 349–56. https://doi.org/10.1023/a:1018475031852.
- Thomas, E. D., H. L. Lochte, W. C. Lu, and J. W. Ferrebee. 1957. "Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy." *The New England Journal of Medicine* 257 (11): 491–96. https://doi.org/10.1056/NEJM195709122571102.
- Thomas, K. R., K. R. Folger, and M. R. Capecchi. 1986. "High Frequency Targeting of Genes to Specific Sites in the Mammalian Genome." *Cell* 44 (3): 419–28. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90463-0.
- Thomas, Rozario, and Ravindra Majeti. 2019. "No Matter How You Splice It, RBM39 Inhibition Targets Spliceosome Mutant AML." *Cancer Cell* 35 (3): 337–39. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.02.013.
- Thomas, S. M., and J. S. Brugge. 1997. "Cellular Functions Regulated by Src Family Kinases." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 513–609. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.513.
- Till, J. E., and E. A. McCulloch. 1961. "A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells." *Radiation Research* 14 (February): 213–22.

. 1980. "Hemopoietic Stem Cell Differentiation." *Biochimica Et Biophysica Acta* 605 (4): 431–59. https://doi.org/10.1016/0304-419x(80)90009-8.

- Tsirigotis, P., M. Byrne, C. Schmid, F. Baron, F. Ciceri, J. Esteve, N. C. Gorin, et al. 2016. "Relapse of AML after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Methods of Monitoring and Preventive Strategies. A Review from the ALWP of the EBMT." *Bone Marrow Transplantation* 51 (11): 1431–38. https://doi.org/10.1038/bmt.2016.167.
- Ugale, Amol, Gudmundur L. Norddahl, Martin Wahlestedt, Petter Säwén, Pekka Jaako, Cornelis Jan Pronk, Shamit Soneji, Jörg Cammenga, and David Bryder. 2014. "Hematopoietic Stem Cells Are Intrinsically Protected against MLL-ENL-Mediated Transformation." *Cell Reports* 9 (4): 1246–55. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.036.
- Ule, Jernej, Aljaz Ule, Joanna Spencer, Alan Williams, Jing-Shan Hu, Melissa Cline, Hui Wang, et al. 2005. "Nova Regulates Brain-Specific Splicing to Shape the Synapse." *Nature Genetics* 37 (8): 844–52. https://doi.org/10.1038/ng1610.
- Ulyanova, Tatiana, Linda M. Scott, Gregory V. Priestley, Yi Jiang, Betty Nakamoto, Pandelakis A. Koni, and Thalia Papayannopoulou. 2005. "VCAM-1 Expression in Adult Hematopoietic and Nonhematopoietic Cells Is Controlled by Tissue-Inductive Signals and Reflects Their Developmental Origin." *Blood* 106 (1): 86– 94. https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3417.
- Upton, A. C., F. F. Wolff, J. Furth, and A. W. Kimball. 1958. "A Comparison of the Induction of Myeloid and Lymphoid Leukemias in X-Radiated RF Mice." *Cancer Research* 18 (7): 842–48.
- Uy, Geoffrey L., Michael P. Rettig, Ibraheem H. Motabi, Kyle McFarland, Kathryn M. Trinkaus, Lindsay M. Hladnik, Shashikant Kulkarni, et al. 2012. "A Phase 1/2 Study of Chemosensitization with the CXCR4 Antagonist Plerixafor in Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia." *Blood* 119 (17): 3917–24. https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-383406.
- Vassiliou, George S., Jonathan L. Cooper, Roland Rad, Juan Li, Stephen Rice, Anthony Uren, Lena Rad, et al. 2011. "Mutant Nucleophosmin and Cooperating Pathways Drive Leukemia Initiation and Progression in Mice." *Nature Genetics* 43 (5): 470–75. https://doi.org/10.1038/ng.796.
- Velasco-Hernandez, Talia, Petter Säwén, David Bryder, and Jörg Cammenga. 2016. "Potential Pitfalls of the Mx1-Cre System: Implications for Experimental Modeling of Normal and Malignant Hematopoiesis." *Stem Cell Reports* 7 (1): 11–18. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.06.002.
- Velten, Lars, Simon F. Haas, Simon Raffel, Sandra Blaszkiewicz, Saiful Islam, Bianca P. Hennig, Christoph Hirche, et al. 2017. "Human Haematopoietic Stem Cell Lineage Commitment Is a Continuous Process." *Nature Cell Biology* 19 (4): 271–81. https://doi.org/10.1038/ncb3493.
- Verbiest, Tom, Rosemary Finnon, Natalie Brown, Lourdes Cruz-Garcia, Paul Finnon, Grainne O'Brien, Eleanor Ross, Simon Bouffler, Cheryl L. Scudamore, and Christophe Badie. 2018. "Tracking Preleukemic Cells in Vivo to Reveal the Sequence of Molecular Events in Radiation Leukemogenesis." *Leukemia* 32 (6): 1435–44. https://doi.org/10.1038/s41375-018-0085-1.
- Vey, Norbert, Jacques Delaunay, Giovanni Martinelli, Walter Fiedler, Emmanuel Raffoux, Thomas Prebet, Carlos Gomez-Roca, et al. 2016. "Phase I Clinical Study of RG7356, an Anti-CD44 Humanized Antibody, in Patients with Acute Myeloid Leukemia." Oncotarget 7 (22): 32532–42. https://doi.org/10.18632/oncotarget.8687.

- Vose, J. M., M. J. Zhang, P. A. Rowlings, H. M. Lazarus, B. J. Bolwell, C. O. Freytes, S. Pavlovsky, et al. 2001. "Autologous Transplantation for Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma in Patients Never Achieving Remission: A Report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 19 (2): 406–13. https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.2.406.
- Walter, Roland B. 2018. "Investigational CD33-Targeted Therapeutics for Acute Myeloid Leukemia." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 27 (4): 339–48. https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1452911.
- Wang, Eric, Sydney X. Lu, Alessandro Pastore, Xufeng Chen, Jochen Imig, Stanley Chun-Wei Lee, Kathryn Hockemeyer, et al. 2019. "Targeting an RNA-Binding Protein Network in Acute Myeloid Leukemia." *Cancer Cell* 35 (3): 369-384.e7. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.01.010.
- Wang, H. Y., X. Xu, J. H. Ding, J. R. Bermingham, and X. D. Fu. 2001. "SC35 Plays a Role in T Cell Development and Alternative Splicing of CD45." *Molecular Cell* 7 (2): 331–42. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00181-2.
- Weiner, Joshua A., Sonya J. Koo, Stéphane Nicolas, Sandrine Fraboulet, Samuel L. Pfaff, Olivier Pourquié, and Joshua R. Sanes. 2004. "Axon Fasciculation Defects and Retinal Dysplasias in Mice Lacking the Immunoglobulin Superfamily Adhesion Molecule BEN/ALCAM/SC1." *Molecular and Cellular Neurosciences* 27 (1): 59–69. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.06.005.
- Williams, D. E., J. Eisenman, A. Baird, C. Rauch, K. Van Ness, C. J. March, L. S. Park, U. Martin, D. Y. Mochizuki, and H. S. Boswell. 1990. "Identification of a Ligand for the C-Kit Proto-Oncogene." *Cell* 63 (1): 167–74. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90297-r.
- Wilson, Anne, Elisa Laurenti, Gabriela Oser, Richard C. van der Wath, William Blanco-Bose, Maike Jaworski, Sandra Offner, et al. 2008. "Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair." *Cell* 135 (6): 1118–29. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.048.
- Wilson, Anne, Mark J. Murphy, Thordur Oskarsson, Konstantinos Kaloulis, Michael D. Bettess, Gabriela M. Oser, Anne-Catherine Pasche, Christian Knabenhans, H. Robson Macdonald, and Andreas Trumpp. 2004. "C-Myc Controls the Balance between Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation." *Genes & Development* 18 (22): 2747–63. https://doi.org/10.1101/gad.313104.
- Wilson, Anne, and Andreas Trumpp. 2006. "Bone-Marrow Haematopoietic-Stem-Cell Niches." *Nature Reviews. Immunology* 6 (2): 93–106. https://doi.org/10.1038/nri1779.
- Wright, D. E., A. J. Wagers, A. P. Gulati, F. L. Johnson, and I. L. Weissman. 2001.
 "Physiological Migration of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells." *Science* (*New York, N.Y.*) 294 (5548): 1933–36. https://doi.org/10.1126/science.1064081.
- Xie, Mingchao, Charles Lu, Jiayin Wang, Michael D. McLellan, Kimberly J. Johnson, Michael C. Wendl, Joshua F. McMichael, et al. 2014. "Age-Related Mutations Associated with Clonal Hematopoietic Expansion and Malignancies." *Nature Medicine* 20 (12): 1472–78. https://doi.org/10.1038/nm.3733.
- Xue, Liting, John A. Pulikkan, Peter J. M. Valk, and Lucio H. Castilla. 2014. "NrasG12D Oncoprotein Inhibits Apoptosis of Preleukemic Cells Expressing Cbfβ-SMMHC via Activation of MEK/ERK Axis." *Blood* 124 (3): 426–36. https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-541730.

- Yamakawa, Norio, Kazuko Kaneda, Yusuke Saito, Emi Ichihara, and Kazuhiro Morishita. 2012. "The Increased Expression of Integrin A6 (ITGA6) Enhances Drug Resistance in EVI1(High) Leukemia." *PloS One* 7 (1): e30706. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030706.
- Yamamoto, Ryo, Adam C. Wilkinson, and Hiromitsu Nakauchi. 2018. "Changing Concepts in Hematopoietic Stem Cells." *Science (New York, N.Y.)* 362 (6417): 895–96. https://doi.org/10.1126/science.aat7873.
- Yan, Riqiang. 2017. "Physiological Functions of the β-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 and 2." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 97. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00097.
- Yang, Y. Y., G. L. Yin, and R. B. Darnell. 1998. "The Neuronal RNA-Binding Protein Nova-2 Is Implicated as the Autoantigen Targeted in POMA Patients with Dementia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (22): 13254–59. https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.13254.
- Yokota, Takafumi, Kenji Oritani, Stefan Butz, Koichi Kokame, Paul W. Kincade, Toshiyuki Miyata, Dietmar Vestweber, and Yuzuru Kanakura. 2009. "The Endothelial Antigen ESAM Marks Primitive Hematopoietic Progenitors throughout Life in Mice." *Blood* 113 (13): 2914–23. https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-167106.
- Yuan, Y., L. Zhou, T. Miyamoto, H. Iwasaki, N. Harakawa, C. J. Hetherington, S. A. Burel, et al. 2001. "AML1-ETO Expression Is Directly Involved in the Development of Acute Myeloid Leukemia in the Presence of Additional Mutations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (18): 10398–403. https://doi.org/10.1073/pnas.171321298.
- Zeijlemaker, W., A. Kelder, Y. J. M. Oussoren-Brockhoff, W. J. Scholten, A. N. Snel, D. Veldhuizen, J. Cloos, G. J. Ossenkoppele, and G. J. Schuurhuis. 2016. "A Simple One-Tube Assay for Immunophenotypical Quantification of Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia." *Leukemia* 30 (2): 439–46. https://doi.org/10.1038/leu.2015.252.
- Zeijlemaker, Wendelien, Tim Grob, Rosa Meijer, Diana Hanekamp, Angèle Kelder, Jannemieke C. Carbaat-Ham, Yvonne J. M. Oussoren-Brockhoff, et al. 2019. "CD34+CD38- Leukemic Stem Cell Frequency to Predict Outcome in Acute Myeloid Leukemia." *Leukemia* 33 (5): 1102–12. https://doi.org/10.1038/s41375-018-0326-3.
- Zhang, Jiwang, Chao Niu, Ling Ye, Haiyang Huang, Xi He, Wei-Gang Tong, Jason Ross, et al. 2003. "Identification of the Haematopoietic Stem Cell Niche and Control of the Niche Size." *Nature* 425 (6960): 836–41. https://doi.org/10.1038/nature02041.
- Zhang, Xiaofeng, Chuangye Yan, Xiechao Zhan, Lijia Li, Jianlin Lei, and Yigong Shi. 2018. "Structure of the Human Activated Spliceosome in Three Conformational States." *Cell Research* 28 (3): 307–22. https://doi.org/10.1038/cr.2018.14.
- Zhang, Yaping, Fangzhen Xia, Xiaoye Liu, Zhuo Yu, Li Xie, Ligen Liu, Chiqi Chen, et al. 2018. "JAM3 Maintains Leukemia-Initiating Cell Self-Renewal through LRP5/AKT/β-Catenin/CCND1 Signaling." *The Journal of Clinical Investigation* 128 (5): 1737–51. https://doi.org/10.1172/JCI93198.
- Zhao, Meng, Fang Tao, Aparna Venkatraman, Zhenrui Li, Sarah E. Smith, Jay Unruh, Shiyuan Chen, et al. 2019. "N-Cadherin-Expressing Bone and Marrow Stromal

Progenitor Cells Maintain Reserve Hematopoietic Stem Cells." *Cell Reports* 26 (3): 652-669.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.093.

- Ziemin-van der Poel, S., N. R. McCabe, H. J. Gill, R. Espinosa, Y. Patel, A. Harden, P. Rubinelli, S. D. Smith, M. M. LeBeau, and J. D. Rowley. 1991. "Identification of a Gene, MLL, That Spans the Breakpoint in 11q23 Translocations Associated with Human Leukemias." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (23): 10735–39. https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10735.
- Zorko, Nicholas A., Kelsie M. Bernot, Susan P. Whitman, Ronald F. Siebenaler, Elshafa H. Ahmed, Gabriele G. Marcucci, Daniel A. Yanes, et al. 2012. "MII Partial Tandem Duplication and Flt3 Internal Tandem Duplication in a Double Knock-in Mouse Recapitulates Features of Counterpart Human Acute Myeloid Leukemias." *Blood* 120 (5): 1130–36. https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415067.
- Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, and D. R. Littman. 1998. "Function of the Chemokine Receptor CXCR4 in Haematopoiesis and in Cerebellar Development." *Nature* 393 (6685): 595–99. https://doi.org/10.1038/31269.
- Zoughlami, Younes, Carlijn Voermans, Kim Brussen, Karel A. van Dort, Neeltje A. Kootstra, David Maussang, Martine J. Smit, Peter L. Hordijk, and Paula B. van Hennik. 2012. "Regulation of CXCR4 Conformation by the Small GTPase Rac1: Implications for HIV Infection." *Blood* 119 (9): 2024–32. https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-364828.

ANNEXES

ARTICLE ANNEXE 1: Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues

He W, Holtkamp S, Hergenhan SM, Kraus K, de Juan A, Weber J, Bradfield P, <u>Grenier</u> <u>JMP</u>, Pelletier J, Druzd D, Chen CS, Ince LM, Bierschenk S, Pick R, Sperandio M, Aurrand-Lions M, Scheiermann C.

Cet article décrit l'influence des rythmes circadiens sur la migration leucocytaire (cf. introduction chapitre 1.III.5.B). J'ai collaboré à cette étude afin de démontrer que le homing et la mobilisation des cellules leucémiques sont régulés par les rythmes circadiens. Pour répondre à cette question, nous avons injecté des cellules leucémiques (humaine ou murines) dans des récipients soit le soir (ZT13) ou le matin (ZT1) puis nous avons mesuré dans le sang la prise leucémique 1 semaine après l'injection. Nous avons constaté que les souris injectées à ZT13 avaient un taux de greffe significativement augmenté par rapport aux souris injectées a ZT1 de plus la fréquence de blastes circulants était significativement augmentée la nuit. Pris ensemble ces résultats montrent que les rythmes circadiens régulent la circulation et le homing des cellules leucémiques.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans la figure 7 panel C et D.

Immunity

Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues

Graphical Abstract



Highlights

- Leukocyte subsets show time-of-day-dependent migration patterns to organs
- This relies on lineage- and tissue-specific oscillations in promigratory factors
- Loss of circadian clocks in the endothelium or leukocytes ablates rhythmicity
- The efficacy of blocking leukocyte migration is time-of-day dependent

Authors

Wenyan He, Stephan Holtkamp, Sophia Martina Hergenhan, ..., Markus Sperandio, Michel Aurrand-Lions, Christoph Scheiermann

Correspondence

christoph.scheiermann@med. uni-muenchen.de

In Brief

Leukocytes continuously circulate throughout the body. He et al. demonstrate that trafficking patterns of major leukocyte subsets occur in a rhythmic manner dependent on the timeof-day-dependent expression of lineageand tissue-specific factors. This influences the inflammatory response and leukemic tumor burden and translates to the migration behavior of human primary lymphocytes.





Immunity Resource

Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues

Wenyan He,¹ Stephan Holtkamp,¹ Sophia Martina Hergenhan,¹ Kerstin Kraus,¹ Alba de Juan,¹ Jasmin Weber,¹ Paul Bradfield,² Julien Martin Pierre Grenier,³ Jeoffrey Pelletier,³ David Druzd,¹ Chien-Sin Chen,¹ Louise Madeleine Ince,^{1,5} Susanne Bierschenk,¹ Robert Pick,¹ Markus Sperandio,^{1,4} Michel Aurrand-Lions,³ and Christoph Scheiermann^{1,4,5,6,*}

¹Walter Brendel Centre of Experimental Medicine, University Hospital, Ludwig Maximilians University of Munich, BioMedical Centre, 82152 Planegg-Martinsried, Germany

²Mesenflow Technologies SARL, Fondation Eclosion, Geneva, Switzerland

³Aix-Marseille University, Centre National de la Recherche Scientifique, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille, France

⁴DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Munich Heart Alliance, Munich, Germany

⁵Department of Pathology and Immunology, Centre Médical Universitaire, University of Geneva, Switzerland ⁶Lead Contact

*Correspondence: christoph.scheiermann@med.uni-muenchen.de https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.007

SUMMARY

The number of leukocytes present in circulation varies throughout the day, reflecting bone marrow output and emigration from blood into tissues. Using an organism-wide circadian screening approach, we detected oscillations in pro-migratory factors that were distinct for specific vascular beds and individual leukocyte subsets. This rhythmic molecular signature governed time-of-day-dependent homing behavior of leukocyte subsets to specific organs. Ablation of BMAL1, a transcription factor central to circadian clock function, in endothelial cells or leukocyte subsets demonstrated that rhythmic recruitment is dependent on both microenvironmental and cell-autonomous oscillations. These oscillatory patterns defined leukocyte trafficking in both homeostasis and inflammation and determined detectable tumor burden in blood cancer models. Rhythms in the expression of pro-migratory factors and migration capacities were preserved in human primary leukocytes. The definition of spatial and temporal expression profiles of pro-migratory factors guiding leukocyte migration patterns to organs provides a resource for the further study of the impact of circadian rhythms in immunity.

INTRODUCTION

Leukocytes exit the blood by undergoing extensive interactions with endothelial cells. This sequence of events is known as the leukocyte adhesion cascade (Butcher, 1991; Ley et al., 2007; Muller, 2016; Springer, 1994; Vestweber, 2015; Wagner and Frenette, 2008). Circulating leukocytes first tether along endothelial

cells by engaging P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) with E- and P-selectin presented on the endothelium. This process brings the cells in closer proximity to the vessel wall and slows them down to roll along endothelial cells, using PSGL-1 as well as L-selectin to interact with endothelial selectins. During this step, leukocytes come in contact with chemokines presented on the endothelial cell surface. Chemokines engage chemokine receptors on leukocytes, leading to Gai-mediated inside-out signaling of integrins. Integrins extend into a high-affinity conformation and mediate the firm adhesion of leukocytes. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) (CD11a/CD18 or $\alpha L\beta 2$ integrin), macrophage-1 antigen (Mac-1) (CD11b/CD18 or $\alpha M\beta 2$ integrin), and very late antigen-4 (VLA-4) (CD49d/CD29 or $\alpha 4\beta 1$ integrin) play a major role in this step and interact with members of the immunoglobulin superfamily on endothelial cells, primarily intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-2, and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). In the final step, adherent leukocytes crawl along the vessel wall, probe for adequate sites for crossing the endothelium, and emigrate from the vascular lumen into the parenchyma in a process termed transmigration.

The requirement of specific molecules in the leukocyte emigration process is highly dependent on the tissue context and the leukocyte subset involved (Schnoor et al., 2015). Interactions between receptor-ligand pairs of pro-migratory molecules governing the subset-specific migration process of leukocytes to specific organs have been referred to as a homing code (Marelli-Berg et al., 2008; Rot and von Andrian, 2004; Springer, 1994). Although some of these molecular binding partners are known and have been discussed above, the trafficking requirements of many leukocyte subsets are unclear. This is particularly true for the steady state because leukocyte infiltration into organs has mostly been studied in inflammatory scenarios.

Recent data point to the influence of time of day on the number of leukocytes present in the circulation (Casanova-Acebes et al., 2013; Druzd et al., 2017; Nguyen et al., 2013; Scheiermann et al., 2012; Shimba et al., 2018; Suzuki et al., 2016). These circadian rhythms, occurring within a period of approximately 24 h, are





critical in aligning the body to the usual recurring cycles of the environment (Arjona et al., 2012; Curtis et al., 2014; Dibner et al., 2010; Labrecque and Cermakian, 2015; Man et al., 2016; Scheiermann et al., 2018; Scheiermann et al., 2013). The number of leukocytes circulating in blood is largely dependent on two factors: mobilization into blood from organs such as bone marrow, which increases cellularity in blood (input); and emigration from blood into organs, decreasing cellularity in blood (output). Here, we investigated the hypothesis that leukocyte subsets migrate to organs at specific times of the day. By employing this diurnal rhythmicity as a functional screening tool in combination with a systematic approach of adoptive transfer and homing assays, we detected a time-resolved code of promigratory factors for the specific migration behavior of leukocyte subsets to organs. Lineage-specific genetic ablation of the circadian clock demonstrated that endothelial-cell- and leukocyteautonomous oscillations are critical in these processes. These rhythms are relevant in inflammation and determine leukemic tumor burden at specific times. Human primary leukocytes exhibit a similar time-resolved code of pro-migratory factors. The circadian patterns of expression of pro-migratory factors defined here present a resource for the further exploration of how the immune system has adapted to the recurring cycle of the environment and to the relevance of this adaptation in health and disease.

RESULTS

Rhythmic Emigration of Leukocyte Subsets from Blood

Circulating white blood cell (WBC) counts oscillate in murine blood such that they exhibit a peak 5 hr after the onset of light (also known as Zeitgeber time [ZT] 5, i.e., 5 hr after lights on [12 p.m.] in a 12 hr/12 hr light/dark environment) and a trough in the evening (ZT13 or 8 p.m., 1 hr after lights off) (Figure 1A). Numbers of neutrophils, B cells, CD4 and CD8 T cells, natural killer (NK) cells, NK T cells, eosinophils, and inflammatory and non-inflammatory monocytes showed similar peaks and troughs with a 2- to 7-fold change in numbers between the peak and trough depending on the subset (Figure 1A, Figure S1A, and data not shown). We investigated whether a rhythmic leukocyte emigration process could explain the observed oscillations in blood. As an initial screen, we performed "negative" homing assays, where 1 hr after adoptively transferring leukocytes intravenously (i.v.), we quantified the number of transferred cells remaining in the blood to assess emigration of cells across the whole organism. To additionally investigate the influence of a rhythmic microenvironment in this process, we harvested donor cells at one time and transferred them simultaneously into recipients that were kept in shifted light cycles. We saw a clear diurnal rhythm given that the number of labeled donor cells remaining in the blood after transfer was lowest in an evening environment (ZT13) and highest in the morning (ZT1) for all investigated subsets (Figure 1B and Figure S1B). This demonstrated that in the evening more cells had left the blood, for example, by migrating into tissues or by firm contact with the vasculature, both of which effectively removed them from the circulation. Furthermore, it demonstrated a strong influence of rhythmicity in the microenvironment on leukocyte recruitment and numbers in blood in general. We next assessed the role of rhythmicity in leukocytes in this process. This time, donor cells were harvested from mice kept in shifted light cycles and simultaneously injected into recipient mice at one time of the day. In this scenario as well, "evening" cells showed the highest emigration behavior, and "morning" cells generally showed the lowest (Figure 1C). We confirmed these observations by performing reciprocal emigration assays where "morning" or "evening" cells were co-injected into "morning" or "evening" recipients, respectively, with differential color labeling (Figure S1C). These data thus demonstrated that both microenvironment and leukocytes co-contribute to rhythmic leukocyte exit from the circulation, a broad phenomenon that peaks in the evening for all subsets investigated.

Tissue-Specific Oscillations in Endothelial Cell Adhesion Molecules

Because the microenvironment is a strong driver of rhythmic leukocyte emigration from blood (Figure 1B), we performed a screen of multiple organs for oscillatory expression of adhesion molecules on endothelial cells, the initial points of contacts for leukocytes in the emigration process. To achieve this, we harvested multiple organs (thymus, spleen, lymph node, liver, skin, gut, lung, and Peyer's patches) from mice over six time points of the day. We then performed quantitative fluorescence microscopy imaging assays on sections from each organ, which allowed us to minimize variability and compare expression patterns across tissues within the same mice at the same time. This approach yielded a highly tissue-specific temporal expression map for endothelial cell adhesion molecules (Figure 2A and Table S1). Integrating the profiles from all expressed molecules across all organs over time revealed a peak in expression in the evening (Figure 2B). This indicated that endothelial cells within the body (or at least within the eight organs assessed as proxy) had a distinctly higher leukocyte recruitment capacity at this time. This was in line with the negative homing data, which represented highest leukocyte emigration in the evening from blood across the whole organism (Figure 1B). Specifically, ICAM-1 was expressed in every vascular bed analyzed, VCAM-1 was expressed in all but the skin, and both exhibited peaks in expression in the evening (Figure 2C). ICAM-2 was expressed in all organs except spleen and skin, whereas P-selectin

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. All data are represented as mean \pm SEM. See also Figure S1.

Figure 1. Rhythmic Recruitment Is Governed by Both Microenvironment and Leukocytes

⁽A) Total leukocyte and leukocyte subset counts over 24 hr. Zeitgeber time (ZT, time after light onset) 1 is double plotted to facilitate viewing (n = 9–62 mice; oneway ANOVA). WBC, white blood cell; NK, natural killer; IM, inflammatory monocyte; NIM, non-inflammatory monocyte.

⁽B) Diagram of adoptive-transfer assay with rhythmic recipients. Shown are numbers of adoptively transferred donor cells present in the blood of recipient mice 1 hr after transfer over 24 hr. Data are normalized to ZT5 levels (n = 3–25 mice; one-way ANOVA).

⁽C) Diagram of adoptive-transfer assay with rhythmic donors. Shown are numbers of adoptively transferred donor cells present in blood of recipient mice 1 hr after transfer over 24 hr. Data are normalized to ZT5 levels (n = 3–17 mice; one-way ANOVA).



was expressed in all investigated organs but the liver. Expression for both molecules peaked in the evening; however, this was not statistically significant (Figure S2A). In functional assays, we next focused on the molecules that showed oscillations and robust expression levels across organs because these molecules were likely to be critical in mediating rhythmic homing for many of the investigated subsets. Indeed, chronopharmacological blockade with an antibody directed against VCAM-1 in the morning or at night resulted in increased numbers of adoptively transferred cells in the circulation, signifying reduced tissue homing. This additionally ablated their day-night oscillation (Figures 2D and 2E). Blockade with an anti-ICAM-1 antibody increased numbers of neutrophils, T cells, eosinophils, and non-inflammatory monocytes and ablated their rhythmicity but had no effect on inflammatory monocytes (Figures 2D and 2E). This was confirmed genetically with Icam1-deficient recipients (Figures 2F and 2G). Blocking of ICAM-2, E-selectin, or P-selectin, on the other hand, had little or no effect on leukocyte cellularity or oscillations in blood (Figure 2D). Importantly, we generally observed a much more pronounced blocking effect when antibodies were administered in the evening than when they were administered in the morning for both adoptively transferred and endogenous leukocyte populations (Figure 2E and Figure S2B). This established the functional importance of time of day and an oscillatory expression of endothelial cell adhesion molecules for the emigration of leukocyte subsets from blood.

Leukocyte Subset-Specific Oscillations in Pro-migratory Factors

Given that we had additionally identified rhythmicity in leukocytes to govern the emigration process (Figure 1C), we next screened blood leukocyte subsets for an oscillatory expression of adhesion molecules and chemokine receptors. Using flowcytometry analyses across four to six time points of the day, we observed oscillations in adhesion molecules and chemokine receptors, which varied between subsets. Together, they provided a unique rhythmic molecular signature for each lineage (Figure 3A, Figures S3A-S3C, and Table S2). Focusing on the molecules that exhibited the broadest expression and most robust oscillation patterns, we performed functional blocking experiments by using antibodies or functional inhibitors. Numbers of adoptively transferred leukocytes increased in blood most prominently after injection of antibodies directed against CD49d (a4-integrin) or L-selectin (Figure 3B). In contrast, no effect was observed when PSGL-1 or the single β 1- or β 2-integrin subunits were blocked (Figure 3B and data not shown). Analogous to targeting endothelial cell adhesion molecules, we again observed a stronger effect when antibodies were administered in the evening than when they were administered in the morning (Figure 3B). We next assessed the functional relevance of oscillatory expression of chemokine receptors on the surface of leukocyte subtypes. Pre-treatment of morning or evening cells with pertussis toxin before adoptive transfer blocked leukocyte homing and ablated its rhythmicity, indicating leukocyte chemokine receptors to be critically involved in this process (data not shown). Specifically, strong effects on numbers and oscillations of adoptively transferred and endogenous leukocyte populations were observed when AMD3100, an antagonist against CXCR4, was administered (Figures 3C-3E and Figure S3D). In this scenario, leukocyte oscillations ceased in all assessed subtypes, which was also observed when cells were pre-treated with the antagonist ex vivo before adoptive transfer (Figure S3E), with the exception of inflammatory monocytes (Figure 3C). In contrast, blocking other chemokine receptors, including CXCR2 and CCR4 as well as CXCR3, CCR2, and CCR1, did not yield major effects (Figure 3C and data not shown). These data demonstrate the critical requirement of leukocyte adhesion molecules and CXCR4 in the rhythmic leukocyte migration process. In line with these findings, we observed an oscillation of Cxc/12 mRNA expression and the CXCR4 ligand in both bone marrow and the lung (Figure S3F). Of importance, this process could be blocked pharmacologically in a time-of-day-dependent manner through the targeting of pro-migratory factors on endothelial cells or leukocytes (Figure 3F and Figure S3G).

Diurnal Homing Capacity of Leukocyte Subsets to Specific Organs

We next investigated to which organs leukocyte subsets homed over the course of the day. Adoptive transfer of morning or evening cells into phase-matched morning or evening recipients, respectively, demonstrated more leukocyte trafficking to organs in the evening, in line with our data obtained from blood (Figure 4A and Figure S4A). This excluded excessive phagocytosis or death of leukocytes at specific times as a major contributor to the diurnal effects seen in blood in the employed short time frame of 1 hr. We confirmed this by performing reciprocal homing assays where we co-injected morning or evening cells into morning or evening recipients, respectively, by using differential color labeling (Figure S4B). Specifically, we observed more homing to bone marrow, lymph node, spleen, liver, and lung (Figure 4A and Figure S4A). We observed very little homing to other investigated tissues, such as skin, thymus, and gut, in the investigated time

Figure 2. Tissue-Specific Oscillations in Endothelial Cell Adhesion Molecules

⁽A) Map of rhythmic protein expression of endothelial cell-adhesion molecules of various organs (n = 3-6 mice with 6 time points measured each; one-way ANOVA). (B) Integration of all expressed molecules over all organs across the day (n = 3-6 mice with 6 time points measured each; one-way ANOVA).

⁽C) Integration of ICAM-1 and VCAM-1 expression over all organs across the day (n = 3-6 mice with 6 time points measured each; one-way ANOVA).

⁽D) Adoptive transfer of donor cells to recipients treated with functional blocking antibodies directed against the indicated molecules at ZT1 and ZT13. Results are presented as percentages of injected cells (n = 4–12 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to control groups and unpaired Student's t test for comparisons between ZT1 and ZT13 groups).

⁽E) Fold change of donor cells remaining in recipient blood at ZT1 and ZT13 after anti-VCAM-1 or anti-ICAM-1 antibody treatment, respectively, in comparison with numbers of isotype antibody controls (n = 7–11 mice; unpaired Student's t test).

⁽F) Adoptive transfer of donor cells to $lcam 1^{-/-}$ recipients at ZT1 and ZT13 (n = 6–8 mice; unpaired Student's t test).

⁽G) Endogenous blood leukocyte numbers in *Icam1^{-/-}* mice at ZT1 and ZT13 (n = 6–8 mice; unpaired Student's t test).

^{*}p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001; #, ###, #### indicate significance levels analogous to those of control groups. All data are represented as mean ± SEM. ns, not significant; MFI, mean fluorescence intensity. See also Figure S2 and Table S1.

Α Chemokine receptors Adhesion molecules Selectin CX3CR1 CXCR6 CXCR2 CXCR3 CD11b CD49d CCR10 P-JOS CD11a CD11c CD49b CD49e CXCR4 XCRE CD49f CCR9 CD44 CD18 CD29 CCR1 CR2 CCR3 CCR4 CCR5 **DCR6** CR8 SCR7 Nφ 5 Ť в • CD4 CD8 NK Eosø 3 IM 0 NIM 0 Oscillation during 24 hours No oscillation during 24 hours Low/no expression ■ctrl ■CXCR4 ■CXCR2 ■CCR4 ■ PSGL1 ■ L-selectin ■ CD11a ■ CD49d В С Total cells Neutrophils B cells Total cells Neutrophils B cells 2.0 3 6 5 3 % of injected cells 4 1.5 Fold change 2 4 3 2 1.0 2 0.5 1. ₽0 0Ц 0.0 0 ZT 113 113 113 1 13 0 1131131131 1131131131 113 113 113 113 113 113 113 113 CD8 T cells CD8 T cells CD4 T cells NK cells CD4 T cells NK cells 3. 3. 3-4///// 1.0 1.5 -4 Ē ### of injected cells 6 0 injected cells 70 0.7 罪 Fold change 2 1.0 2 2 0.5 0.2 % 0 0.0 0.0 0 1131131131 113 113 113 113 1131131131131 ZT 113 113 113 113 113 113 113 113 IM NIM Eosinophils IM NIM Eosinophils ** ### 2.0 0.6 2.0 4 3 5-% of injected cells 70 70 70 4-Fold change 1.5 3. 1.5--3-1.0 2 1.0 2 0.5 0.5 0 ZT 113113113113 0.0-0.0 0.0 01 0 1 13 113 113 1 13 113113113113 ZT 113 113 113 113 113 113 113 113 113 113 113 113 CD8 IM CD4 NK NIM Total Neutrophils B cells Eosinophils F D ns ZT1 ZT13 ns IIII ns ______ ns ## ns _ # 2.5 6. 5 ۔ ##### 4. 6 4 2.5 3-4 I VCAM-1 4 2.0 2.0 PSGL-1 CAM-🗖 ZT1 🗖 ZT13 3. 3 --Sele CD49 Fold change 4 2-4 1.5 3 1.5 ##### 2. #### 2 Total 🕚 2-1.0 1.0 2 2 5 Nφ 1 0.5 0.5 в َنْ 01 0 0 0 0-0.0 0. 0.0-0 CD4 🕚 Ť## * * ** ř #### * ## ** #### ř #### CD8 ۲ Ε Ę. 81 51 31 5**1** 601 41 61 41 41 # T NK ۲ 4-4. Ī Eold change 3-3-3-6-Eosø 🍤 4 2-40 3-IM Û 2 2-2-4 2-T NIM U 2 20 1. 2 1-1 >2-fold increase <2-fold increase No increase

₽0

0.

0

0

0.

0

0

0.

0

frame of 1 hr (data not shown). Each leukocyte subset exhibited a unique capacity with respect to rhythmic homing to tissues. More CD4 and CD8 T cells, B cells, and neutrophils migrated to the lymph node in the evening than in the morning (Figure S4A). To the liver, enhanced homing of inflammatory monocytes, neutrophils, B cells, and eosinophils was observed (Figure 4A). To the lung, more homing of neutrophils, inflammatory monocytes, B cells, eosinophils, and CD8 T cells was observed (Figure 4A). To the bone marrow, more homing of neutrophils, B cells, inflammatory monocytes, and NK cells was seen, (Figure S4A) and to the spleen, more homing of neutrophils, B cells, and NK cells was detected (Figure 4A).

Because homed cells could have either traversed the endothelium or remained adherent in the vasculature of the respective organ (which would both remove them from the circulation), we additionally assessed the specific location of transferred cells within tissues. To achieve this, we co-injected an anti-CD45 antibody just before perfusion and tissue harvest. This allowed us to distinguish between i.v.-CD45-labeled leukocytes (adherent cells) and non-labeled leukocytes (extravasated cells). In the liver and lung, the vast majority of transferred cells were present in the vasculature (Figure 4B). In contrast, leukocytes in bone marrow, lymph node, and spleen had predominantly traversed the endothelium (Figure 4B and Figure S4C). We confirmed these data by performing imaging analyses of organ whole mounts to visualize the precise location of cells in three dimensions (Figures 4C and 4D). This approach allowed us to additionally assess their locations with respect to organ-intrinsic structures, demonstrating that in the spleen more transferred cells were present in the red pulp than in the white pulp and that cells were extravascular in both areas (Figure 4C and Figure S4D). Together, these data clearly demonstrate a leukocyte-subset-specific capacity in the rhythmic migration to distinct organs.

Chronopharmacological Targeting of Leukocyte Homing to Tissues

We next used the identified targets among pro-migratory factors to assess which leukocyte subset was dependent on which molecule to migrate to which tissue. We built on our previous observations on the time-dependent inhibition of leukocyte emigration from blood (Figure 3F). We therefore performed the experiments in the evening (ZT13) to maximize the outcome of potential blocking effects and thus detect an influence of molecules that might not have been previously implicated in mediating the migration of leukocyte subsets to specific organs (Figures 5A–5I).

As expected for the bone marrow, anti-CXCR4 treatment had the overall strongest blocking effect on all investigated subtypes, with the exception of inflammatory monocytes (Figure 5A). Specifically, this treatment decreased numbers of extravasated cells but increased numbers of adherent leukocytes inside the vasculature, indicating a specific role in the extravasation process in this tissue (Figures 5B and 5I and Figure S5A). VCAM-1 inhibition, on the other hand, showed effects in the extravasation of CD4 and CD8 T cells and both the adhesion and extravasation of B cells given that for the latter, both extravascular and intravascular cell numbers were reduced (Figure 5A and Figure S5A). Blocking ICAM-1 reduced numbers of extravasated B cells, neutrophils, and CD8 T cells (Figure 5A).

In the lymph node, we observed the most dramatic effect with an antibody directed against L-selectin, which reduced the numbers of all investigated subsets at the step of adhesion and extravasation (Figures 5C and 5D and Figure S5B). CD11a and ICAM-1 blockade exhibited a similar, albeit slightly weaker effect, indicating their potential co-dependence in this tissue (Figures 5C and 5D and Figure S5B).

In the spleen, blockade of L-selectin exhibited the strongest effect, particularly on CD8 T cells with additional effects on B cells, neutrophils, and CD4 T cells (Figures 5E and 5F). Blocking CD11a exhibited specific effects on the ability of B cells to transmigrate given that the number of extravasated cells was reduced and the number of adherent cells was increased (Figures 5C and 5D and Figure S5C). Anti-ICAM-1 treatment inhibited B cell and inflammatory monocyte immigration (Figure 5E).

In the liver, numbers of adherent cells could be strongly reduced by interference with VCAM-1 (neutrophils, CD4 T cells, and inflammatory monocytes [IMs]), ICAM-1 (B cells, CD4 and CD8 T cells, and IMs), CXCR4 (CD4 T cells and IMs), or CD49d (IMs) (Figure 5G).

In the lung, numbers of adherent leukocytes could be reduced by blockade of VCAM-1 or ICAM-1 (all subsets except neutrophils), CXCR4, CD49d, or CD11a (B cells, CD4 T cells, and IMs) (Figure 5H).

Figure 3. Leukocyte-Subset-Specific Oscillations in Pro-migratory Molecules

⁽A) Map of rhythmic protein expression of adhesion molecules and chemokine receptors in blood leukocyte subsets (n = 3–6 mice with 4–6 time points measured each; one-way ANOVA).

⁽B) Adoptive transfer of ZT1 and ZT13 donor cells to recipients treated with functional blocking antibodies directed against the indicated molecules at ZT1 and ZT13. Cell numbers are normalized to ZT1 and ZT13 controls (n = 3–12 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to control groups and unpaired Student's t test for comparisons between ZT1 and ZT13 groups).

⁽C) Adoptive transfer of donor cells to recipients treated with antagonists against the indicated molecules at ZT1 and ZT13 (n = 3–10 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to control groups and unpaired Student's t test for comparisons between ZT1 and ZT13 groups).

⁽D) Fold change of donor cells remaining in recipient blood at ZT1 and ZT13 after anti-VCAM-1 and anti-ICAM-1 antibody treatment, respectively, in comparison with numbers of isotype antibody controls. (n = 3 or 4 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to control groups and unpaired Student's t test for comparisons between ZT1 and ZT13 groups).

⁽E) Endogenous blood leukocyte numbers after CXCR4 antagonist treatment (n = 3 or 4 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to control groups and unpaired Student's t test for comparisons between ZT1 and ZT13 groups).

⁽F) Overview of functional blocking effects on adoptively transferred leukocyte subsets in blood targeting the indicated molecules at ZT1 and ZT13 (n = 3–12 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to control groups).

^{*}p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001; ** ##, ###, ####, #### indicate significance levels analogous to those of control groups. All data are represented as mean ± SEM. ns, not significant. See also Figure S3 and Table S2.



Figure 4. Diurnal Homing Capacity of Leukocyte Subsets to Specific Organs

(A) Recruitment of 10^6 adoptively transferred leukocyte subsets into liver, lung, and spleen at ZT1 and ZT13 (liver, n = 10 mice; lung, n = 10 mice; spleen, n = 24–25 mice; unpaired Student's t test).

(B) Recruitment and localization (extravascular or adherent) of 2×10^6 adoptively transferred leukocyte subsets into liver, lung, and spleen at ZT1 and ZT13 (n = 6–12 mice; unpaired Student's t test).

(C) Whole-mount imaging of organs defines the location of donor cells in adoptive-transfer experiments after perfusion. Boxes indicate exemplary cells whose localization within tissues is additionally shown in the z direction. Line graphs of mean fluorescence intensities (MFI) show their localization inside or outside the vasculature. Scale bars: 150 µm (overviews for liver, bone marrow [BM], lung, and spleen], 200 µm (for lymph node [LN]), 50 µm (low magnification), and 10 µm (high magnification).

(D) Quantification of numbers and localization of total transferred cells is based on whole-mount imaging of organs (n = 3 mice; unpaired Student's t test). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. All data are represented as mean ± SEM. See also Figure S4.



Together, these data demonstrate that pro-migratory factors on endothelial cells and leukocytes govern time-of-day-dependent migration, thereby identifying a circadian signature that determines leukocyte migration to tissues (Figure 5J and Figure S5D).

Lineage-Specific Clock Deficiency Ablates Migration Rhythms

We next investigated the relevance of a functional clock in the rhythmic trafficking behavior of immune cells. We first focused on the microenvironment by using Cdh5^{CreERT2}Bmal1^{flox/flox} mice to specifically delete the circadian gene brain and muscle Arnt-like protein-1 (Bmal1, also known as Arntl) in endothelial cells (Wang et al., 2010). Bmal1 is a core component of the cellular clockwork and the only single gene whose deficiency causes an ablation of circadian rhythmicity (Storch et al., 2007). Using these mice as recipients, we performed homing experiments and quantified the amount of adoptively transferred cells that remained in the blood. Interestingly, whereas control mice showed fewer transferred cells in the circulation in the evening, mice with Bmal1-deficient endothelial cells showed no difference between time points for all subsets examined (Figure 6A). We next investigated whether rhythmic homing to tissues was also ablated. Indeed, in the two organs displaying the strongest oscillations, the lung and liver, time-of-day differences were lost (Figure 6B). These observations were associated with strongly reduced evening expression of ICAM-1 and VCAM-1 in the liver and lung, respectively, of mice with Bmal1^{-/-} endothelial cells (Figure 6C). This genetically demonstrates the relevance of oscillations in the microenvironment and indicates that within tissues, the endothelial-cell-specific clock plays a critical role in governing rhythmic leukocyte recruitment.

To assess the influence of clocks in leukocytes in this phenomenon, we used Cd19^{Cre}Bmal1^{flox/flox} mice as donors to evaluate the homing capacity of clock-deficient B cells. Transferred Bmal1^{-/-} B cells exhibited no more time-dependent homing to the spleen or lymph nodes of wild-type recipients (Figure 6D). In addition, Bmal1-/- B cells displayed diminished oscillations in the clock gene Nr1d1 (Rev-Erba) (Figure 6E) and reduced surface amounts of CD11a and CD49d (Figure 6F), as well as CCR7 and CXCR5 (but not CXCR4 or L-selectin) (Figure S6A and data not shown). Using Lyz2^{Cre}Bmal1^{flox/flox} mice to target the clock in myeloid cells, we also observed a lack of oscillations in the migration behavior of donor neutrophils to the spleen of wildtype recipients (Figure 6G). $Bmal1^{-/-}$ neutrophils (Figure 6H) and monocytes (Figure S6B) displayed altered Nr1d1 expression. Neutrophils exhibited lower expression of PSGL-1 (Figure 6I), whereas monocytes showed altered amounts of L-selectin (Sell), CCR2, and CD18 integrin (Figures S6B and S6C). Together, these data genetically demonstrate that both endothelial cell and

leukocyte clocks are critically required for a rhythmic homing process by regulating the expression of pro-migratory factors.

Relevance of Rhythmic Leukocyte Trafficking in Inflammation and Leukemia

We next explored the relevance of oscillatory leukocyte trafficking for the immune response by using a systemic inflammatory challenge with intraperitoneally injected lipopolysaccharide (LPS). After acute stimulation, leukocyte counts in blood exhibited a dramatic drop, but time-of-day differences of leukocyte subsets, which exhibited lower numbers in the evening for all investigated subsets, were preserved (Figure 7A). This indicates the importance of rhythmic leukocyte migration for the strength of the immune response given that, indeed, tissue infiltration into the peritoneal cavity was rhythmic (Figure S7A). In addition, the administration of antibodies directed against VCAM-1, ICAM-1, or CD49d was able to block this effect in a subset-specific manner, whereas anti-CD11a treatment exhibited no effect. Even after the use of inflammatory challenge, antibodies exerted a stronger inhibitory effect on leukocyte emigration from blood at night (Figures 7A and 7B). Together, these data indicate the relevance of oscillatory leukocyte migration in determining the strength of the immune response.

We additionally explored a disease model by using a leukemia cancer model where tumor burden is measured in blood. We used both a syngeneic and a xenogeneic model of acute myeloid leukemia (AML) and B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). In the syngeneic model, CD45.1⁺ wild-type mice were injected i.v. with 5×10^{6} CD45.2⁺ C1498 (AML) or BS50 (B-ALL) cells either in the morning (ZT1) or in the evening (ZT13). After 1 week, we measured numbers of circulating AML or B-ALL blasts at midday on the basis of CD45.2 expression to allow the assessment of the influence of the time of day of administration only and not the harvest. Interestingly, the rate of engraftment, defined as more than one blast per microliter, was much higher in the evening for both models (5/16 in the morning versus 13/16 in the evening), and circulating blasts were significantly higher at night than in the morning (Figure 7C). This indicates that homing and engraftment of leukemic cells is strongly time-of-day dependent. Because rhythms in the host immune response might influence tumor burden in a time-of-day-dependent manner, we additionally employed a xenogeneic model by using immune-deficient nonobese diabetic (NOD) scid Il2rg^{-/-} (NSG) mice, which have no functional adaptive immune system and lack functional NK cells. We injected 5×10^{6} NALM-6 cells, a human B-ALL cell line, either in the morning or in the evening. After 1 week, numbers of circulating human blasts at midday were significantly higher when cells had been injected at night (Figure 7D), confirming that time-ofday-dependent recruitment and engraftment are highly relevant for tumor burden.

Figure 5. Chronopharmacological Targeting of Leukocyte Homing to Tissues

(A-H) Adoptive transfer of donor cells to the bone marrow (A and B), lymph node (C and D), spleen (E and F), liver (G), and lung (H) of recipients treated with functional blocking antibodies or antagonists directed against the indicated molecules at ZT13. Cell numbers are normalized to control numbers (n = 4–8 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to the control group). Localization of transferred cells in the bone marrow (B), lymph node (D), and spleen (F) is normalized to control localization (n = 4–8 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to the control group).

(I) Images and quantification of localization of donor cells in bone marrow after CXCR4 blockade. Boxes indicate exemplary cells whose localization within tissues is additionally shown in the z direction (n = 3 mice; unpaired Student's t test). Scale bars: 10 µm.

(J) Overview of functional blocking effects on leukocyte recruitment to organs, targeting the indicated molecules (n = 4–8 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to the control group).

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. All data are represented as mean ± SEM. See also Figure S5.

A □ control ■ Bmal1-/- EC



Figure 6. Lineage-Specific Clock Deficiency Ablates Migration Rhythms

(A) Numbers of adoptively transferred donor cells present in the blood of control recipients or recipients with *Bmal1*-deficient endothelial cells 1 hr after transfer at ZT1 and ZT13 (n = 3 or 4 mice; unpaired Student's t test).

(B) Adoptive transfer of donor cells to the liver and lung of control recipients or recipients with *Bmal1*-deficient endothelial cells 1 hr after transfer at ZT1 and ZT13 (n = 5 mice; unpaired Student's t test).

(C) Expression of endothelial cell ICAM-1 and VCAM-1 in liver and lung of control mice and mice with *Bmal1*-deficient endothelial cells at ZT1 and ZT13 (n = 4–7 mice: one-way ANOVA).

(D) Adoptive transfer of control or *Bmal1*-deficient B cells to the spleen and lymph node of wild-type recipients 1 hr after transfer at ZT1 and ZT13 (n = 6 mice; unpaired Student's t test).

(E) qPCR analysis of N1rd1 mRNA expression in isolated control and Bmal1-deficient B cells (n = 3 mice; one-way ANOVA).

(F) CD11a and CD49d expression on control and Bmal1-deficient B cells in blood at ZT13 (n = 8 mice; unpaired Student's t test).

(G) Adoptive transfer of control or *Bmal1*-deficient neutrophils to the spleen of wild-type recipients 1 hr after transfer at ZT1 and ZT13 (n = 6 mice; unpaired Student's t test).

(H) qPCR analyses of N1rd1 mRNA expression in isolated control and Bmal1-deficient neutrophils (n = 3 mice; one-way ANOVA).

(I) PSGL-1 expression on control and Bmal1-deficient neutrophils in blood at ZT13 (n = 4 or 5 mice; unpaired Student's t test).

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. All data are represented as mean ± SEM. ns, not significant. See also Figure S6.

Rhythms in Human Leukocyte Migration

We finally investigated the presence of oscillations in leukocyte trafficking for humans. Using flow cytometry of human blood harvested over five time points of the day, we found that total WBC was oscillatory but had an inverted pattern compared with the one observed in mice, namely higher numbers in the evening (7 p.m.) and a trough in the morning (Figures S7B–S7C), in line with previous observations (Born et al., 1997). Within leukocyte subsets, we observed the strongest oscillations in B cells (Figure 7E) as well as CD4 and CD8 T cells (Figure S7C),



Figure 7. Relevance of Rhythmic Leukocyte Trafficking in Inflammation, Leukemia, and Humans

(A) Blood leukocyte numbers after acute treatment without (ctrl) or with LPS in combination with functional blocking antibodies directed against the indicated molecules at ZT1 and ZT13 (n = 3–12 mice; one-way ANOVA followed by Dunnett comparison to the LPS group and unpaired Student's t test for comparisons between ZT1 and ZT13 groups).

(B) Overview of functional blocking effects on leukocyte subsets in blood after LPS treatment targeting the indicated molecules at ZT1 and ZT13 (n = 3–12 mice; one-way ANOVA).

(C) Numbers of circulating blasts present in the blood of C57BL/6J CD45.1 recipients at midday 1 week after engraftment at ZT1 and ZT13 with mouse C1498 (AML) or BS50 (B-ALL) cells (n = 7 or 8 mice; Mann-Whitney test).

(D) Numbers of circulating blasts present in the blood of NSG recipient mice at midday 1 week after engraftment at ZT1 and ZT13 with human NALM-6 B-ALL cells (n = 8 mice; unpaired Student's t test).

(E) Oscillation of blood B cell numbers in human blood (n = 8 subjects; repeated-measures one-way ANOVA).

(F) CXCR4 expression on human B cells over 24 hr (n = 8 subjects; repeated-measures one-way ANOVA).

(G) Transendothelial migration (TEM) capacity of human primary B cells harvested from three donors at 11 a.m. and 7 p.m. across HUVECs. Numbers are normalized to 11 a.m. levels (n = 4 assays; unpaired Student's t test).

(H and I) Blocking efficacy of AMD3100 (H) or an anti-LFA-1 antibody (I) on TEM capacity of human primary B cells harvested at 11 a.m. and 7 p.m. Numbers are normalized to and compared with those of vehicle and isotype controls, respectively (n = 3 donors; unpaired Student's t test).

and other populations showed a similar trend (Figure S7C). Similar to murine cell numbers, neutrophil numbers peaked during the day (Figure S7C). With the exception of neutrophils, higher amounts of subsets in blood were inversely correlated with CXCR4 amounts (Figure 7F and Figure S7D), indicating that molecules we found to be of key importance in mice were also most likely responsible for driving rhythmic leukocyte migration processes in humans. We therefore assessed the rhythmic migratory capacity of human primary B cells (Bradfield et al., 2007) because these showed the strongest oscillations among subsets. Interestingly, blood B cells harvested in the morning exhibited a significantly higher rate of transmigration across human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) than cells harvested from the same donors at night (Figure 7G). Strikingly, this process could be blocked efficiently in the morning by the CXCR4 antagonist AMD3100 or an antibody directed against LFA-1, whereas no significant effect was observed at night (Figures 7H-7K). Thus, these data demonstrate that human leukocytes have a rhythmic homing capacity that peaks at inverse times compared with those in mice but uses analogous molecules in the process. Altogether, we describe here a circadian signature that guides rhythmic leukocyte homing in mice and humans in steady-state, inflammation, and disease conditions.

DISCUSSION

Here, we have shown a broad and rhythmic program that governs the migration patterns of leukocyte subsets throughout the body over the course of the day. We have determined an organ- and leukocyte-subset-specific functional rhythmic signature of pro-migratory factors on endothelial cells and leukocytes. Rhythmicity in both the endothelium and leukocyte contributes to this process given that a genetically induced lack of a functional clock in either ablates time-of-day differences. We have thus identified an extensive, time-of-daydependent trafficking zip code that guides migration of leukocytes to organs.

The process of leukocyte migration to tissues has long been studied, and multiple molecules have been implicated (Ley et al., 2007; Muller, 2016; Vestweber, 2015; Wagner and Frenette, 2008). Yet, no broad systematic approach has been undertaken for investigating the effects of multiple molecules, leukocyte subsets, and organs, particularly under non-inflammatory, steady-state conditions and with respect to the time of day. We incorporated the element of time to identify potential phases of the day when leukocyte migration to tissues and its blockade would show maximal effects. We determined this time to be the evening, or more precisely 1 hr after lights off, when mice are at the beginning of the behavioral activity phase.

The broad expression profile of VCAM-1 across all organs and its functional implications for the migration of many leukocyte subsets in steady-state conditions were unexpected given that previous studies had generally associated the molecule with inflammatory scenarios (Schnoor et al., 2015). Indeed, our data indicate that during the day, when most other studies were probably performed, VCAM-1 is hardly expressed and plays no functional role. However, expression of VCAM-1 increases over the day and exhibits a function in the evening. Thus, our approach allowed us to identify roles for molecules that had previously not been implicated in the migration of specific leukocyte subsets to organs.

For each organ and leukocyte subset, we detected a very distinct molecular homing signature. Blood leukocyte counts and bone marrow recruitment were strongly governed by CXCR4, which affected the migration of all investigated leukocyte subsets, with the exception of inflammatory monocytes. In other organs, the dependency on CXCR4 was reduced and much more subset specific. In addition to the known effect of VCAM-1 and VLA-4 in bone marrow homing, targeting ICAM-1 exhibited a broad inhibitory effect on many investigated subsets, with the exception of CD4 T cells and IMs. In addition, we also detected a role for L-selectin in neutrophil homing to this tissue. To our knowledge, ICAM-1 and L-selectin have previously not been associated with bone marrow homing given that the classical homing receptors on the endothelium consist of VCAM-1, E-selectin, and P-selectin (Mazo et al., 1998).

In the lymph node, an almost complete lack of homing was observed for all leukocyte subsets when L-selectin was blocked, in agreement with previous reports (Arbonés et al., 1994; Gallatin et al., 1983). L-selectin was also the dominant molecule regulating leukocyte migration to the spleen, particularly for CD8 T cells, which is an unexpected finding given that previous reports have not implicated a role for this molecule in this organ (Nolte et al., 2002). Also, in the lymph node we found a significant number of neutrophils and inflammatory monocytes, subsets that have generally not been investigated in this tissue under steady-state conditions (Gorlino et al., 2014; Hampton and Chtanova, 2016). Trafficking of neutrophils to the lymph node was dependent on L-selectin, CD11a, CXCR4, ICAM-1, and CD49d, whereas IMs relied mostly on L-selectin. The presence of small but detectable populations in this tissue expands the known trafficking routes of these subsets, particularly of the short-lived neutrophils. The functional relevance of their presence in steady-state conditions in lymph nodes for immune functions remains to be elucidated.

Although to our knowledge details on molecules mediating adhesion in the liver and lung under steady-state conditions are currently lacking for neutrophils and monocytes (Doyle et al., 1997; Lee and Kubes, 2008; Looney and Bhattacharya, 2014; Moreland et al., 2002; Rossaint and Zarbock, 2013), we found a small role for VCAM-1 in neutrophil recruitment in the liver. This finding is of physiological relevance because it is the likely explanation for the observed higher numbers of transferred neutrophils in blood when VCAM-1 is blocked. VCAM-1, ICAM-1, VLA-4, and CXCR4 strongly regulated homing of monocytes to

⁽J and K) Example of the TEM capacity of human B cells from one patient at 11 a.m. and 7 p.m. after AMD3100 (J) or anti-LFA-1 treatment (K) plotted over time (n = 4 assays; two-way ANOVA with Tukey post-test).

^{*}p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.001; ** *** p < 0.0001; **, ##. ### indicate significance levels analogous to those of the LPS groups. All data are represented as mean ± SEM. ns, not significant. See also Figure S7.

the liver, a finding very similar to that in the lung, where additional effects on LFA-1 were observed. Although the functional importance for VLA-4, VCAM-1, and ICAM-1 has been shown for CD8 T cells in the liver before (Bertolino et al., 2005; John and Crispe, 2004), we have now extended these observations to inflammatory monocytes. An interesting effect that we observed was that targeting VLA-4 increased numbers of B cells in this tissue. Also, blockade of L-selectin increased neutrophil adhesion. This indicates that in a scenario of leukocytosis induced by targeting VLA-4 (most likely due to effects in the bone marrow), B cells accumulate in the liver in an unspecific manner. In contrast, whereas blocking VCAM-1 showed a similar reduction on B cell homing to the bone marrow, more B cells accumulated in the spleen in this scenario. This demonstrates the distribution dynamics and the highly tissue- and subset-specific nature of the leukocyte homing process.

The high number of organs, leukocyte subsets, and molecules investigated prevented us from performing functional migration analyses for tissues where little homing occurred. In addition, combining the effects of multiple antibodies or antagonists to assess overlapping functions was outside the scope of this study. Our initial screening procedure in blood allowed us to detect the more dramatic, organism-wide effects, whereas smaller, tissue-specific effects might not have been detectable in some cases. We additionally focused here on events occurring at the blood-tissue interphase as the gate-keeping mechanism for leukocyte infiltration to tissues and thus did not investigate broad chemokine profiles of organs (with the exception of Cxcl12), something that would be strongly dependent on other tissue-resident cells, such as fibroblasts (Parsonage et al., 2005). Another important factor that we did not investigate is the heterogeneity of leukocyte subpopulations in blood. Neutrophils are probably the most heterogeneous population with respect to their age as a result of their relatively short lifespan compared with that of other subsets. Thus, most neutrophils present in blood in the morning are probably just mobilized from the bone marrow and thus represent young cells, whereas in the evening this subset has already aged significantly (Casanova-Acebes et al., 2013; Zhang et al., 2015). In contrast, most lymphocytes are a mixture of cells released from the thymus or bone marrow and cells that have reached the blood from the lymph and thus have spent a significant amount of time before in tissues. Our markers did not allow for further specification within individual leukocyte subsets. Therefore, which subsets are more prominently affected by our pharmacological interventions could not be addressed. At least for T lymphocytes, however, we have previously observed that naive, effector memory and central memory cells behave very similarly with respect to their oscillations in the blood (Druzd et al., 2017). These questions should be addressed in follow-up studies focusing on specific tissues and leukocyte subsets.

We found that time of day for antibody and antagonist administration had a great impact on their efficacy in steady-state conditions and after inflammatory challenge. In fact, for VCAM-1 and L-selectin, as well as for some subsets for CD49d, CXCR4, and ICAM-1, we hardly observed any effect in the morning. This provides a potential window for therapy with respect to targeting leukocyte trafficking at specific times. Current clinical therapeutic approaches targeting leukocyte surface molecules include natalizumab (Tysabri), a neutralizing antibody that acts against the α_4 subunit of VLA-4 and is used in the treatment of multiple sclerosis (Krumbholz et al., 2012). This drug is currently given at one time point of the day, but future studies should investigate the effect of timing drug administration in this scenario. Relapses in patients with multiple sclerosis are negatively correlated with the abundance of the night-signaling hormone melatonin in the serum (Farez et al., 2015). This is linked to a seasonal exacerbation of symptoms in the spring (Farez et al., 2015). Multiple sclerosis could additionally have a diurnal component to it given that the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal model of multiple sclerosis shows strong time-of-day dependency in disease severity (Druzd et al., 2017; Sutton et al., 2017).

An important finding of this study is the fact that homing and engraftment capacities of leukemic cancer cells lines, both murine and human, are highly time-of-day dependent, given that administration of cells in the evening dramatically increased tumor burden a week later. This was not dependent on potential rhythmic immunogenicity of the graft because similar effects were observed in immune-deficient and immune-competent animals. Thus, time of day is an important factor for leukemia burden in mouse and human models of this disease.

These observations are of particular relevance given that we showed that rhythms in leukocyte homing extend to humans, where an inverse rhythmicity in blood leukocyte counts, particularly for lymphocyte populations, was observed. The variability between subjects was surprisingly small, given that the genetic differences between individuals are vastly greater than those between inbred mice used and that feeding and lighting schedules had not been synchronized. The strongly time-of-daydependent transmigration capacity of human B cells could be blocked by the targeting of CXCR4, which we demonstrate to be rhythmically expressed on this subset, as well as that of LFA-1. This indicates the benefit of a chronotherapeutic approach for targeting either protein in the clinic. Indeed, targeting the CXCR4-CXCL12 axis with G-CSF has already been demonstrated to more strongly mobilize hematopoietic stem and progenitor cells in the afternoon (Lucas et al., 2008).

The inverse rhythmicity of human oscillations has thus far been linked to the altered behavioral rhythms of mice and humans such that it yields higher levels during the behavioral rest phase in both nocturnal (mice) and diurnal (humans) species. Recent data, however, demonstrate that rhythmicity in blood leukocyte counts can be decoupled from behavior and relies on reactive oxygen species in a manner independent of the microenvironment (Zhao et al., 2017). Our data demonstrate that both endothelial cells and leukocytes themselves co-govern rhythmic leukocyte migration but that lack of a clock in either is sufficient in disturbing it. The observations that a high number of pro-migratory factors display diurnal oscillations point to a role of the circadian clock in their regulation. Many of these factors exhibit binding sites for transcription factors BMAL1 and CLOCK in their promoter regions, which warrants further systematic investigations into the direct clock control of these molecules. Interplay between cell-intrinsic and -extrinsic signals appears to regulate total blood cellularity, most likely by modulating both the mobilization of cells into the circulation and the emigration, the latter of which was the subject of the present study.
STAR***METHODS**

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENT MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Mice
 - Humans
- METHOD DETAILS
 - Flow cytometry
 - Functional blocking experiments and induction of inflammation
 - Adoptive transfer assays
 - Cell isolation and Q-PCR
 - Immunofluorescence staining
 - Leukemic models
 - Transmigration assay of human B cells
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures and two tables and can be found with this article online at https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.007.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the German Research Foundation (DFG) (Emmy-Noether grant SCHE 1645/2-1 and SFB914 projects B01, B09, and Z03), the German Centre for Cardiovascular Research (DZHK), and the German Ministry of Education and Research (BMBF), in addition to a European Research Council starting grant (635872, CIRCODE), the Integrated Cancer Research Site of Marseille (Inca-Inserm-DGOS 6038), and funding from the International Max Planck Research School. Additional support came from the Core Facility for Animal Models of the Ludwig Maximilians University Biomedical Center and the animal facility of the Walter Brendel Centre of Experimental Medicine. We thank Ralf Adams (Münster) and Eloi Montanez (Munich) for providing animals.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

W.H. designed and performed experiments, analyzed results, and wrote the manuscript. S.H., S.M.H., K.K., A.d.J., J.W., D.D., C.C., L.M.I., S.B., R.P., and M.S. performed experiments. S.H. and K.K. performed imaging analyses. J.W. created the overview matrices. P.B. performed transmigration assays of human B cells. J.M.P.G., J.P., and M.A.-L. designed and performed experiments with leukemic models. C.S. designed and supervised the study, performed experiments, analyzed results, discussed data, and wrote the manuscript. All authors provided valuable inputs on the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: April 30, 2018 Revised: August 7, 2018 Accepted: October 2, 2018 Published: December 4, 2018

REFERENCES

Arbonés, M.L., Ord, D.C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D.J., and Tedder, T.F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte

rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. Immunity 1, 247-260.

Arjona, A., Silver, A.C., Walker, W.E., and Fikrig, E. (2012). Immunity's fourth dimension: approaching the circadian-immune connection. Trends Immunol. *33*, 607–612.

Bertolino, P., Schrage, A., Bowen, D.G., Klugewitz, K., Ghani, S., Eulenburg, K., Holz, L., Hogg, N., McCaughan, G.W., and Hamann, A. (2005). Early intrahepatic antigen-specific retention of naïve CD8+ T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice. Hepatology *42*, 1063–1071.

Born, J., Lange, T., Hansen, K., Mölle, M., and Fehm, H.L. (1997). Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. J. Immunol. *158*, 4454–4464.

Bradfield, P.F., Scheiermann, C., Nourshargh, S., Ody, C., Luscinskas, F.W., Rainger, G.E., Nash, G.B., Miljkovic-Licina, M., Aurrand-Lions, M., and Imhof, B.A. (2007). JAM-C regulates unidirectional monocyte transendothelial migration in inflammation. Blood *110*, 2545–2555.

Butcher, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. Cell *67*, 1033–1036.

Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., et al. (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. Cell *153*, 1025–1035.

Curtis, A.M., Bellet, M.M., Sassone-Corsi, P., and O'Neill, L.A. (2014). Circadian clock proteins and immunity. Immunity 40, 178–186.

Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. Annu. Rev. Physiol. *72*, 517–549.

Doyle, N.A., Bhagwan, S.D., Meek, B.B., Kutkoski, G.J., Steeber, D.A., Tedder, T.F., and Doerschuk, C.M. (1997). Neutrophil margination, sequestration, and emigration in the lungs of L-selectin-deficient mice. J. Clin. Invest. *99*, 526–533.

Druzd, D., Matveeva, O., Ince, L., Harrison, U., He, W., Schmal, C., Herzel, H., Tsang, A.H., Kawakami, N., Leliavski, A., et al. (2017). Lymphocyte circadian clocks control lymph node trafficking and adaptive immune responses. Immunity *46*, 120–132.

Farez, M.F., Mascanfroni, I.D., Méndez-Huergo, S.P., Yeste, A., Murugaiyan, G., Garo, L.P., Balbuena Aguirre, M.E., Patel, B., Ysrraelit, M.C., Zhu, C., et al. (2015). Melatonin contributes to the seasonality of multiple sclerosis relapses. Cell *162*, 1338–1352.

Gallatin, W.M., Weissman, I.L., and Butcher, E.C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. Nature *304*, 30–34.

Gorlino, C.V., Ranocchia, R.P., Harman, M.F., García, I.A., Crespo, M.I., Morón, G., Maletto, B.A., and Pistoresi-Palencia, M.C. (2014). Neutrophils exhibit differential requirements for homing molecules in their lymphatic and blood trafficking into draining lymph nodes. J. Immunol. *193*, 1966–1974.

Hampton, H.R., and Chtanova, T. (2016). The lymph node neutrophil. Semin. Immunol. 28, 129–136.

John, B., and Crispe, I.N. (2004). Passive and active mechanisms trap activated CD8+ T cells in the liver. J. Immunol. *172*, 5222–5229.

Krumbholz, M., Derfuss, T., Hohlfeld, R., and Meinl, E. (2012). B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. Nat. Rev. Neurol. *8*, 613–623.

Labrecque, N., and Cermakian, N. (2015). Circadian clocks in the immune system. J. Biol. Rhythms *30*, 277–290.

Lee, W.Y., and Kubes, P. (2008). Leukocyte adhesion in the liver: distinct adhesion paradigm from other organs. J. Hepatol. *48*, 504–512.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. *7*, 678–689.

Looney, M.R., and Bhattacharya, J. (2014). Live imaging of the lung. Annu. Rev. Physiol. *76*, 431–445.

Lucas, D., Battista, M., Shi, P.A., Isola, L., and Frenette, P.S. (2008). Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. Cell Stem Cell 3, 364–366.

Man, K., Loudon, A., and Chawla, A. (2016). Immunity around the clock. Science 354, 999–1003.

Marelli-Berg, F.M., Cannella, L., Dazzi, F., and Mirenda, V. (2008). The highway code of T cell trafficking. J. Pathol. *214*, 179–189.

Mazo, I.B., Gutierrez-Ramos, J.C., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D., and von Andrian, U.H. (1998). Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. J. Exp. Med. *188*, 465–474.

Moreland, J.G., Fuhrman, R.M., Pruessner, J.A., and Schwartz, D.A. (2002). CD11b and intercellular adhesion molecule-1 are involved in pulmonary neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced airway disease. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *27*, 474–480.

Muller, W.A. (2016). Transendothelial migration: unifying principles from the endothelial perspective. Immunol. Rev. 273, 61–75.

Nguyen, K.D., Fentress, S.J., Qiu, Y., Yun, K., Cox, J.S., and Chawla, A. (2013). Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. Science *341*, 1483–1488.

Nolte, M.A., Hamann, A., Kraal, G., and Mebius, R.E. (2002). The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. Immunology *106*, 299–307.

Parsonage, G., Filer, A.D., Haworth, O., Nash, G.B., Rainger, G.E., Salmon, M., and Buckley, C.D. (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. Trends Immunol. *26*, 150–156.

Rossaint, J., and Zarbock, A. (2013). Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. J. Innate Immun. 5, 348–357.

Rot, A., and von Andrian, U.H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu. Rev. Immunol. *22*, 891–928.

Scheiermann, C., Kunisaki, Y., Lucas, D., Chow, A., Jang, J.E., Zhang, D., Hashimoto, D., Merad, M., and Frenette, P.S. (2012). Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. Immunity 37, 290–301.

Scheiermann, C., Kunisaki, Y., and Frenette, P.S. (2013). Circadian control of the immune system. Nat. Rev. Immunol. *13*, 190–198.

Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L., and Loudon, A. (2018). Clocking in to immunity. Nat. Rev. Immunol. 18, 423–437.

Schnoor, M., Alcaide, P., Voisin, M.B., and van Buul, J.D. (2015). Crossing the vascular wall: common and unique mechanisms exploited by different leukocyte subsets during extravasation. Mediators Inflamm. *2015*, 946509.

Shimba, A., Cui, G., Tani-Ichi, S., Ogawa, M., Abe, S., Okazaki, F., Kitano, S., Miyachi, H., Yamada, H., Hara, T., et al. (2018). Glucocorticoids drive diurnal oscillations in T cell distribution and responses by inducing interleukin-7 receptor and CXCR4. Immunity *48*, 286–298.e6.

Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell *76*, 301–314.

Storch, K.F., Paz, C., Signorovitch, J., Raviola, E., Pawlyk, B., Li, T., and Weitz, C.J. (2007). Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. Cell *130*, 730–741.

Sutton, C.E., Finlay, C.M., Raverdeau, M., Early, J.O., DeCourcey, J., Zaslona, Z., O'Neill, L.A.J., Mills, K.H.G., and Curtis, A.M. (2017). Loss of the molecular clock in myeloid cells exacerbates T cell-mediated CNS autoimmune disease. Nat. Commun. *8*, 1923.

Suzuki, K., Hayano, Y., Nakai, A., Furuta, F., and Noda, M. (2016). Adrenergic control of the adaptive immune response by diurnal lymphocyte recirculation through lymph nodes. J. Exp. Med. *213*, 2567–2574.

Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. Nat. Rev. Immunol. 15, 692–704.

Wagner, D.D., and Frenette, P.S. (2008). The vessel wall and its interactions. Blood *111*, 5271–5281.

Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M.E., Schmidt, T.S., Bochenek, M.L., Sakakibara, A., Adams, S., Davy, A., Deutsch, U., Lüthi, U., et al. (2010). Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. Nature 465, 483–486.

Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J.J., Burk, R.D., Kunisaki, Y., Jang, J.E., Scheiermann, C., et al. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. Nature *525*, 528–532.

Zhao, Y., Liu, M., Chan, X.Y., Tan, S.Y., Subramaniam, S., Fan, Y., Loh, E., Chang, K.T.E., Tan, T.C., and Chen, Q. (2017). Uncovering the mystery of opposite circadian rhythms between mouse and human leukocytes in humanized mice. Blood *130*, 1995–2005.

STAR***METHODS**

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-mouse CD3, PE/DZL594, clone 17A2	Biolegend	Cat# 100246, RRID: AB_2565883
Anti-mouse CD3ε, Alexa Fluor® 488, clone 145-2C11	Biolegend	Cat# 100321, RRID: AB_389300
Anti-mouse CD4, Brilliant Violet 570, clone RM4-5	Biolegend	Cat# 100542, RRID: AB_2563051
Anti-mouse CD4, PE, clone GK1.5	Biolegend	Cat# 100408, RRID: AB_312693
Anti-mouse CD4, APC, clone GK1.5	Biolegend	Cat# 100412, RRID: AB_312697
Anti-mouse CD4, APC/Cy7, clone GK1.5	Biolegend	Cat# 100714, RRID: AB_312753
Anti-mouse CD8a, PE/Cy7, clone 53-6.7	Biolegend	Cat# 100722, RRID: AB_100722
Anti-mouse CD8a, APC/Cy7, clone 53-6.7	Biolegend	Cat# 100714, RRID: AB_312753
Anti-mouse CD8a, PE-CF594, clone 53-6.7	BD Bioscience	Cat# 562283
Anti-mouse CD8a, Alexa Fluor® 700, clone 53-6.7	Biolegend	Cat# 100730, RRID: AB_493703
Anti-mouse/human CD11b, Alexa Fluor® 700, clone M1/70	Biolegend	Cat# 101222, RRID: AB_493705
Anti-mouse CD115, PE, clone AFS98	Biolegend	Cat# 135506, RRID: AB_1937253
Anti-mouse CD115, APC, clone AFS98	eBioscience	Cat# 135510, RRID: AB_2085221
Anti-mouse Gr-1, PerCP/Cy5.5, clone RB6-8C5	Biolegend	Cat# 108428, RRID: AB_893558
Anti-mouse Gr-1, FITC, clone RB6-8C5	Biolegend	Cat# 108406, RRID: AB_313371
Anti-mouse/human CD45R/B220, Alexa Fluor® 488, clone RA3-6B2	Biolegend	Cat# 103225, RRID: AB_389308
Anti-mouse/human CD45R/B220, PE/Cy7, clone RA3-6B2	Biolegend	Cat# 103222, RRID: AB_313005
Anti-mouse/human CD45R/B220, APC-Cy7, clone RA3-6B2	Biolegend	Cat# 103224, RRID: AB_313007
Anti-mouse Siglec-F, Alexa Fluor® 647, clone E50-2440	BD Bioscience	Cat# 562680
Anti-mouse Siglec-F, APC-Cy7, clone E50-2440	BD Bioscience	Cat# 565527
Anti-mouse NK1.1, APC, clone PK136	Biolegend	Cat# 108710, RRID: AB_313397
Anti-mouse NK1.1, Alexa Fluor® 700, clone PK136	ebioscience	Cat# 56-5941-80, RRID: AB_2574504
Anti-mouse NK1.1, PE/Cy7, clone PK136	Biolegend	Cat# 108714, RRID: AB_389364
Anti-mouse NK1.1, PE/Cy5, clone PK136	Biolegend	Cat# 108716, RRID: AB_493590
Anti-mouse CD45, PE/Dazzle 594, clone 30-F11	Biolegend	Cat# 103146, RRID: AB_2564003
Anti-mouse CD45, PE, clone 30-F11	Biolegend	Cat# 103106, RRID: AB_312971
Anti-mouse CD45, APC, clone I3/2.3	Biolegend	Cat# 147708, RRID: AB_2563540
Anti-mouse CD45.1, PE-CF594, clone A20	BD Biosciences	Cat# 562452
Anti-mouse CD45.2, Alexa Fluor® 700, clone 104	Biolegend	Cat#109822, RRID: AB_493731
Anti-mouse CD45, eFluor780, clone 30-F11	eBiosciences	Cat# 47-0451-82, RRID: AB_1548781
Anti-mouse Ly6C, PE, clone HK1.4	Biolegend	Cat# 128008, RRID: AB_1186132
Anti-mouse Ly6G, PerCP/Cy5.5, clone 1A8	Biolegend	Cat# 127616, RRID: AB_1877271
Anti-mouse I-A/I-E, PE/Cy7, clone M5/114.15.2	Biolegend	Cat# 107630, RRID: AB_2069376
Anti-mouse CCR1, PE, clone 643854	R&D	Cat# FAB5986P-100
Anti-mouse CCR2, Alexa Fluor® 700, clone 475301	R&D	Cat# FAB5538N-100
Anti-mouse CCR3, FITC, clone J073E5	Biolegend	Cat# 144510, RRID: AB_2561609
Anti-mouse CCR3, PE, clone J073E5	Biolegend	Cat# 144506, RRID: AB_2561534
Anti-mouse CCR4, PE/Cy7, clone 2G12	Biolegend	Cat# 131214, RRID: AB_2244410
Anti-mouse CCR5, PE, clone HM-CCR5	Biolegend	Cat# 107006, RRID: AB_313301
Anti-mouse CCR6, PerCp/Cy5.5, clone 29-2L17	Biolegend	Cat# 129810, RRID: AB_2275515
Anti-mouse CCR7, PE, clone 4B12	Biolegend	Cat# 120106, RRID: AB_389358
Anti-mouse CCR8, PE, clone 1055c	R&D	Cat# FAB8324P-100
Anti-mouse CCR9, PE, clone 9B1	Biolegend	Cat# 129708, RRID: AB_2073249
Anti-mouse CCR10, Alexa Fluor® 700, clone 248918	R&D	Cat# FAB2815N-100

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Anti-mouse CXCR2, PE, clone 242216	R&D	Cat# FAB2164P-100
Anti-mouse CXCR3, PE/Cy7, clone CXCR3-173	Biolegend	Cat# 126516, RRID: AB_2245493
Anti-mouse CXCR4, PE, clone L276F12	Biolegend	Cat# 146506, RRID: AB_2562783
Anti-mouse CXCR4, PerCP/Cy5.5, clone L276F12	Biolegend	Cat# 146510, RRID: AB_2562787
Anti-mouse CXCR5, PE, clone L138D7	Biolegend	Cat# 145504, RRID: AB_2561968
Anti-mouse CXCR6, PerCP, clone 221002	R&D	Cat# FAB2145C-100
Anti-mouse CX3CR1, PerCP Cy 5.5, clone SA011F11	Biolegend	Cat# 149010, RRID: AB_2564494
Anti-mouse CD11a, PerCP/Cy5.5, clone M17/4	Biolegend	Cat# 101124, RRID: AB_2562932
Anti-mouse/human CD11b, Alexa Fluor® 700, clone M1/70	Biolegend	Cat# 101222, RRID: AB_493705
Anti-mouse CD11c, Alexa Fluor® 700, clone N418	Biolegend	Cat# 117320, RRID: AB_528736
Anti-mouse CD44, PE-CF594, clone IM7	BD Bioscience	Cat# 562464
Anti-mouse CD62L, APC/Cy7, clone MEL-14	Biolegend	Cat# 104428, RRID: AB_830799
Anti-mouse CD162, PE, clone 2PH1	BD bioscience	Cat# 555306
Anti-mouse CD18, PerCP-Cy5.5, clone C71/16	BD Bioscience	Cat# 562827
Anti-mouse/rat CD29, Alexa Fluor® 700, clone HMβ1-1	Biolegend	Cat# 102218, RRID: AB_493711
Anti-mouse CD49b, PE/Cy7, clone DX5	Biolegend	Cat# 108922, RRID: AB_2561460
Anti-mouse CD49d, PerCP/Cy5.5, clone R1-2	Biolegend	Cat# 103620, RRID: AB_2563702
Anti-mouse CD49e, PE-CF594, clone 5H10-27 (MFR5)	BD Bioscience	Cat# 564313
Anti-mouse/human CD49f, PE/Cy7, clone GoH3	Biolegend	Cat# 313622, RRID: AB_2561705
Anti-human CD8, Alexa Fluor® 488, clone HIT8a	Biolegend	Cat# 300916, RRID: AB_756152
Anti-human CD19, PE, clone HIB19	Biolegend	Cat# 302208, RRID: AB_314238
Anti-human CD56, PE/Dazzle 594, clone HCD56	Biolegend	Cat# 318348, RRID: AB_2563564
Anti-human CD14, PerCP/Cy5.5, clone HCD14	Biolegend	Cat# 325622, RRID: AB_893250
Anti-human CD16, PE/Cy7, clone 3G8	Biolegend	Cat# 302016, RRID: AB_314216
Anti-human CD49d, APC, clone 9F10	Biolegend	Cat# 304308, RRID: AB_2130041
Anti-human CD4, Alexa Fluor® 700, clone SK3	Biolegend	Cat# 344622, RRID: AB_2563150
Anti-human CXCR4, APC/Cy7, clone 12G5	Biolegend	Cat# 306528, RRID: AB_2565994
Anti-human CD3, Brilliant Violet 570, clone UCHT1	Biolegend	Cat# 300436, RRID: AB_2562124
Anti-human CD45, PE, clone HI30	BD PharMingen	Cat# 555483, RRID: AB_395875
Anti-mouse Armenian Hamster IgG, Alexa Fluor® 700, clone HTK888	Biolegend	Cat# 400926
Anti-mouse Armenian Hamster IgG, PE, clone HTK888	Biolegend	Cat# 400908
Anti-mouse Armenian Hamster IgG, Pe/Cy7, clone HTK888	Biolegend	Cat# 400922
Anti-mouse Armenian Hamster IgG, PerCp/Cy5.5, clone HTK888	Biolegend	Cat# 400932
Anti-mouse Mouse IgG 1, κ, PE, clone P3.6.2.8.1	eBioscience	Cat# 12-4714-41
Anti-mouse Rat IgG1, κ, PE, clone R3-34	BD bioscience	Cat# 553925
Anti-mouse Rat IgG2a, κ, Alexa Fluor® 488, clone RTK2758	Biolegend	Cat# 400525
Anti-mouse Rat IgG2a, κ, Alexa Fluor® 700, clone eBR2a	eBioscience	Cat# 56-4321-80
Anti-mouse Rat IgG2a, k, APC/Cy7, clone RTK2758	Biolegend	Cat# 400524
Anti-mouse Rat IgG2a, κ, PE, clone RTK2758	Biolegend	Cat# 400508
Anti-mouse Rat IgG2a, κ, PE-CF594, clone R35-95	BD Bioscience	Cat# 562302
Anti-mouse Rat IgG2a, κ, PE/Cy7, clone RTK2758	Biolegend	Cat# 400522
Anti-mouse Rat IgG2a, κ, PerCp/Cy5.5, clone RTK2758	Biolegend	Cat# 400532
Anti-mouse Mouse IgG2a, κ, PerCp/Cy5.5, clone MOPC-173	Biolegend	Cat# 400258
Anti-mouse Rat IgG2b, κ, Alexa Fluor® 700, clone RTK4530	Biolegend	Cat# 400628
Anti-mouse Rat IgG2b, κ, PE, clone RTK4530	Biolegend	Cat# 400610
Anti-mouse Rat IgG2b, κ, PE/Cy7, clone RTK4530	Biolegend	Cat# 400618
Anti-mouse Rat IgG2b, κ, PE CP594, clone A95-1	BD Bioscience	Cat# 562308
Anti-mouse Rat IgG2b, κ, PerCP/Cy5.5, clone RTK4530	Biolegend	Cat# 400632
Anti-mouse ICAM-1_PF_clone YN1/1 7 4	Biolegend	Cat# 116108, RBID: AB_313699

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Anti-mouse VCAM-1, PE, clone 429 (MVCAM.A)	Biolegend	Cat# 105714, RRID: AB_1134164
Anti-mouse E-selectin, PE, clone 10E9.6 (RUO)	BD Bioscience	Cat# 553751
Anti-mouse/human P-selectin, PE, clone Psel.KO2.3	eBioscience	Cat# 2-0626-80, RRID: AB_1210864
Anti-mouse MadCAM, Alexa Fluor® 488, clone MECA-367	Biolegend	Cat# 120708, RRID: AB_493398
Anti-mouse ICAM-2, Alexa Fluor® 488, clone 3C4 (MIC2/4)	Biolegend	Cat# 105609, RRID: AB_2264501
Anti-mouse/human PNAd, Biotin, clone MECA-79	Biolegend	Cat# 120804, RRID: AB_493557
Anti-mouse PECAM-1, Alexa Fluor® 647, clone MEC13.3	Biolegend	Cat# 102516, RRID: AB_2161029
Anti-mouse PECAM-1, APC, clone 390	Biolegend	Cat# 102410, RRID: AB_312905
Anti-mouse/human CD44, PE, clone IM7	Biolegend	Cat# 103008, RRID: AB_312959
Streptavidin, Cy3	Biolegend	Cat# 405215
Anti-mouse Rat IgM, κ, Biotin, clone RTK2118	Biolegend	Cat# 400804
Anti-mouse Rat IgG2a, κ, PE, clone RTK2758	Biolegend	Cat# 400508
Anti-mouse Rat IgG2b, κ, PE, clone RTK4530	Biolegend	Cat# 400608
Anti-mouse Rat IgG2a, κ, Alexa Fluor® 488, clone RTK2758	Biolegend	Cat# 400525
Anti-mouse Rat IgG1, κ, PE, clone P3.6.2.8.1	eBioscience	Cat# 12-4714-82
Anti-mouse anti-ICAM-1, clone YN1/1.7.4	BioXcell	Cat# BE0020-1, RRID: AB_1107661
Anti-mouse anti-ICAM-2, clone 3C4(mIC2/4)	BD bioscience	Cat# 553325
Anti-mouse anti-VCAM-1, clone M/K-2.7	BioXcell	Cat# BE0027, RRID: AB_1107572
Anti-mouse anti-P-selectin, clone RB40.34	BD bioscience	Cat# 553742
Anti-mouse anti-CD62E, clone 10E9.6	BD bioscience	Cat# 553749
Anti-mouse anti-CD62L, clone Mel-14	BioXcell	Cat# BE0021, RRID: AB_1107665
Anti-mouse anti-PSGL-1, clone 4RA10	BioXcell	Cat# BE0186, RRID: AB_10950305
Anti-mouse anti-CD18, clone M18/2	BioXcell	Cat# BE0009, RRID: AB_1107607
Anti-mouse anti-CD29, clone KMI6	BioXcell	Cat# BE0232, RRID: AB_2687714
Anti-mouse anti-CD49d, clone clone PS/2	BioXcell	Cat# BE0071, RRID: AB_1107657
Anti-mouse anti-CD11a, clone Clone: M17/4	BioXcell	Cat# BE0006, RRID: AB_1107578
Anti-mouse Rat IgG2a Isotype control, clone 2A3	BioXcell	Cat# BE0089, RRID: AB_1107769
Anti-mouse Rat IgG1 Isotype control, clone HRPN	BioXcell	Cat# BE0088, RRID: AB_1107775
Anti-mouse Rat IgG2b Isotype control, clone LTF-2	BioXcell	Cat# BE0090, RRID: AB_1107780
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
CCR4 antagonist, C 021 dihydrochloride	Tocris	Cat# 3581
CXCR2 antagonist, SB 265610	Tocris	Cat# 2724
CXCR4 antagonist, AMD 3100 octahydrochloride	Tocris	Cat# 3299
CellTrace CFSE	Thermo Fisher Scientific	Cat# C34554
Cell tracker Deep red	Thermo Fisher Scientific	Cat# C34565
Lipopolysaccharides (LPS)	Sigma	Cat# L4516
Tween80	Sigma	Cat# P4780
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma	Cat# D2650
Collagenase IV	Sigma	Cat# C5138
Deoxyribonuclease I (Dnase I)	Aplicem	Cat# A3778
DAPI	Biolegend	Cat# 422801
Tamoxifen	Sigma	Cat# T5648
ΤΝΓα	Peprotech	Cat# 300-01A
IFNγ	Peprotech	Cat# 300-02
CXCL12	MerckSerono	In-house production
Critical Commercial Assays		
EasySep mouse neutrophil enrichment Kit	STEMCELL Technologies	Cat# 19762
EasySep mouse monocyte isolation Kit	STEMCELL Technologies	Cat# 19861
EasySep mouse B cell isolation kit	STEMCELL Technologies	Cat# 19854

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
RNeasy Plus mini Kit	QIAGEN Hilden Germany	Cat# 74136
Human B cell negative selection kit	Miltenyi Biotec	Cat# 130-091-151
Experimental Models: Cell Lines		
BS50 B-ALL cells	Rudi W Hendriks, Erasmus MC Rotterdam, the Netherlands	N/A
C1498 AML cells	ATCC	Cat# TIB49
NALM-6 human B-ALL cells	ATCC	Cat# CRL-3273
human umbilical vein endothelial cells	University Geneva Hospital	N/A
Experimental Models: Organisms/Strains		
CD19-cre mice	Jackson Laboratories	Cat# 006785
Lyz2-cre mice	Jackson Laboratories	Cat# 004781
Bmal1 ^{flox/flox}	Jackson Laboratories	Cat# 007668
Cdh5-cre/ERT2 mice	Ralf Adams, MPI Münster, Germany	N/A
C57BL/6J CD45.1 (B6.SJL- <i>Ptprc^aPepc^b</i> /BoyCrl)	Charles River	Ly5.1 mice
NSG (NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2rg ^{tm1Wjl} /SzJ)	Charles River	JAX Cat# 05557
Oligonucleotides		
Nr1d1 Forward GAT AGC TCC CCT TCT TCT GCA TCA TC	Eurofins Genomics	N/A
Nr1d1 Reverse TTC CAT GGC CAC TTG TAG ACT TC	Eurofins Genomics	N/A
Sell Forward GAC GCC TGT CAC AAA CGA AA	Eurofins Genomics	N/A
Sell Reverse GCC CGT AAT ACC CTG CAT CA	Eurofins Genomics	N/A
Cxcl12 Forward CAG AGC CAA CGT CAA GCA	Eurofins Genomics	N/A
Cxc/12 Reverse AGG TAC TCT TGG ATC CAC	Eurofins Genomics	N/A
Software and Algorithms		
GraphPad Prism7	Graphpad software	N/A
Flowjo 10.4	Flowjo, LLC	www.flowjo.com
Becton Dickinson	FACSDiva v8.0.1	N/A
Zeiss	ZEN	N/A
ImageJ version 1.51n	https://imagej.net	N/A
slidebook version 6	Intelligent Imaging Innovations, 3i	www.intelligent-imaging.com

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Reagents used in this study are available from the commercial sources listed. Further information and requests for other materials should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Christoph Scheiermann (christoph.scheiermann@med.uni-muenchen.de or christoph.scheiermann@unige.ch)

EXPERIMENT MODEL AND SUBJECT DETAILS

Mice

Male C57BL/6N mice aged 7–8 weeks were purchased from Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany). *Bmal1*^{flox/flox}, *Cd19cre*, *Lyz2cre* transgenic mice were purchased from Jackson Laboratories, and crossbred to target B cells and myeloid cells, respectively. *Cdh5-creERT2* mice were obtained as a gift from Ralf Adams (Max-Planck-Institute for Molecular Biomedicine, Münster) via Eloi Montanez (LMU, Munich) and were given intraperitoneal tamoxifen injections for five consecutive days to induce *Cre* recombinase expression. Mice were then used for experiments 2–3 weeks after. NSG and C57BL/6J CD45.1 mice were obtained from Jackson Laboratory and Charles River respectively and bred in a pathogen-free environment. Experimental mice were male and used at 6–12 weeks of age. Mice were maintained in a 12 h light: 12 h dark cycle with *ad libitum* access to food and water. For some experiments, mice were put in cabinets to change the light phase in order to perform experiments with animals on different light schedules at the same time. All animal procedures were in accordance with the German Law of Animal Welfare or the French laws and protocols and approved by the Regierung of Oberbayern or French animal ethics committees, respectively.

Humans

Eight healthy volunteers (four males and four females) aged 25-40 years donated blood for human blood counts experiment. Three healthy volunteers aged 26–48 years donated blood for the human B cell transmigration assay. Experiments were approved by the ethics committee of the LMU Munich and the University of Geneva. All volunteers gave written consent to participating in the study.

METHOD DETAILS

Flow cytometry

Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane. Blood was collected by bleeding into EDTA-coated capillary tubes. Leukocyte counts were obtained using an IDEXX ProCyte DX cell counter. Erythrocytes were lysed by red blood cell (RBC) lysis buffer (0.8% NH₄Cl) 2 times, for 5 min each. Abdominal fluid was collected with a syringe by flushing with 5 mL PBS. Spleens were harvested from animals and processed through a cell strainer (40 µm, Thermo Fisher Scientific). Bone marrow cells were harvested from either one femur only or two femurs and two tibias by flushing the bone gently with cold PBS. Lung and liver were first cut into small pieces in DPBS, supplemented with calcium and magnesium (Sigma) and then incubated for 1 h in digestion buffer with collagenase IV (1 mg/ml, C5138, Sigma) and DNase I (0.2 mg/ml, Applichem) at 37°C with gentle agitation. After digestion, cells were filtered through a cell strainer (40 µm, Thermo Fisher Scientific) and resuspended in 5 mL RBC lysis buffer for 5 min. After centrifugation, the supernatant was removed. Leukocytes were resuspended in PBS supplemented with 2% fetal bovine serum (GIBCO) and 2mM EDTA, then stained with fluorescence-conjugated antibodies for 30 min on ice. After washing with PBS, cells were resuspended in DAPI (Biolegend) buffer, and analyzed by flow cytometry using a Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter).

Human blood was collected into EDTA-coated tubes (SARSTEDT, Germany) at 8am, 11am, 3pm, 7pm and 11pm. Human blood was prepared as described above for mouse cells and stained with antibodies at room temperature for 30 min. After washing with PBS, cells were resuspended in DAPI (Biolegend) buffer, and analyzed by flow cytometry using a Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter).

Functional blocking experiments and induction of inflammation

To investigate the role of specific pro-migratory molecules in the rhythmic homing process, antibody or antagonist experiments were performed in combination with adoptive transfer assays. Blocking antibodies or chemokine antagonists were diluted into working concentrations (see table below) with PBS or 5% DMSO with 1% Tween80 (Sigma) and injected i.v. or i.p. to recipient mice 2 h before injection of donor cells. Cells were then processed as described above. In order to induce systemic inflammatory conditions, LPS (L4516, Sigma) was injected i.p. (10 mg/kg) to recipient mice at the same time as the injection of blocking antibodies. For CXCR4 *ex vivo* blocking, donor cells were pre-incubated with AMD3100 (300ug/ml) for 1 hour at 37°C in RPMI 1640 (Sigma) plus 10% FCS (Sigma) and stained with CFSE for 20 min.

Working concentration of blocking antibodies and functional blockers.

Antibodies or chemicals	Volume	medium	Injection
anti-ICAM-1	200 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-ICAM-2	60 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-VCAM-1	200 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-P-selectin	30 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-CD62E	50 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-CD62L	200 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-PSGL-1	200 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-CD18	200 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-CD29	200 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-CD49d	100 μg/mouse	PBS	i.v.
anti-CD11a	100 μg/mouse	PBS	i.v.
CCR4 antagonist	125 μg/mouse	PBS	i.p.
CXCR2 antagonist	125 μg/mouse	5% DMSO with 1% Tween80	i.p.
CXCR4 antagonist	125 μg/mouse	PBS	i.p.

Adoptive transfer assays

To investigate the emigration of leukocytes from blood, adoptive transfer experiments were performed and donor cells remaining in blood were measured as a negative indicator of how many cells had migrated into tissues. First, donor cells were obtained from bone marrow and spleen from donor mice. Single cell suspensions were obtained by flushing bone marrow with cold PBS and smashing spleen gently through a cell strainer (40 µm, Thermo Fisher Scientific). Cells were lysed with RBC lysis buffer for 5 min and resuspended in cell incubation buffer (PBS, 0.2%BSA, 2mM EDTA) and counted on a cell counter (ProCyte DX cell counter).

 10^7 bone marrow cells and 10^7 spleen cells were mixed as donor cells for one recipient mouse. Donor cells were labeled with 1.5 μ M CFSE (Thermo Fisher Scientific) or 0.1 μ M CellTracker Deep Red dye (Thermo Fisher Scientific) for 20 min at 37°C. In adoptive transfer experiments using donors of different phases, donor cells from two time zones (10^7 mixed donor cells per time zone) were labeled differently and injected into one recipient. After one hour, blood and organs were harvested from recipient mice and processed as described above for flow cytometry analyses.

In some experiments, injections of an anti-CD45 antibody (clone I3/2.3) were followed by perfusion in order to distinguish between cells adherent to the vascular endothelium or located in the extravascular space. Injection of donor cells was performed as described before. After 56 min, 10 µl anti-CD45 (clone I3/2.3) in 200 µl PBS were injected intravenously to recipient mice. 4 min later, mice were sacrificed using an overdose of isoflurane and perfused with PBS via first the left ventricle and then the right ventricle in order to perfuse the whole body and the lung, respectively.

Cell isolation and Q-PCR

Spleen B cells were purified from *Cd19*cre *Bmal1*^{flox/flox} and littermate control mice using the EasySep mouse B cell isolation kit (STEMCELL Technologies) according to the manufacturer's protocol, and purity (> 92%) was accessed by flow cytometry. Bone marrow monocytes and neutrophils were purified from *Lyz2*cre *Bmal1*^{flox/flox} and littermate control mice using a monocyte isolation kit and a neutrophil enrichment kit (STEMCELL Technologies), respectively. Purity of monocytes was about > 93% and of neutrophils around > 82%.

RNA was extracted from isolated cells using the RNeasy Plus mini Kit (QIAGEN, Hilden Germany) following the manufacturers' instructions. Total organ RNA extraction was performed with TRIzol (QIAGEN). Tissues were homogenized with a homogenizer (SpeedMill PLUS, Analytic Jena). RNA clean-up was performed using the RNeasy Plus mini Kit (QIAGEN, Hilden Germany) and following the manufacturers' instructions. RNA samples were analyzed using a NanoDrop2000 (Thermo Scientific) to determine RNA concentration and quality. RNA was stored at -80° C. For reverse transcription, 150-200 ng RNA for isolated cells and 2 µg RNA for organs were used with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). cDNA samples were stored at -20° C prior to use in quantitative PCR (Q-PCR). Q-PCR was performed with a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in 96-well plates with SYBR green compatible primers at 60°C. Duplicates or triplicates were performed for each Q-PCR sample. The total reaction volume was 10 µl, containing 5 µl SYBR green, 1 µl primer mix (5 µM), 2 µl H₂O and 1.5 ng cDNA for cells or 20ng cDNA for organs. Gene expression levels were normalized to the housekeeping gene *Gapdh*.

Immunofluorescence staining

To measure adhesion molecule expression levels on endothelial cells, organs were placed in OCT (TissueTec), frozen at -80° C and sectioned with a thickness of 10 μ m on a cryostat (Leica). Sections were fixed with cold methanol for 10 min at room temperature, incubated in PBS containing Triton X-100 (0.5%), and normal goat serum (20%). Sections were stained with antibodies and incubated at 4°C overnight. Images were obtained using a Zeiss Axio Examiner.D1 microscope equipped with 405, 488, 563, and 655 nm LED excitation light sources. All quantifications were performed using mask analyses with the Zeiss software based on PECAM-1 expression. Quantifying expression of other fluorescent channels within this mask was then performed. Areas smaller than 10 μ m² were excluded from analysis to minimize non-specific signals. Protein expression levels were presented as mean fluorescence intensity (MFI) within the mask area and after subtraction of the respective isotype controls. Levels of expression below the isotype threshold for all assessed time-points or the majority of time-points was termed no or low expression, respectively.

For visualizing the precise localization of injected donor cells in adoptive transfer assays, mice were injected intravenously with donor cells and additionally with 40 μ l of an anti-PECAM-1 antibody (clone 390) in 160 μ l PBS prior to organ harvest. 5 min later, mice were anesthetized by inhalation of isoflurane, and perfused with PBS. Organs were put in OCT and frozen at -80° C. Images were obtained using a Zeiss Axio Examiner.Z1 confocal spinning disk microscope equipped with 405, 488, 561, and 640 nm laser sources using both tissue sections and whole mounts of organs. Quantification was performed using ImageJ (version 1.51n) and slidebook (version 6, Intelligent Imaging Innovations, 3i).

Leukemic models

To assess leukemic engraftment, adult NSG or C57BL/6J CD45.1 mice (6–10 weeks old) were injected retro-orbitally with 5 x10⁶ leukemic cells at ZT1 or ZT13. Leukemic development was monitored on blood samples obtained by bleeding into Heparin-coated capillary tubes. Leukocyte counts were obtained using an IDEXX ProCyte DX cell counter and percentage of leukemic cells was determined by flow cytometry. Samples from mice engrafted with BS50 and C1498 leukemic cells were stained with anti-mouse CD45.1-PE-CF594 (clone A20, BD Biosciences) and anti-mouse CD45.2-AF700 (clone 104, Biolegend), while samples from NSG mice engrafted with NALM6 were stained with anti-human CD45-PE (BD PharMingen) and anti-mouse CD45-eFluor780 (clone 30-F11, eBiosciences). RBC were lysed using BD FACs Lysis buffer and samples were analyzed using a Fortessa (Becton Dickinson) flow cytometer.

Transmigration assay of human B cells

Non-synchronized HUVECs were cultured in chamber slides for 2–3 days and then treated for 24 h using a chronic activation protocol (Bradfield et al., 2007). The first stage of activation consisted of overnight TNF α (1000 U/ml) and IFN γ (500 U/ml) stimulation. B cells (80%–95%) were purified from EDTA-treated blood collected from healthy donors using a negative selection kit (Miltenyi Biotec).

The flow assay set-up consisted of a heated microscope chamber (37° C) and a calibrated pump where flow was generated over attached HUVEC monolayers by perfusing wash buffer, or a B cell suspension. The flow rate was set to represent small venules/capillaries (0.05 Pa). Assays were initiated with a second stage HUVEC activation, where CXCL12 (1 µM) was perfused over the monolayer for 15 min (step 1). Wash-buffer was then pumped for 10 min over the HUVECs to remove any unbound CXCL12 before the B cell suspension was perfused over the HUVECs for 5 min (step 2) followed by 90 min of wash-buffer (step 3). Throughout steps 2–3, images of the captured B cells were taken using phase-contrast microscopy, and a high-resolution camera. Individual images were recorded every 30 s and compiled into short movie sequences, allowing analysis of individual B cells over large areas. B cells adherent to the surface of the HUVECs showed a phase-white appearance, whereas those that had transmigrated showed a phase-black appearance. Adhesion events were recorded as the total of number of cells per unit field (mm²). Transmigration events were presented as a percentage of total B cells captured from flow per unit field. All experiments were carried out using quadruplicate fields and presented as a mean value with + standard error measurements (±SEM).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Data was analyzed using Prism 7 (GraphPad) and presented as mean ± standard error of mean (SEM). A p value < 0.05 was considered as statistically significant. Comparisons between two groups were performed using unpaired Student's t test. One-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison test was used for multiple group comparison. One-way ANOVA analysis followed by Dunnett's test was used for comparison between control and treatment groups. Human WBC counts were analyzed by repeated-measures one-way ANOVA. Mann-Whitney non-parametric analyses were performed for non-Gaussian distribution patterns in leukemia tumor burden.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Data are available upon request.

ARTICLE ANNEXE 2: Flow cytometry analysis of mouse hematopoietic stem and multipotent progenitor cells

Julien M.P. Grenier, Marjorie C. Delahaye, Stéphane J.C. Mancini* and Michel Aurrand-Lions*.

Il s'agit d'un article de méthodologie publié dans Methods in molecular Biology décrivant la technique que j'ai utilisé durant ma thèse pour phénotyper les CSHs murines depuis la dissection de la souris jusqu'au cytomètre.



Flow Cytometry Analysis of Mouse Hematopoietic Stem and Multipotent Progenitor Cells

Julien M. P. Grenier, Marjorie C. Delahaye, Stéphane J. C. Mancini, and Michel Aurrand-Lions

Abstract

Flow cytometry has been widely used to detect a single event by means of multiparametric fluorescence measurements. Here we describe a method to analyze subsets of hematopoietic stem and progenitor cells isolated from long bones of mice. We further show that this method allows for comparing JAM-C protein expression between subsets of hematopoietic stem and progenitor cells.

Key words Mouse, Bone marrow, Hematopoietic stem cells, Flow cytometry

1 Introduction

Hematopoiesis takes place in the bone marrow (BM) and is the process that leads to the formation of blood components throughout life. It is hierarchically organized with hematopoietic stem cells (HSCs) at the apex. HSCs are defined by their self-renewal properties and their ability to differentiate into all blood cells. Such properties have been initially addressed in mouse models using engraftment of purified cells in irradiated recipients and follow-up of spleen colony formation (CFU-S) [1]. Characterization of the cells possessing the stem cell activity has been challenging until the development of monoclonal antibodies and flow cytometry in the eighties, which lead to a quest toward the identification of specific phenotypic markers. Nowadays technologies have improved, and single-cell technologies including multiparametric flow cytometry are routinely used to characterize and purify HSCs [2].

Stéphane J. C. Mancini and Michel Aurrand-Lions are senior coauthors.

Marion Espéli and Karl Balabanian (eds.), *Bone Marrow Environment: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 2308, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1425-9_6, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

The first characterization of mouse HSCs was reported in 1986 in a study showing that CFU-S activity is enriched in cells expressing Thyl (CD90) and lacking lineage markers of granulocytes, monocytes, T and B lymphocytes (Lin⁻: Grl⁻/Mac-l⁻/CD4⁻/ CD8⁻/B220⁻)[3]. Thereafter, G. Spangrude and collaborators added Scal to the panel in order to demonstrate that Lin⁻ Thy^{lo} Scal⁺ cells reconstitute Erythroid, Myeloid, T and B lymphocyte lineages [4]. HSCs were then found to be enriched in the Lin⁻ Thylo Sca⁺ c-kit⁺ compartment lacking CD34 expression [5-7]. Another key study showed that Lin⁻ Scal⁺ c-kit⁺ (LSK) cells expressing Flt3⁺ (Flk2 or CD135) lose their self-renewal activity and are lymphoid biased, suggesting that Flt3 expression is associated with more mature progenitors [8, 9]. These findings were consistent with the higher repopulating capacities of Flt3⁻ HSCs compared to Flt3⁺ HSCs which were respectively called long-term and short-term HSC [10]. In 2005, the use of the SLAM family markers CD150 and CD244 allowed to subdivide LSK cells in HSCs (CD150⁺ CD48⁻ CD244⁻), MPP1 (CD34⁺ CD150⁻ CD48⁻ CD135⁻), MPP2 (CD34⁺ CD48⁻ CD150⁺ CD135⁻), MPP3 (CD34⁺ CD48⁺ CD150⁻ CD135⁻), and MPP4 (CD34⁺ $CD48^+$ $CD150^ CD135^+$) which were more recently shown to be lymphoid biased [11–13]. Finally, several studies have reported specific expression of surface markers such as EPCR (Endothelial Protein C Receptor), ESAM (Endothelial cell-selective adhesion molecule), or JAM-C (Junctional Adhesion Molecule C) on subset of Hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) [14-16]. More specifically, we have found that JAM-C is not only a functional marker of the most quiescent long-term HSC in human or mouse but also of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia, the pathological counterpart of HSPCs [17–20]. We describe here a method and a gating strategy to quantify JAM-C expression by subsets of hematopoietic stem and progenitor cells.

2 Materials

- 2.1 Reagents
- 1. eBioscience[™] 1× Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer (Ref: 00-4333-57).
- 2. PBS: phosphate-buffered saline $1 \times$.
- 3. FACS buffer composed of PBS 1×, 0.1% heat-inactivated fetal calf serum, 0.2 mM EDTA.
- 4. 70% ethanol.
- 5. Trypan blue.
- 6. Sytox Green (*see* **Note 1**).
- Biotinylated Lin antibodies: anti CD4 (clone RM4-5), CD8 (clone 53-6.7), CD3 (clone 145-2C11), CD19 (clone 6D5),

CD11c (clone N418), DX5 (clone DX5), Ter119 (clone Ter119), CD11b (clone M1/70), B220 (clone RA3-6B2), Gr-1 (clone RB6-8C5) (*see* Note 1).

- 8. BV510 streptavidin (see Note 1).
- 9. APC/Cy7 anti-CD117 (c-kit) (clone 2B8) (*see* Note 1).
- 10. BV421 anti-Sca-1 (clone D7) (see Note 1).
- 11. PE/CF594 anti-CD135 (Flk2) (clone A2F10.1) (see Note 1).
- 12. APC anti-CD150 (clone TC15-12F12.2) (see Note 1).
- 13. PE/Cy7 anti-CD48 (clone HM48-1) (see Note 1).
- 14. Rabbit polyclonal anti-JAM-C 501 [19] (see Note 1).
- 15. PE anti-rabbit IgG (H + L) (see Note 1).

2.2 Equipment 1. Micro centrifuge.

- 2. Falcon 15 mL tubes.
- 3. 1.5 mL eppendorf tubes.
- 4. $21G \times 1 \frac{1}{2}$ needles.
- 5. 1.5 mL perforated eppendorf's tube (see Note 2).
- 6. 5 mL polystyrene round-bottom tubes.
- 7. 6-well plates.
- 8. Scalpel blades.
- 9. Centrifuge.
- 10. Flow cytometer (*see* Note 3).

3 Methods

- 3.1 BM Cell Recovery1. Sacrifice mice by cervical dislocation, spray with 70% ethanol thoroughly and fix with ventral side up by pinning the legs through the mouse paw pads below the ankle joint. Dissect the skin with scissor starting by an incision in the abdomen down to the legs and ankle joint. Pull back the skin to expose the legs.
 - 2. Remove muscles from tibia and femur to expose the bone. Cut the tibia at the ankle and the femur at the junction of the hips. At that stage, cutting should be easy and must concern only ligaments. Make sure femoral heads are intact. Place the legs into 3 mL of PBS in a 6-well plate.
 - 3. Carefully clean the bones with a scalpel in order to eliminate all flesh from the bones (*see* **Note 4**) and isolate femur from tibia by cutting knee ligaments. Cut the bones in the middle using a scalpel and put them into perforated Eppendorf tubes with the cut end facing the bottom. Place the perforated tube into a

3.2



Fig. 1 BM cell extraction. (a) Bottom view of a perforated eppendorf tube. (b) Image of a posterior leg prepared for BM extraction. (c) Mounting of the collection tube with the perforated tube containing bones. (d) Appearance of the tubes shown in (c) after centrifugation. (e) Aspect of the bones before (upper image) and after centrifugation (lower image)

collection Eppendorf tube of 1.5 mL, add 300 μ L of PBS in the perforated tube and centrifuge in the collection tube at 6000 × g during 8 min (Fig. 1).

- 4. After centrifugation, trash the perforated tube containing bones which should have turned white if correctly flushed by centrifugation (Fig. 1). Retrieve cells from the collection tube and remove the supernatant as much as possible before proceeding with the lysis of the erythrocytes. To this end, resuspend cells in the remaining volume of supernatant by taping the tube and add 1 mL of $1 \times RBC$ lysis buffer. Mix by inverting (do not vortex) and incubate for 5 min at room temperature.
- 5. Stop the reaction by transferring the cell suspension into 9 mL of PBS already prepared in 15 mL tubes. Centrifuge at $500 \times g$ for 5 min at room temperature to pellet the cells. Discard the supernatant and resuspend cells in an appropriate volume of PBS (10 mL for two rear legs). Cells are ready to be processed.
- **Cell Staining** 1. Count living cells using trypan blue exclusion and adjust the cellular density to at least 10×10^6 cells per mL (*see* Note 5).
 - 2. Distribute 10×10^6 cells per sample into 5 mL round-bottom tubes and complete to 2 mL with FACS buffer (*see* Note 6). Prepare a negative control composed of a pool of unstained cells taken from each sample and complete to 2 mL with FACS buffer. Centrifuge all the tubes 3 min at 500 × g at 4 °C to wash the cells. Discard the supernatant from the unstained tube and

add 200 μ L of FACS buffer and place the tube at 4 °C, the negative control is ready. In the meantime discard the supernatant from other tubes and proceed to staining.

- 3. Add 100 μ L of the mix composed of Lin antibodies cocktail and anti-JAM-C 501 prepared in FACS buffer and incubate for 30 min at 4 °C in the dark.
- 4. Wash cells three times with FACS buffer (centrifuge at $500 \times g$ 3 min at 4 °C).
- 5. Add 100 μL of PE Anti-Rabbit IgG and incubate for 30 min at 4 $^\circ C$ in the dark.
- 6. Wash cells three times with FACS buffer and centrifuge at $500 \times g$ for 3 min at 4 °C (*see* Note 7).
- Add 100 μL of the mix composed of SYTOX Green, Streptavidin, anti-CD117, CD135, Sca-1, CD135, and CD48. Incubate for 30 min at 4 °C in the dark.
- 8. Wash cells three times with FACS buffer, centrifuge at $500 \times g$ for 3 min at 4 °C and resuspend in 200 µL of FACS buffer. Keep samples in the dark until acquisition.
- 1. Use a Log scale for all the parameters except for the size (Forward Scatter, FSC) and the granulosity (Side Scatter, SSC) of the cells, use a linear scale. Save the FSC-A (Area), FSC-H (Height), FSC-W (Width), and the SSC-A, SSC-H, SSC-W parameters (*see* Note 8). Settle the cytometer using the unstained cells. Use compensation beads before processing your samples (*see* Note 9).
- 2. Use the following gating strategy (Fig. 2).

3.3 HSPC

Characterization

- (a) Select the live cells on an FSC-A/SYTOX Green plot.
- (b) From the live cells, gate on a SSC-W/SSC-H dot plot to remove doublets on the granulosity parameter and then gate on an FSC-W/FSC-H dot plot to remove doublets on the size parameter.
- (c) In an FSC-A/Lin dot plot, select Lin negative cells.
- (d) From the Lin⁻ population select the c-kit⁺/Sca-1⁺ corresponding to the Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ (LSK) population.
- (e) From a CD135/CD150 dot plot on the LSK subset.
- (f) Select the CD135⁺/CD150⁻ cells and on a CD150/ CD48 dot plot exclude the CD48⁻ cells which correspond to the MPP4 cells.
- (g) CD135 negative cells correspond to the LT-HSC, ST-HSC, MPP2, and MPP3 (HSPC subsets).



Fig. 2 Gating strategy used for the analysis of JAM-C expression by subsets of BM HSPCs

- (h) Prepare a CD150/CD48 dot plot on the HSPCs subset.
- (i) $CD48^{-}/CD150^{+}$ cells correspond to LT-HSC.
- (j) $CD48^{-}/CD150^{-}$ cells correspond to ST-HSC.
- (k) $CD48^+/CD150^+$ cells correspond to MPP2 cells.
- (l) $CD48^+/CD150-$ cells correspond to MPP3 cells.
- (m) On a histogram plot check JAM-C expression for long-term HSCs, short-term HSCs, and MPPs (*see* **Note 10**).

4 Notes

- 1. Make sure your antibodies are properly titrated before use. The concentrations given in Table 1 are those obtained in the lab following a careful titration. Be aware that the optimal antibody concentration may vary depending on the supplier, product lot, and experimental setting.
- 2. Perforated 1.5 mL Eppendorf's tubes are prepared using a red-hot heated needle to make a hole at the bottom of the tubes. Puncture the tube from the inside to avoid the formation of plastic asperities which would trap cells in the bottom of the upper tube.
- 3. Minimum requirement for the flow cytometer is four lasers, violet (405 nm), blue (488 nm), green (532 nm), and red (633 nm).

Antibody	Dilution	Fluorochrome	Clone
CD4	1/500	Biotin	RM4-5
CD8	1/500	Biotin	53-6.7
CD3	1/500	Biotin	145-2C11
CD19	1/500	Biotin	Clone 6D5
CD11c	1/500	Biotin	N418
DX5	1/500	Biotin	DX5
Ter119	1/500	Biotin	Ter119
CD11b	1/1000	Biotin	M1/70
B220	1/1000	Biotin	RA3-6B2
Grl	1/2000	Biotin	RB6-8C5
Jam-C	1/500	None	501
Sca-1	1/600	BV421	D7
Strepta	1/400	BV510	
CD135	1/400	PE-CF594	A2F10.1
CD48	1/1000	PE-Cy7	HM48-1
CD150	1/500	APC	TC15-12F12.2
CD117	1/200	APC-Cy7	2B8
anti-Rabbit	1/200	PE	
SYTOX Green	1/80000	PerCP-Cy5.5	

Table 1List of antibodies used for flow cytometry and their dilutions

- 4. Use of paper towel may help cleaning the bones properly.
- 5. Cell counting at that stage allows for comparing absolute number of cells in rear legs of mice between mice.
- 6. 1×10^6 cells is the minimal amount of cells to stain in order to reach a sufficient number of interpretable events (approximately 700 LSK, 400 MPP4, and 300 HSPCs).
- 7. At this stage you must perform three washes because you use a secondary antibody that can cross react with other antibodies from the mix.
- 8. The acquisition and the analysis can be performed by using the FSC-A and SSC-A parameters only (or FSC-H and SSC-H). However, by using all the parameters (Area, Height and Width), cellular doublets can be removed, improving the efficiency of the analysis.
- 9. Prepare compensation beads according to the manufacturer's recommendations. It is strongly recommended to perform the single color staining with the antibodies used in the experiment.
- 10. Jam-C expression decreases with differentiation [15, 18, 19].

Acknowledgments

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (EL2020) and Canceropole/Gefluc (2019-00110). MCD and JMPG were recipient of PhD fellowships from la Ligue Nationale Contre le Cancer (IP/SC-16060) and Fondation ARC (# 20190509010), respectively.

References

- 1. Till JE, Mc CE (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res 14:213–222
- Povinelli BJ, Rodriguez-Meira A, Mead AJ (2018) Single cell analysis of normal and leukemic hematopoiesis. Mol Asp Med 59:85–94
- 3. Muller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL (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
- 4. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science 241:58–62
- 5. Morita Y, Ema H, Nakauchi H (2010) Heterogeneity and hierarchy within the most primitive

hematopoietic stem cell compartment. J Exp Med 207:1173-1182

- 6. Morrison SJ, Weissman IL (1994) The longterm repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity 1:661–673
- Osawa M, Hanada K, Hamada H et al (1996) Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science 273:242–245
- 8. Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D et al (2001) Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(–)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of selfrenewal capacity. Immunity 15:659–669
- 9. Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Monch K et al (2002) Key role of flt3 ligand in regulation

of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. Immunity 17:463–472

- Christensen JL, Weissman IL (2001) Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98:14541–14546
- 11. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T et al (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell 121:1109–1121
- 12. Wilson A, Laurenti E, Oser G et al (2008) Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. Cell 135:1118–1129
- Pietras EM, Reynaud D, Kang YA et al (2015) Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in Normal and regenerative conditions. Cell Stem Cell 17:35–46
- Kent DG, Copley MR, Benz C et al (2009) Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. Blood 113:6342–6350

- Praetor A, McBride JM, Chiu H et al (2009) Genetic deletion of JAM-C reveals a role in myeloid progenitor generation. Blood 113:1919–1928
- 16. Yokota T, Oritani K, Butz S et al (2009) The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice. Blood 113:2914–2923
- 17. Arcangeli ML, Bardin F, Frontera V et al (2014) Function of Jam-B/Jam-C interaction in homing and mobilization of human and mouse hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cells 32:1043–1054
- Arcangeli ML, Frontera V, Bardin F et al (2011) JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. Blood 118:4609–4619
- Bailly AL, Grenier JMP, Cartier-Michaud A et al (2020) GRASP55 is dispensable for Normal hematopoiesis but necessary for Myc-dependent leukemic growth. J Immunol 204:2685–2696
- 20. De Grandis M, Bardin F, Fauriat C et al (2017) JAM-C identifies Src family kinase-activated leukemia-initiating cells and predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia. Cancer Res 77:6627–6640

Molecular mechanisms of JAM-C in leukemic stemness maintenance in Acute myeloid leukemia

Previous studies from the laboratory have shown that the adhesion molecule JAM-C is expressed by haematopoietic stem cells (HSC) and contributes to haematopoietic homeostasis. JAM-C is also expressed by leukemic stem cells (LSC) that are responsible of relapse in acute myeloid leukemia (AML). The aim of my PhD was to explore whether the signaling downstream of JAM-C could play a role in LSCs maintenance.

I have shown that JAM-C is cleaved and releases an intracellular domain (ICD) upon transfection of a c-terminally flagged form of JAM-C with *in HELA cells*. JAM-C ICD interacts with the golgi cargo receptor GRASP55, as well with proteins of the splicing machinery, as demonstrated by proteomic experiments.

Along this line, I contributed to a study showing that genetic deletion of GRASP55 in mice does not induce any defect in normal hematopoiesis. However, GRASP55 inhibition by shRNAs in leukemic B cells reduces engraftment by altering an unconventional transport pathway without affecting JAM-C expression (Bailly et al. 2020).

Given that JAM-C ICD interacts with splicing proteins, we also investigated whether alternative splicing of certain mRNAs was associated with the expression of JAM-C in cell lines. We identified a correlation between JAM-C expression, stemness and the presence of alternative transcripts encoding for circadian proteins. Circadian rhythm is involved in the retention of leukemic cells within the bone marrow, as demonstrated in a collaborative study to which I participated (He et al. 2018).

Finally, we have identified differential splicing profiles that are associated with the expression of JAM-C and other LSC markers such as GPR56 in three retrospective cohorts of patient samples. This allowed us to establish a splicing score (SPL9) associated with poor prognosis and predictive of treatment response. In the future, this score should be used to help for therapeutic decision making

Julien Grenier Thèse pour l'obtention du titre de docteur en biologie, spécialité oncologie Thèse soutenue le 28 septembre 2021

Mécanismes moléculaires impliquant JAM-C dans le maintien du caractère souche des cellules de Leucémies Aigües Myéloïdes

Des études antèrieures du laboratoire ont montré que la molécule d'adhérence JAM-C contribue à l'homéostasie de l'hématopoïèse normale. JAM-C est également exprimée par les cellules souches leucémiques (CSL) responsables des rechutes dans la Leucémie Aigue Myeloïde (LAM). L'objectif de mon projet de thèse était d'explorer si la signalisation en aval de JAM-C pouvait jouer un rôle dans la maintenance des CSL.

En surexprimant une forme recombinante de JAM-C comportant un flag en C-terminal dans des cellules *in vitro*, j'ai pu démontrer que JAM-C est clivée et libère un fragment intracellulaire (ICD). Ce dernier interagit avec la protéine GRASP55, impliquée dans le transport protéique non-conventionnel, ainsi qu'avec des protéines du complexe de l'épissage, comme démontré par des expériences de protéomique.

J'ai pu contribuer à une étude montrant que la délétion génique de GRASP55 chez la souris n'entraîne aucun défaut dans l'hématopoïèse normale. Cependant, l'inhibition de GRASP55 par des shRNA dans des cellules B leucémiques réduit la prise de greffe en altérant une voie de transport non-conventionnelle sans affecter pour autant l'expression de JAM-C (Bailly et al. 2020).

Ayant trouvé que l'ICD de JAM-C interagissait avec les protéines de l'épissage, nous avons également cherché si l'épissage alternatif de certains ARNm était associé à l'expression de JAM-C par des lignées cellulaires. Nous avons identifié une corrélation entre l'expression de JAM-C, le caractère souche et la présence de transcrits alternatifs codant pour des protéines du cycle circadien. Ce dernier participe à la rétention des cellules leucémiques au sein de la moëlle osseuse, comme démontré dans un travail collaboratif auquel j'ai pu participer (He et al. 2018).

Enfin, nous avons pu identifier des profils d'épissage différentiels qui étaient associés à l'expression de JAM-C et à celle d'autres marqueurs des CSLs tel que GPR56 dans des cohortes rétrospectives d'échantillons de patient. Ceci nous a permis d'établir un score d'épissage (SPL9) associé au mauvais pronostic et prédictif de la réponse au traitement. Dans le futur, ce score pourrait être utilisé en routine clinique comme une aide à la décision thérapeutique.

Julien Grenier

Thèse pour l'obtention du titre de docteur en biologie, spécialité oncologie Thèse soutenue le 28 septembre 2021