

Université de Montréal

Auto-renouvellement et reprogrammation oncogénique dans les leucémies aiguës

par

Elizabeth Ottoni

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC)

Programme de Biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc) en Biologie moléculaire - Option Générale

Avril 2017

© Elizabeth Ottoni, 2017

RÉSUMÉ

Malgré que le processus de leucémogénèse diffère parmi les différents sous-types de leucémies aiguës, l'étape de reprogrammation oncogénique y est toujours essentielle. En effet, plusieurs oncogènes confèrent des capacités d'auto-renouvellement aberrantes aux progéniteurs hématopoïétiques. Ainsi, ces cellules reprogrammées persistent davantage *in vivo* et acquièrent des mutations secondaires menant au développement de la leucémie ou à la rechute après traitement. Nous avons identifié deux nouveaux mécanismes contribuant à l'auto-renouvellement et à la reprogrammation oncogénique. Dans le modèle de leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T), les oncogènes SCL et LMO1 diminuent l'expression des protéines ribosomales dans les thymocytes pré-leucémiques, ce qui provoque une diminution de la taille cellulaire et de la synthèse protéique. Cet état est associé à une faible prolifération et une capacité d'auto-renouvellement favorisant ainsi la reprogrammation oncogénique par SCL et LMO1 et l'émergence des cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC). De plus, la LAL-T, qui se manifeste suite à des mutations activatrices de *NOTCH1*, est caractérisée par une augmentation de la taille cellulaire, de la synthèse protéique et de l'expression des protéines ribosomales. Ceci suggère qu'une transition de faible à haut taux de synthèse protéique pourrait être importante pour la progression des pré-LSCs en cellules propagatrices de leucémie (LPC). Dans le modèle de la leucémie aiguë myéloïde (LAM), nous avons trouvé que le réarrangement chromosomique de MLL-AF6 provoque la perte d'une hélice alpha normalement conservée en amont du premier domaine d'association à RAS de la protéine AF6. Ceci induit la dimérisation de MLL-AF6 et confère une capacité d'auto-renouvellement aberrante aux progéniteurs myéloïdes. Remarquablement, la réinsertion de l'hélice alpha empêche la dimérisation et abroge complètement l'auto-renouvellement et la leucémogénèse. Globalement, nos travaux démontrent l'importance de l'auto-renouvellement dans la reprogrammation oncogénique et offrent de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des leucémies aiguës.

Mots-clés :

Auto-renouvellement; reprogrammation oncogénique; leucémies aiguës; SCL et LMO1; cellules souches pré-leucémiques; cellules propagatrices de leucémie; synthèse protéique; biogénèse des ribosomes; MLL-AF6; dimérisation.

ABSTRACT

Although the leukemogenic process can differ between acute leukemia subtypes, several oncogenes are known to confer aberrant self-renewal properties to hematopoietic progenitors. As a result, these self-renewing cells persist *in vivo* and can acquire additional mutations, thus leading to leukemia development or relapse after treatment. We have identified two novel mechanisms by which the SCL and LMO1 oncogenes in T-cell acute lymphoblastic leukemia and the MLL-AF6 oncogene in acute myeloid leukemia promote self-renewal and oncogenic reprogramming. In the T-ALL model, we previously showed that transcriptional activation by the SCL and LMO1 oncogenes is required for oncogenic reprogramming and T-ALL development. We now identify a novel mechanism where transcriptional down-regulation of ribosomal protein gene expression in pre-leukemic thymocytes results in a concomitant decrease in cell size and in protein synthesis. This is associated with decreased cell proliferation and sustained self-renewal, which altogether contributes to SCL and LMO1 oncogenic reprogramming and the emergence of pre-LSCs. Furthermore, the acquisition of *NOTCH1* mutations leading to overt T-ALL is associated with an increase in cell size, protein synthesis and ribosomal protein gene expression, suggesting that a switch from low to high protein synthesis rates may be important for leukemia progression. In the AML model, we found that MLL-AF6 translocations result in the loss of a conserved N-terminal alpha-helix in the first RAS-association domain of AF6. This induces protein fusion dimerization and confers aberrant self-renewal activity to myeloid progenitors. Strikingly, reinsertion of the alpha-helix completely hinders dimerization and thus, abrogates self-renewal and leukemogenesis. Taken together, our results demonstrate that self-renewal is a critical determinant of oncogenic reprogramming and offer new therapeutic strategies in acute leukemia.

Key words:

Self-renewal; oncogenic reprogramming; acute leukemia; SCL and LMO1; pre-leukemic stem cells; leukemia-propagating cells; protein synthesis; ribosome biogenesis; MLL-AF6; dimerization.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Abstract	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Dédicace.....	xiii
Remerciements	xiv
Avant-propos et contributions des auteurs	xv
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	17
1.1 L'hématopoïèse	17
1.1.1 Le système hématopoïétique	17
1.1.2 Les cellules souches hématopoïétiques	17
1.1.2.1 La multipotence	19
1.1.2.2 L'auto-renouvellement.....	19
1.1.2.3 La quiescence	21
1.1.3 Les progéniteurs hématopoïétiques	23
1.1.4 Les cellules spécialisées.....	24
1.2 Les cancers hématologiques.....	24
1.2.1 Les caractéristiques et statistiques des cancers hématologiques.....	24
1.2.2 La leucémie	25
1.2.3 La notion d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs.....	26
1.3 Les mécanismes de leucémogénèse	28
1.3.1 Le modèle des cellules souches cancéreuses	28
1.3.2 La reprogrammation oncogénique et l'auto-renouvellement.....	30
1.4 La reprogrammation oncogénique dans les leucémies aiguës	32
1.4.1 La leucémie aiguë lymphoblastique de type T : SCL et LMO1	32
1.4.2 La leucémie aiguë myéloïde : MLL-AF6	35
1.5 Le projet de recherche	37
1.5.1 La problématique.....	37

1.5.2	L'hypothèse.....	37
1.5.3	Les objectifs.....	38
1.6	Références	39
CHAPITRE 2 : BIOGÉNÈSE DES RIBOSOMES ET SYNTHÈSE PROTÉIQUE		45
2.1	Author contribution.....	46
2.2	Abstract.....	46
2.3	Introduction	46
2.4	Results	48
2.4.1	SCL regulates ribosome and protein synthesis in normal HSCs.....	48
2.4.2	SCL-LMO1 oncogenes decrease cell size and protein synthesis in pre-leukemic thymocytes	50
2.4.3	Decreased protein synthesis in SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes correlates with decreased ribosomal gene expression and limited proliferation	51
2.4.4	SCL-LMO1 leukemic thymocytes acquire increased protein synthesis, ribosomal gene expression and proliferation rates	51
2.4.5	SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes are sensitive to ribosome and protein synthesis inhibitors	52
2.5	Discussion	53
2.6	Materials and methods	55
2.6.1	Mouse models and cell lines	55
2.6.2	Immunomagnetic depletion, thymocyte coculture on MS5-DL4 stromal cells and 2-ME2/PI-103 treatment	56
2.6.3	OP-Puromycin protein synthesis analysis.....	56
2.6.4	Flow cytometry and cell size analysis	57
2.6.5	Chromatin immunoprecipitation and quantitative PCR	58
2.6.6	CFSE cell division analysis	59
2.6.7	RNA-Sequencing and microarray analysis.....	60
2.7	Acknowledgments	60
2.8	References	60
2.9	Figures.....	65
2.10	Supplementary figures.....	73

2.11 Supplementary materials and methods.....	76
2.11.1 5-fluorouracil treatment	76
2.11.2 Compromised bone marrow cells.....	76
2.12 Supplementary references	77
CHAPITRE 3 : DIMÉRISATION.....	78
3.1 Author contribution.....	79
3.2 Abstract.....	79
3.3 Introduction	79
3.4 Results	80
3.4.1 AF6 association with RAS.....	80
3.4.2 Detection of an α N helix.....	81
3.4.3 Insertion of α N blocks leukemogenesis.....	83
3.4.4 Interactors of AF6-induced MLL dimers.....	85
3.4.5 MLL breakpoint positions.....	87
3.5 Discussion	88
3.6 Materials and methods	89
3.6.1 NMR spectroscopy.....	89
3.6.2 Biochemical and biophysical protein analysis	90
3.6.3 Crystallography	90
3.6.4 <i>In vivo</i> oncogenic potential of MLL-AF6.....	91
3.7 Acknowledgments	92
3.8 References	92
3.9 Figures.....	97
3.10 Supplementary figures.....	110
3.11 Supplementary materials and methods.....	123
3.11.1 Plasmid constructs and antibodies.....	123
3.11.2 Purification of recombinant proteins	124
3.11.3 Cell cultures and immunoprecipitation.....	124
3.11.4 Methylcellulose colony-forming assays	125
3.11.5 Flow cytometry analysis	125
3.11.6 Proteomics.....	125

3.12 Supplementary references	128
CHAPITRE 4 : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	129
4.1 La reprogrammation oncogénique par SCL et LMO1.....	129
4.1.1 La mise à jour de nos connaissances et la problématique actuelle.....	129
4.1.2 Le rôle de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique : HSCs.....	129
4.1.3 Le rôle de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique : pré-LSCs.	130
4.1.4 Le rôle de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique : LPCs	133
4.1.5 Le modèle de régulation ribosomale et traductionnelle par SCL.....	134
4.1.6 Le mécanisme de répression ribosomale et traductionnelle par SCL.....	135
4.2 La reprogrammation oncogénique par MLL-AF6	137
4.2.1 La mise à jour de nos connaissances et la problématique actuelle.....	137
4.2.2 Le rôle de la dimérisation de MLL-AF6.....	137
4.3 Les mécanismes communs de reprogrammation oncogénique	139
4.3.1 L'auto-renouvellement	139
4.3.2 La biogénèse des ribosomes et la synthèse protéique ?.....	140
4.4 Conclusion	142
4.5 Références	143
Annexe : Figures complémentaires.....	xvii

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	17
Figure 1. La hiérarchie hématopoïétique chez l'adulte	18
Figure 2. L'incidence des sous-types de cancers hématologiques	26
Figure 3. Le modèle de l'évolution des cellules souches cancéreuses	29
Figure 4. L'auto-renouvellement dans la reprogrammation oncogénique.....	31
Figure 5. Le développement intra-thymique des cellules T.....	34
CHAPITRE 2 : BIOGÉNÈSE DES RIBOSOMES ET SYNTHÈSE PROTÉIQUE	45
Figure 1. SCL regulates ribosome and protein synthesis in normal HSCs.....	65
Figure 2. SCL-LMO1 oncogenes decrease cell size and protein synthesis in pre-leukemic thymocytes.....	67
Figure 3. Decreased protein synthesis in SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes correlates with decreased ribosomal gene expression and limited proliferation	69
Figure 4. SCL-LMO1 leukemic thymocytes acquire increased protein synthesis, ribosomal gene expression and proliferation rates.....	70
Figure 5. SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes are sensitive to ribosome and protein synthesis inhibitors.....	72
Figure S1. SCL binds promoters of genes involved in translation initiation and elongation, polysome formation and rRNA processing	73
Figure S2. SCL-LMO1 pre-leukemic and leukemic thymocytes have differential cell sizes compared to wild type thymocytes	74
Figure S3. Increased protein synthesis in SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes correlates with release from DN3 differentiation blockage	75
Figure S4. Ribosome and protein synthesis inhibitors do not significantly decrease cell size in wild type thymocytes	76
CHAPITRE 3 : DIMÉRISATION	78
Figure 1. Structure of the AF6 RA1 domain complex with activated RAS	97
Figure 2. The α N helix is present in AF6 and augments its binding to RAS	99
Figure 3. Inclusion of the α N helix stabilizes the AF6 RA1 domain and prevents its dimerization but this secondary structure element is lost in all <i>MLL-AF6</i> patients.....	101

Figure 4. Insertion of the α N helix between MLL and AF6 disrupts myeloid immortalization and blocks its leukemogenic potential in mice	103
Figure 5. BioID proteomics reveal protein partners specific to monomeric and dimeric MLL-AF6 fusions	105
Figure 6. Description of subcellular localizations and biological processes of specific partner proteins	106
Figure 7. Breakpoint positions in <i>MLL</i> gene translocations and the dimerization capacity of resultant fusion proteins	108
Supp. Figure 1. Proteins containing RAS binding domains in the basal metazoan <i>Trichoplax adhaerens</i> show correlating domain organizations and strong sequence similarity to their human orthologues	110
Supp. Figure 2. Biochemical properties of the core AF6 RA1 domain, backbone assignment for the N-terminally extended AF6 RA1 domain, and structure statistics for the X-Ray crystal structure of RA1 complexed with RAS-GMPPNP.....	112
Supp. Figure 3. An RA1 domain with the extended helix demonstrates significantly tighter binding to RAS-GMPPNP and only a small subset of RAS binding domains interact with RAS in this manner	114
Supp. Figure 4. Interface between the α N helix and core RA domain.....	116
Supp. Figure 5. Insertion of the α N helix between MLL and the AF6 RA1 domain disrupts myeloid immortalization and blocks the oncogenic potential of MLL in mice	118
Supp. Figure 6. The MLL interactome and the importance of breakpoint position in <i>MLL</i> gene translocations on the dimerization capacity of resultant fusion proteins	120
Supp. Figure 7. Position of coiled coil or dimerization domains in relation to <i>MLL</i> breakpoints in protein partners of cytoplasmic origin.....	122
ANNEXE : FIGURES COMPLÉMENTAIRES.....	xvii
Figure A1. Le modèle de régulation ribosomale et traductionnelle par SCL dans les cellules souches hématopoïétiques normales et pré-leucémiques	xvii
Figure A2. La régulation de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique pourrait être une fonction commune aux oncogènes des leucémies aiguës	xviii

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-ME2	2-méthoxyestradiol
5-FU	5-fluorouracile
α N	Hélice alpha N-terminale au domaine RA1 de la protéine AF6
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF6/MLLT4	Protéine <i>Afadin/Mixed-lineage leukemia translocated to 4</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
BCR	Région de bris génomique
bHLH	Famille de protéines à motif hélice-boucle-hélice basique
BM	Moelle osseuse
CD4 ⁺ ou 8 ⁺	Thymocyte simple-positif CD4 ⁺ ou CD8 ⁺
CFSE	Carboxyfluorescéine diacétate succinimidyle ester
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
ChIP-Seq	Immunoprécipitation de la chromatine suivie du séquençage de l'ADN
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CMP	Progéniteur myéloïde commun
CSC	Cellule souche cancéreuse
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole
DC	Cellule dendritique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DN1-4	Thymocyte double-négatif stade 1 à 4
DP	Thymocyte double-positif CD4 ⁺ et CD8 ⁺
ERG	Facteur de transcription <i>ETS-related gene</i>
ESC	Cellule souche embryonnaire
ETP	Précurseur thymique précoce
ETS	Facteur de transcription <i>Erythroblast transformation-specific</i>
FACS	Cytométrie en flux
FLI1	Facteur de transcription <i>Friend leukemia integration 1</i>

FSC	Paramètre de lumière dispersée vers l'avant
GMP	Progéniteur de granulocyte/macrophage
GSC	Cellule souche germinale
HD	Domaine extracellulaire d'hétérodimérisation
<i>HOX</i>	Gène <i>homeobox</i>
HPC7	Lignée cellulaire murine de progéniteurs hématopoïétiques multipotents
HSC	Cellule souche hématopoïétique
IgH	Chaîne lourde des immunoglobulines
IT-HSC	Cellule souche hématopoïétique à potentiel de reconstitution à moyen terme
ISP8	Thymocyte immature simple-positif CD8 ⁺
LAL/ALL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LAL-T/T-ALL	Leucémie aiguë lymphoblastique de type T
LAM/AML	Leucémie aiguë myéloïde
LCL	Leucémie chronique lymphoblastique
LCM	Leucémie chronique myéloïde
LIN ⁻	Progéniteur hématopoïétique lignage-négatif
LMO1/2	Facteur de transcription <i>LIM domain only 1/2</i>
LK	Leucémique
LPC	Cellule propagatrice de leucémie
LSC	Cellule souche leucémique
LT-HSC	Cellule souche hématopoïétique à potentiel de reconstitution à long terme
MDS	Syndrome myélodysplasique
MEP	Progéniteur de mégacaryocyte/érythrocyte
MLL	Protéine <i>Mixed-lineage leukemia</i>
MLL-AF6	Protéine de fusion MLL-AF6
MPP	Progéniteur à potentiel multiple
MS5-DL4	Cellule stromale exprimant le ligand de NOTCH <i>Delta-like 4</i>
MYC	Facteur de transcription MYC
NCR	Région N-terminale conservée

NK	Cellule tueuse naturelle
NMR	Résonance magnétique nucléaire
NOD/SCID	Modèle murin diabétique non-obèse avec immunodéficience sévère
NOTCH1	Protéine <i>Neurogenic locus notch homolog protein 1</i>
NUP98	Protéine <i>Nucleoporin 98 kDa</i>
NUP98-PHF23	Protéine de fusion NUP98-PHF23
OP-Puro	<i>O</i> -propargyl-puromycine (OP-Puromycine)
PEST	Domaine riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine
PHD	Homéodomaine de plante
PHF23	Protéine <i>PHD finger 23</i>
PI-103	3-[4-(4-morpholinyl)pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pyrimidine-2-yl]phénol
Pré-LK	Pré-leucémique
Pré-LSC	Cellule souche pré-leucémique
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative
RA1	Premier domaine d'association à RAS
RAS	Protéine <i>Rat sarcoma</i>
RNA-Seq	Séquençage de l'ARN
RPL/RPS	Protéine ribosomale de la grande ou de la petite sous-unité du ribosome
RUNX1	Facteur de transcription <i>Runt-related transcription factor</i>
SC	Cellule souche hématopoïétique de support
SCL/TAL1	Facteur de transcription <i>Stem cell leukemia/T-cell acute lymphocytic leukemia 1</i>
SSC	Paramètre de lumière dispersée vers le côté
ST-HSC	Cellule souche hématopoïétique à potentiel de reconstitution à court terme
TCR	Récepteur des cellules T
TSS	Site d'initiation de la transcription
WT	De type sauvage

À tous ceux qui ont attisé ma passion...

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice, Dr Trang Hoang, pour son encadrement, soutien confiance et encouragement continu durant ma maîtrise. Je la remercie également de m'avoir offert d'excellentes opportunités de présenter mes travaux scientifiques, même au tout début de mes études graduées. Merci également à Dr Matthew J Smith de m'avoir présenté l'opportunité de collaborer avec lui pour le projet MLL-AF6.

Merci à tous les membres du laboratoire, passés et présents. Notamment, merci à Shanti Rojas-Sutterlin pour ses travaux exceptionnels dans les cellules souches hématopoïétiques qui ont appuyé mes résultats et qui m'ont permis de rédiger le manuscrit sur SCL. Merci à Bastien Gerby et André Haman pour leur aide à ma formation technique, et à Maxime Parisotto pour nos nombreuses discussions scientifiques. Un merci particulier à Véronique Litalien pour son aide indispensable avec les souris et son amitié qui s'étend au-delà du laboratoire. Je remercie également Danièle Gagné, Gaël Dulude et Christian Charbonneau des plateformes de cytométrie en flux et de bio-imagerie de l'IRIC pour leur support technique.

Merci à mes parents, Marjolaine et Vincent, qui m'ont encouragé à entamer cette expérience enrichissante et qui m'ont soutenu tout au long de celle-ci. À Ludo, ton immense soutien, ta patience inimaginable et ton encouragement sans-limites ont tous contribué à leur façon au succès de ma maîtrise. Merci de m'avoir fait garder les deux pieds sur terre durant les périodes difficiles et de t'être assuré que je maintienne une vie sociale malgré mon horaire bien chargé! La fin de cette étape marque le début d'une nouvelle aventure avec toi; j'ai hâte!

Finalement, merci aux membres du jury, Dr Julie Lessard et Dr Éric Milot, pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire de maîtrise.

AVANT-PROPOS ET CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

À ce jour, les cancers hématologiques représentent jusqu'à 10% de tous les nouveaux cas de cancers diagnostiqués aux États-Unis. Dans le contexte des leucémies aiguës, la chimiothérapie actuelle peut efficacement induire une rémission à long terme chez les patients cependant, la forte incidence des cas de rechute s'avère hautement mortelle. De nombreux efforts sont alors consacrés à développer une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contribuant à la leucémogénèse, d'où l'objectif de ce projet de recherche de maîtrise.

Ce mémoire de maîtrise est présenté en quatre chapitres. Dans un premier temps, le Chapitre 1 consiste d'une revue exhaustive de la littérature qui permet d'introduire le lecteur au domaine de l'hématopoïèse et de la leucémie aiguë. Plus précisément, la sous-section 1.3 présente les notions importantes sur les cellules souches cancéreuses et le rôle de l'auto-renouvellement et de la reprogrammation oncogénique durant la leucémogénèse. De plus, la sous-section 1.4 résume la problématique et nos connaissances actuelles des oncogènes SCL et LMO1 impliqués dans la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T) et de l'oncogène MLL-AF6 impliqué dans la leucémie aiguë myéloïde (LAM). Ceux-ci sont abordés davantage dans les Chapitres 2 et 3, respectivement, qui représentent le corps de l'ouvrage.

Le Chapitre 2 porte sur le rôle de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique dans la reprogrammation oncogénique par les oncogènes SCL et LMO1. Il est présenté sous forme d'article scientifique en préparation pour publication que j'ai rédigé et intitulé « *SCL controls ribosomal gene expression and protein synthesis in normal hematopoietic and pre-leukemic stem cells* ». L'hypothèse de travail, les stratégies expérimentales et les travaux portant sur les thymocytes SCL-LMO1 pré-leucémiques et leucémiques ont été majoritairement élaborés et effectués par moi-même durant ma formation de maîtrise. Mes résultats ont été appuyés par ceux de Shanti Rojas-Sutterlin, qui a effectué toutes les expériences dans les cellules souches hématopoïétiques (HSC). Dans ces deux cas, Dr Trang Hoang a supervisé et contribué à l'élaboration des projets de recherche en plus de la rédaction du manuscrit. Mathieu Tremblay a effectué les expériences de microarray dans les souris pré-leucémiques et leucémiques. Maxime Parisotto et Bastien Gerby ont effectué les expériences de CHIP et de marquage CFSE, respectivement, Diogo FT Veiga a effectué les analyses bio-informatiques des données de

RNA-Seq et de microarray, et Véronique Litalien et André Haman ont fourni un support technique. Ainsi, cet article décrit le rôle nouvellement identifié de SCL dans la régulation de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique. Il caractérise l'effet de cette régulation au niveau cellulaire dans les cellules souches hématopoïétiques normales, pré-leucémiques et leucémiques afin de proposer un modèle où celle-ci contribue de façon importante au processus de reprogrammation oncogénique et de leucémogénèse dans la LAL--T.

Les travaux portant sur le rôle de la dimérisation de l'oncogène MLL-AF6 sont présentés au Chapitre 3 et sont issus d'une collaboration entre Dr Matthew J Smith et moi-même, sous la supervision de Dr Trang Hoang et de Dr Mitsuhiro Ikura. Dr Smith a élaboré le projet de recherche, formulé l'hypothèse de travail et effectué la majorité des expériences structurales et biochimiques retrouvées dans l'article intitulé « *Evolution of AF6-RAS association and its implications in mixed-lineage leukemia* ». Ma contribution consiste en l'exécution des expériences fonctionnelles *in vitro* et *in vivo*, l'analyse des résultats et la préparation des figures du manuscrit pour illustrer l'importante contribution de la dimérisation de MLL-AF6 à l'auto-renouvellement, la reprogrammation oncogénique et la leucémogénèse chez la LAM. Dr Smith et Dr Hoang ont rédigé le manuscrit avec un apport de Dr Ikura et les contributions particulières des autres coauteurs sont détaillées dans la section respective du manuscrit.

Finalement, le Chapitre 4 consiste d'une discussion élargie des résultats présentés dans les deux chapitres précédents, de leurs perspectives et de leurs contributions potentielles au domaine de la recherche sur les mécanismes moléculaires de reprogrammation oncogénique dans les leucémies aiguës.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 L'HÉMATOPOÏÈSE

1.1.1 Le système hématopoïétique

Chez l'humain, le système hématopoïétique est responsable de la production des quatre composantes majeures du sang, soit le plasma, les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes [1]. Au stade adulte, il regroupe la moelle osseuse, la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques. Ces organes sont tous interconnectés par un vaste réseau vasculaire, nommé le système circulatoire sanguin, qui permet aux composantes cellulaires de circuler au sein de l'organisme afin d'accomplir leurs fonctions vitales, telles l'apport en oxygène (globules rouges), la protection immunitaire (globules blancs) et la coagulation (plaquettes) [1]. Or, chacune de ces composantes cellulaires possède une durée de vie spécifiquement prédéfinie et par conséquent, le système hématopoïétique doit fournir un apport constant de nouvelles cellules afin de subvenir aux besoins de l'organisme [2]. Il existe donc une certaine hiérarchie parmi les différents types de cellules hématopoïétiques, où les cellules souches hématopoïétiques se retrouvent à l'apex de cette hiérarchie, suivi des progéniteurs hématopoïétiques et finalement des cellules spécialisées (**Figure 1**) [3].

1.1.2 Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) représentent une population de cellules primitives très rares, soit 1 dans 10 000 [4]. Celles-ci résident dans la moelle osseuse, qui agit en tant que niche essentielle pour le maintien de leur homéostasie [5]. En effet, ces cellules possèdent trois propriétés uniques qui les distinguent des autres, soit la multipotence, l'auto-renouvellement, et la quiescence [6]. Un groupe restreint de facteurs de transcription hématopoïétiques est responsable de moduler l'expression des gènes régulant ces propriétés, ce qui maintient le caractère dit « souche » des HSCs. Il est donc primordial qu'il y ait un équilibre précis entre l'auto-renouvellement et la différenciation des HSCs afin de subvenir à l'apport constant de cellules exigé par le système hématopoïétique [7].

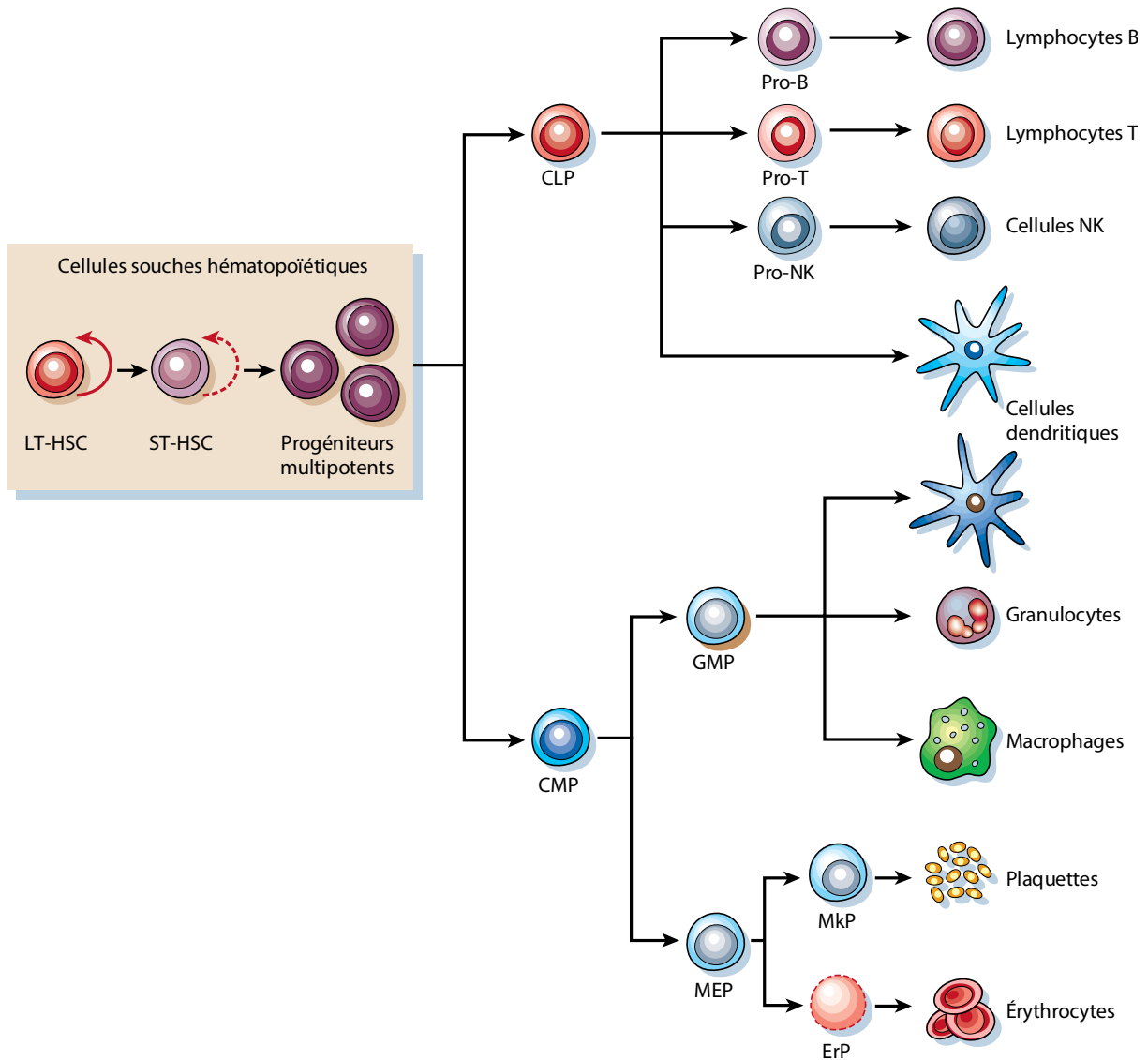


Figure 1. La hiérarchie hématopoïétique chez l'adulte. Les cellules souches hématopoïétiques à potentiel de reconstitution à long terme (LT-HSC) se situent au sommet de la hiérarchie et elles possèdent une capacité illimitée d'auto-renouvellement. Elles se subdivisent en cellules souches hématopoïétiques à potentiel de reconstitution à court terme (ST-HSC), qui possèdent une capacité d'auto-renouvellement limitée, et en progéniteurs à potentiel multiple (MPP). Ces progéniteurs se différencient en progéniteurs oligopotents appartenant soit à la lignée myéloïde (CMP), qui génère également des progéniteurs de mégacaryocytes/érythrocytes (MEP) et de granulocytes/macrophages (GMP), ou à la lignée lymphoïde (CLP). Finalement, ces progéniteurs subissent une différenciation terminale pour générer toutes les cellules spécialisées du système hématopoïétique, soient les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques, les granulocytes, les macrophages, les plaquettes, et les érythrocytes.

Traduit et adapté de Reya et al. (2011) *Nature* (414)6859 : p. 105-111.

1.1.2.1 La multipotence

Les cellules souches hématopoïétiques sont les plus primitives dans la hiérarchie du système hématopoïétique car elles ont la capacité de générer tous les types de cellules spécialisées [6]. Ainsi, les HSCs se différencient dans la moelle osseuse en progéniteurs à potentiel multiple (MPP) qui vont ensuite diverger en progéniteurs lymphoïdes (CLP) ou myéloïdes (CMP) communs. À ce stade, ces progéniteurs perdent leur potentiel de multipotence mais ils peuvent néanmoins continuer de se différencier en cellules spécialisées. Ainsi, les CLPs produisent les lymphocytes T et B et les cellules tueuses naturelles (NK) alors que les CMPs génèrent les granulocytes, les monocytes/macrophages, les érythrocytes (globules rouges) et les plaquettes. Les cellules dendritiques (DC), quant à elles, peuvent être issues des CLPs ou des CMPs [8].

D'un point de vue moléculaire, ce sont les facteurs de transcription des HSCs qui activent un programme d'expression génique intrinsèque permettant ainsi leur différenciation cellulaire contrôlée [7]. Ce processus implique des étapes cruciales d'engagement de lignage, notamment à la transition de MPP à CLP ou CMP, où les cellules sont destinées à se différencier de façon irréversible en un type cellulaire particulier. L'expression lignage-spécifique de certains facteurs de transcription dicte alors le destin de ces cellules. Par exemple, le facteur de transcription *Stem cell leukemia/ T-cell acute lymphocytic leukemia 1* (SCL/TAL1) est essentiel pour l'hématopoïèse primitive et définitive, le développement des HSCs en plus de la différenciation dans les lignages érythroïdes et mégacaryocytaires [9, 10].

Grâce à la technique de cytométrie en flux (FACS) et l'usage d'anticorps monoclonaux reconnaissant différents marqueurs de surface cellulaire, il a été possible d'identifier chacune de ces sous-populations de cellules afin d'en définir la hiérarchie [6]. La cytométrie en flux a également permis d'isoler ces populations, même les plus rares, pour mieux caractériser leurs propriétés ou fonctions au sein du système hématopoïétique en plus détecter toute anomalie de différenciation pouvant survenir à n'importe quel stade de l'hématopoïèse [7].

1.1.2.2 L'auto-renouvellement

La capacité d'auto-renouvellement est essentielle pour le maintien du réservoir de cellules souches hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse. Cette propriété permet aux HSCs de

généraliser au moins une cellule identique à elles-mêmes lorsqu'elles subissent une division cellulaire, ce en absence de différenciation [6]. Cette division cellulaire peut s'effectuer de deux façons différentes, soit de façon symétrique où les deux cellules filles héritent le caractère « souche » de la cellule mère, soit de façon asymétrique où seulement une cellule fille demeure « souche » alors que l'autre est destinée à se différencier [11].

Il existe également une sous-hiérarchie au sein des HSCs qui est définie par la capacité de ces cellules multipotentes à reconstituer le système hématopoïétique complet d'un receveur suite à une transplantation de moelle osseuse. En effet, comme le nom l'indique, seules les cellules souches hématopoïétiques à potentiel de reconstitution à long terme (LT-HSC) peuvent rétablir l'hématopoïèse de façon permanente et ce, à plus de 8 mois suivant la transplantation. Or, la présence de cellules souches hématopoïétiques à potentiel de reconstitution à moyen (IT-HSC) et à court terme (ST-HSC) permet la reconstitution de la moelle osseuse entre 4-6 mois ou 1-2 mois, respectivement. Ces différentes capacités de régénérer le système hématopoïétique reflètent ainsi la perte graduelle du potentiel d'auto-renouvellement au sein de la sous-hiérarchie des HSCs. Finalement, il est important de mentionner que la transplantation de MPP peut également soutenir l'hématopoïèse de façon très transitoire (4-8 semaines) grâce à leur multipotence malgré l'absence d'auto-renouvellement [12].

Le maintien des propriétés d'auto-renouvellement des HSCs se fait en partie grâce au micro-environnement de la niche hématopoïétique. En effet, celle-ci peut fournir des signaux contrôlant le mode de division cellulaire à effectuer par les HSCs, soit via des interactions cellule-cellule, la sécrétion de cytokines, ou même le positionnement relatif des cellules quant à la niche [11, 13]. D'autre part, certains facteurs de transcription hématopoïétiques intrinsèques aux HSCs peuvent réguler l'expression de gènes essentiels à l'auto-renouvellement, tel est le cas de SCL/TAL1 [14].

L'évaluation du potentiel d'auto-renouvellement d'une cellule se fait principalement par l'essai fonctionnel *in vivo* de transplantations sériées [15]. Plus précisément, un nombre fixe de cellules hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse d'une souris exprimant le marqueur de surface CD45.2 est transplanté dans une souris syngénique (CD45.1) receveuse ayant préalablement subi une irradiation létale. Plus une cellule souche hématopoïétique peut s'auto-renouveler de

façon substantielle au sein de cette première souris receveuse, plus elle sera apte à reconstituer le système hématopoïétique d'une souris receveuse subséquente. Ainsi, le nombre de transplantations sériées que la population initiale de cellules souches hématopoïétiques peut effectuer reflète sa capacité d'auto-renouvellement [16]. Cette propriété peut également être évaluée *in vitro* dans une expérience de formation de colonies en méthylecellulose sériée. L'expérience consiste à mettre un nombre fixe et limité de cellules de moelle osseuse dans un milieu de culture semi-solide contenant des cytokines et facteurs de croissance qui promeuvent leur expansion clonale. Semaine après semaine, le nombre et le type de colonies cellulaires formées sont relevés afin d'évaluer la clonalité et l'auto-renouvellement des HSCs et des progéniteurs. Ensuite, le même nombre initial de cellules est remis en culture et, si une cellule souche ou un progéniteur hématopoïétique n'est pas apte à s'auto-renouveler, ils seront épuisés et ne pourront donc pas subir de mise en culture sériée [17].

1.1.2.3 La quiescence

Dans un état d'homéostasie, les cellules souches hématopoïétiques se situent majoritairement dans la phase G_0 , ou de quiescence, du cycle cellulaire et elles se divisent peu fréquemment [18]. En partie, cette faible pression proliférative les épargne de la probabilité d'acquérir des dommages à l'ADN ou des mutations associées à la réplication de l'ADN et la division cellulaire [19]. Ceci permet alors de maintenir un réservoir de HSCs génétiquement intègres dans la moelle osseuse et empêche également leur épuisement au fil du temps, ce malgré l'apport exigeant de cellules hématopoïétiques qu'elles doivent fournir. En effet, il y a une très forte corrélation entre la prolifération soutenue des HSCs et la perte de leurs fonctions « souches » [16].

L'établissement et le maintien de l'état quiescent des HSCs est médié à la fois par des facteurs cellulaires extrinsèques et intrinsèques [20]. De façon extrinsèque, la niche hématopoïétique est importante pour le maintien de la quiescence chez les HSCs grâce aux différents types cellulaires qui s'y retrouvent. En effet, les cellules résidentes de la niche expriment des ligands extracellulaires et sécrètent des facteurs solubles, tels les cytokines, qui promeuvent la quiescence des HSCs [20]. La niche peut être subdivisée en deux régions distinctes où la niche endostéale, qui contient les ostéoblastes, les cellules mésenchymateuses et les cellules

endothéliales, favorise la présence de HSCs hautement quiescentes [21]. De façon intrinsèque, la quiescence est notamment maintenue par des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et/ou par des programmes génétiques établis par certains facteurs de transcription hématopoïétiques. Par exemple, SCL/TAL1 est fortement exprimé dans les LT-HSCs où il régule négativement la transition G_0 - G_1 en augmentant l'expression de *Cdkn1a* (inhibiteur du cycle cellulaire) et de *Id1* (inhibiteur des protéines E/facteurs de transcription E2A et ETS1) [22], dont leurs rôles dans le maintien des HSCs ont été montrés indépendamment [23, 24]. D'autre part, il a également été démontré que SCL/TAL1 régule l'expression de *c-Kit* dans les HSCs [25] et d'autre part, c-KIT est connu comme étant essentiel pour maintenir les HSCs dans un état constant de quiescence [26].

L'approche expérimentale la plus directe pour mesurer le niveau de quiescence des cellules souches hématopoïétiques consiste à quantifier le nombre de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, soit les phases G_0 , G_1 , S, G_2 ou M. Cette analyse s'effectue principalement par cytométrie en flux grâce à un type de marquage qui détecte conjointement le contenu d'ADN cellulaire (DAPI) et la présence d'une protéine nucléaire associée à la prolifération (Ki-67) [27]. Ainsi, les HSCs quiescentes sont discriminées des cellules prolifératrices par l'absence du marqueur Ki-67. Une autre approche consiste à retracer le nombre de divisions cellulaires qu'une cellule a effectué en utilisant un colorant cellulaire, le CFSE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*), détectable par cytométrie en flux dans des cellules viables [28]. Le principe de cette technique repose sur le fait qu'après chaque division cellulaire, les cellules filles possèdent deux fois moins de molécules de CFSE que la cellule mère. Par conséquent, les HSCs majoritairement quiescentes contiennent un plus haut signal d'intensité de fluorescence de CFSE que les cellules prolifératrices. Finalement, il est également possible d'étudier la capacité des cellules souches hématopoïétiques à retourner dans un état de quiescence suivant un stress prolifératif induit par le 5-fluorouracile (5-FU), une drogue myélosuppressive [29]. En effet, seules les HSCs pouvant redevenir quiescentes maintiennent leurs propriétés « souches », notamment l'auto-renouvellement, et peuvent être transplantées en série [30]. La technique de traitement au 5-FU peut alors révéler tout défaut des fonctions « souches » des cellules souches hématopoïétiques.

1.1.3 Les progéniteurs hématopoïétiques

Tel que mentionné précédemment, les cellules souches hématopoïétiques doivent constamment générer des progéniteurs à potentiel multiple (MPP) car ces derniers sont dépourvus d'auto-renouvellement [6]. Or, comme leur nom l'indique, ces cellules possèdent encore la capacité de se différencier en toutes les lignées cellulaires qui découlent de cette population hétérogène au sein de la hiérarchie hématopoïétique. Ainsi, le rôle des MPPs est révélé dans les premières semaines suivant une transplantation de moelle osseuse [31, 32]. En effet, leur potentiel de prolifération extensive permet une reconstitution transitoire mais suffisante pour maintenir le système hématopoïétique du receveur jusqu'à l'activation des HSCs, qui est plus lente. Les MPPs contribuent alors directement à l'efficacité de reconstitution de la greffe, ce par leur présence et leur abondance dans la moelle osseuse du donneur [33].

Par la suite, les MPPs génèrent des progéniteurs hématopoïétiques dorénavant oligopotents, soit les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) ou les progéniteurs myéloïdes communs (CMP), qui peuvent uniquement produire les cellules appartenant aux lignées lymphoïdes et myéloïdes respectivement [6]. Cependant, ces deux types de progéniteurs possèdent également des rôles importants durant la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. En effet, il a été démontré que la co-transplantation de CLPs purifiés accélère la reconstitution fonctionnelle du compartiment de cellules immunitaires et par conséquent, diminue la susceptibilité du patient aux infections virales post-transplantation [34]. Quant aux CMPs, leur co-transplantation corrige en partie la neutropénie post-irradiation et protège le receveur contre la mortalité associée à deux types de pathogènes opportunistes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus fumigatus* [35].

Finalement, ces progéniteurs oligopotents produisent ultimement toutes les cellules spécialisées du système hématopoïétique [32] qui sont engagées soit dans la lignée lymphoïde par le biais des cellules pro-T ou pro-B issues des CLPs [36], dans la lignée myéloïde par le biais des progéniteurs de granulocytes/macrophages (GMP) issus des CMPs, ou dans la lignée mégacaryocytaire/érythrocytaire par le biais des progéniteurs de mégacaryocytes/érythrocytes (MEP) également issus des CMPs [37].

1.1.4 Les cellules spécialisées

À la base de la hiérarchie hématopoïétique se situent toutes les cellules matures qui sont issues des progéniteurs hématopoïétiques et qui possèdent des fonctions effectrices spécialisées au sein du système sanguin. Parmi celles-ci se retrouvent les lymphocytes T et B responsables de l'immunité innée et acquise, les granulocytes et les macrophages qui protègent contre les infections virales et microbiennes, les érythrocytes qui fournissent l'apport d'oxygène au corps, et les plaquettes qui promeuvent la coagulation [1]. Toutes ces cellules possèdent une durée de vie limitée et variable selon le type cellulaire. Par exemple, les érythrocytes peuvent circuler dans le sang jusqu'à 120 jours avant qu'ils ne soient éliminés par les macrophages de la rate et du foie, alors que les plaquettes ne survivent que 9 jours. Par conséquent, il est estimé qu'à chaque seconde, 2 à 3 millions d'érythrocytes sont produits dans la moelle osseuse et relâchés dans la circulation [1], et que 10^{11} plaquettes sont produites au quotidien chez l'humain [38]. Ainsi, les progéniteurs hématopoïétiques doivent fournir un apport immédiat et constant de nouvelles cellules afin de maintenir l'homéostasie du système sanguin, ceci grâce à leur potentiel extensif de prolifération et leur engagement envers la différenciation [32]. Tandis qu'en amont, les cellules souches hématopoïétiques doivent maintenir un équilibre entre leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation pour assurer, respectivement, l'établissement d'un réservoir quasi-illimité de HSCs et la production de progéniteurs [7]. Or, si les HSCs ou les progéniteurs subissent des modifications ou lésions génétiques (mutations) l'homéostasie du système hématopoïétique peut être perturbée, ce qui mène fréquemment à un état pathologique ou même au cancer.

1.2 LES CANCERS HÉMATOLOGIQUES

1.2.1 Les caractéristiques et statistiques des cancers hématologiques

La prolifération incontrôlée et le dérèglement des fonctions des cellules hématopoïétiques entraînent l'émergence de cancers hématologiques, ou cancers du sang. Selon la Société Américaine du Cancer, il est estimé que les cancers hématologiques représenteront environ 10% de tous les nouveaux cas de cancers diagnostiqués aux États-Unis en 2017 [39]. Ces cancers se subdivisent en trois sous-groupes majeurs selon le type cellulaire affecté et anormalement

augmenté dans le sang. Ainsi, les leucémies représentent 36% des cancers hématologiques et elles affectent les globules blancs de la moelle osseuse et du système lymphatique [40]. Les lymphomes (47%) sont un type de cancer des ganglions lymphatiques qui affectent plus fréquemment les lymphocytes B que les lymphocytes T [41]. Et finalement, les myélomes (17%) affectent les plasmocytes, un type de globules blancs responsable de la production d'anticorps [42] (**Figure 2**). Notamment, au cours des dernières années, l'amélioration des techniques de diagnostic et le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses ciblées ont permis d'augmenter le taux de survie des patients atteints de cancers hématologiques. Dorénavant, ce dernier est en moyenne de 50 à 89% selon le type de cancer mais il demeure toutefois très faible pour les leucémies aiguës chez les adultes et les patients plus âgés [39].

1.2.2 La leucémie

Malgré le fait que la leucémie est considérée comme un cancer pédiatrique car elle représente 30% de tous les cas de cancers chez l'enfant, la majorité des diagnostics (92%) se font réellement chez les adultes de plus de 20 ans [39]. Il existe quatre sous-types majeurs de leucémie qui sont définis par le type cellulaire affecté (lymphoïde ou myéloïde) et la progression de la pathologie (rapide, dite « aiguë », ou lente, dite « chronique »). Ainsi, la leucémie aiguë lymphoblastique représente 10% des leucémies, la leucémie chronique lymphoblastique 32%, la leucémie aiguë myéloïde 35%, et la leucémie chronique myéloïde 14% (**Figure 2**) [39].

Or, dans tous les cas, la leucémie demeure un cancer du sang et de la moelle osseuse causée par une hyper-prolifération des cellules hématopoïétiques ayant subi un évènement génétique transformateur. Au stade précoce, elle se manifeste par des symptômes généraux de fatigue, fièvre, frissons et maux de tête, alors que les symptômes spécifiques apparaissent avec la progression de la leucémie. La plupart de ces symptômes sont provoqués directement par l'accumulation de cellules leucémiques dans le sang, les organes et la moelle osseuse, soit les douleurs articulaires et osseuses et l'enflure des gencives, de l'abdomen et des ganglions lymphatiques. Tandis que les autres symptômes sont des conséquences de la perte de fonction des cellules hématopoïétiques, tels l'essoufflement, l'anémie, la prédisposition aux ecchymoses et aux saignements, les infections fréquentes et les sueurs nocturnes [40]. Le diagnostic de la leucémie se fait principalement par deux tests hématologiques, soit la formule sanguine

complète et la biopsie ou l'aspiration de moelle osseuse, qui permettent de détecter la présence, le nombre et le type de cellules leucémiques, nommées « blastes ». Ce diagnostic permet alors de classer la leucémie selon l'origine lymphoïde ou myéloïde des blastes, et le cours du traitement y sera adapté en conséquence. D'autant plus, des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire permettent d'identifier spécifiquement les modifications ou lésions génétiques présentes au sein des cellules cancéreuses [43]. Cette information peut alors contribuer à la découverte d'évènements génétiques transformateurs récurrents pour chaque sous-type de leucémie. Par conséquent, il est possible d'adapter davantage l'approche thérapeutique utilisée dans les différents contextes de leucémies, voire idéalement de développer une approche de médecine spécialisée pour traiter le type de leucémie de chaque patient.

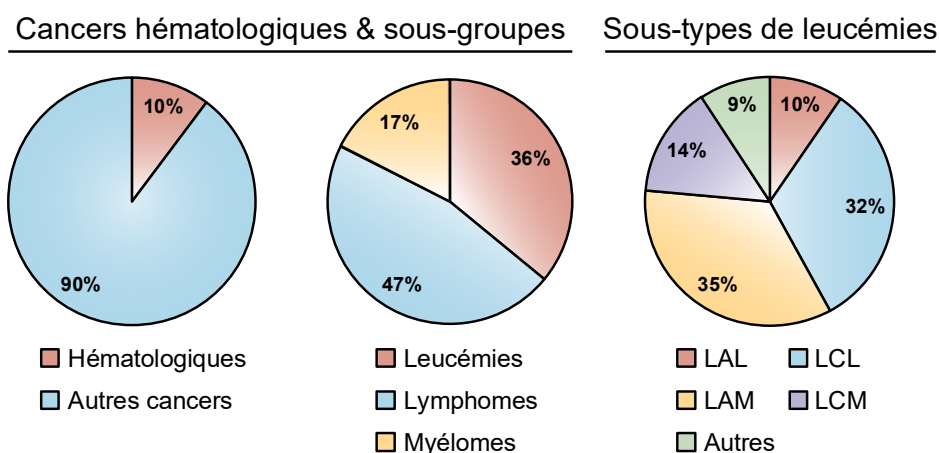


Figure 2. L'incidence des sous-types de cancers hématologiques. Selon la Société Américaine du Cancer, les cancers hématologiques constitueront 10% des nouveaux cas de cancers diagnostiqués aux États-Unis en 2017. Parmi ceux-ci, 36% sont des leucémies, 47% des lymphomes et 17% des myélomes. Dans le cas de la leucémie, l'incidence des sous-types est de 10% pour les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), 32% pour les leucémies chroniques lymphoblastiques (LCL), 35% pour les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), 14% pour les leucémies chroniques myéloïdes (LCM), et 9% pour les autres sous-types non-classifiés.

Adapté de American Cancer Society (2017) *Cancer facts & figures 2017*.

1.2.3 La notion d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs

Tel que mentionné précédemment, la classification des cancers hématologiques peut être poussée davantage en employant des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire [43]. Cette classification peut alors caractériser des sous-groupes moléculaires pour chaque type

de cancer hématologique et elle est importante pour le choix de traitement et le pronostic du patient [44]. Grâce à ces informations, il a été possible d'identifier des translocations chromosomiques et des mutations récurrentes chez certains gènes. Ainsi, un cancer hématologique, comme tout autre cancer, peut être causé soit par la suractivation d'un « oncogène » [45] ou par l'inactivation d'un gène « suppresseur de tumeurs » [46].

Par exemple, certaines leucémies aiguës sont causées par une perte de fonction du suppresseur de tumeurs RUNX1 (*Runt-related transcription factor*) via une mutation ponctuelle bi-allélique du gène qui génère une forme mutante dominante-négative de la protéine [47]. Un autre exemple est la surexpression ectopique des oncogènes SCL/TAL1 et LMO1 dans des précurseurs thymiques due à des translocations chromosomiques impliquant le gène du récepteur des cellules T (TCR) [48]. Alors que dans plus de 90% des cas de leucémies chroniques myéloïdes (LCM), la formation du chromosome de Philadelphie est causée par une translocation chromosomique réciproque entre les chromosomes 9 et 22, ce qui résulte en une protéine chimérique impliquant les gènes *BCR* et *ABL* [49]. Dans le cas des lymphomes B, il y a fréquemment une amplification du nombre de copie de l'oncogène *c-MYC*, ce qui mène à sa sur-transcription et surexpression au sein des cellules cancéreuses [50]. Finalement, la plupart des myélomes sont causés par des translocations chromosomiques impliquant le gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (*IgH*) et plusieurs gènes de régulation du cycle cellulaire, notamment *Ccnd1* [51].

Dans le contexte de la recherche fondamentale, l'identification des aberrations chromosomiques et génétiques a permis d'élucider les mécanismes moléculaires contribuant à l'initiation et à la progression du cancer. De façon plus importante et ce grâce à la recherche translationnelle, ces découvertes ont mené au développement de thérapies ciblées contre les oncogènes majeurs. Un tel exemple est l'emploi d'un inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase aberrante de la protéine chimérique BCR-ABL. Cet inhibiteur, communément appelé Gleevec ou Imatinib, empêche spécifiquement la prolifération des cellules leucémiques et restaure leur différenciation sans toutefois affecter les cellules hématopoïétiques normales [49]. Ainsi, cette approche thérapeutique diminue significativement les effets hors-cibles au sein des cellules et augmente l'efficacité du traitement. Globalement, l'ensemble de ces découvertes a grandement amélioré

le diagnostic, le pronostic et le traitement des cancers hématologiques d'un point de vue clinique.

1.3 LES MÉCANISMES DE LEUCÉMOGÉNÈSE

1.3.1 Le modèle des cellules souches cancéreuses

À ce jour, les avancées scientifiques dans le domaine de la recherche sur la leucémie ont contribué à l'élaboration d'un modèle de cellules souches cancéreuses (CSC). En effet, l'équipe de John E. Dick a mené la toute première étude qui a démontré qu'une sous-population très rare de cellules $CD34^+CD38^-$ purifiées parmi la masse tumorale constituait la seule population de cellules capable de transférer la leucémie aiguë myéloïde humaine (LAM) à des souris receveuses NOD/SCID (*Non-obese diabetic/Severe combined immunodeficiency*) [52, 53]. Par la suite, ces mêmes observations ont été notées dans de divers cas de tumeurs solides, ce qui a ainsi mené à l'hypothèse qu'un nombre limité de cellules cancéreuses sont réellement tumorigéniques et que celles-ci peuvent être considérées comme étant des cellules souches cancéreuses [3, 54].

Afin de mieux comprendre l'origine des CSCs, il est important d'avoir une compréhension approfondie de la biologie des cellules souches normales car les CSCs sont essentiellement des cellules souches dérégulées. Dans le contexte d'un tissu normal, il existe une hiérarchie développementale hautement régulée où les cellules souches produisent les cellules matures de ce tissu à travers des étapes séquentielles de prolifération et de différenciation contrôlées (**Figure 3**). Cependant, les cancers proviennent de cellules ayant acquis une série de mutations génétiques et/ou de changements épigénétiques perturbant la hiérarchie développementale au sein du tissu. Ainsi, au stade pré-cancéreux, il y a amplification clonale d'une cellule possédant une toute première mutation qui lui confère des capacités accrues d'auto-renouvellement, de prolifération et de survie. Ces cellules pré-cancéreuses ne démontrent pas de potentiel tumorigénique immédiat mais à travers le temps, elles peuvent progresser en cellules cancéreuses par l'acquisition de mutations additionnelles (**Figure 3**). Par conséquent, les CSCs représentent une petite sous-population de cellules phénotypiquement et biologiquement

uniques au sein de la masse tumorale car elles possèdent exclusivement la capacité de soutenir indéfiniment la croissance des cellules tumorales [55].

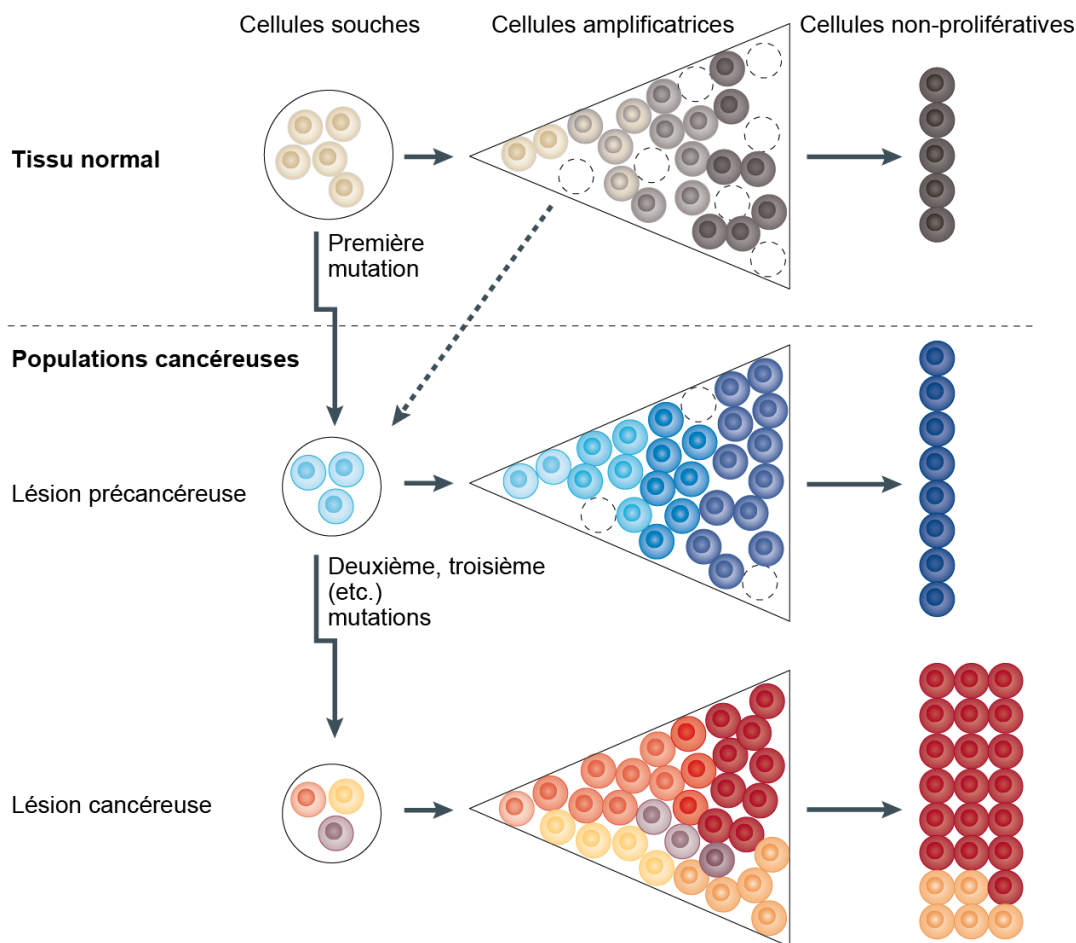


Figure 3. Le modèle de l'évolution des cellules souches cancéreuses. Dans un tissu normal, il existe une hiérarchie développementale hautement régulée où les cellules souches génèrent des cellules amplificatrices (représentées par les cercles pointillés) capables de se différencier pour produire les cellules matures du tissu, qui ne peuvent se diviser davantage (haut). L'évolution de la lésion pré-cancéreuse se produit par l'acquisition d'une première mutation ou d'un changement épigénétique (indiqué par le changement de couleurs) qui dérégule la production de ces cellules et mène à l'expansion clonale d'une des sous-populations (milieu). Si de nombreuses mutations additionnelles surviennent (indiquées par les couleurs différentes), il y a production d'un clone cancéreux ayant perdu toute caractéristique de différenciation normale (bas). Dans ce schéma, les cellules cancéreuses sont issues des cellules souches normales cependant, il existe des scénarios alternatifs dans lesquels les cellules cancéreuses proviennent du compartiment de cellules amplificatrices (indiqué par la flèche pointillée).

Traduit et adapté de Valent et al. (2012) *Nature Reviews Cancer* (12)11 : p.767-75.

D'un point de vue clinique, l'identification des cellules souches cancéreuses offre une explication possible pour l'échec des traitements chimiothérapeutiques. En effet, il a été démontré que les CSCs sont moins sensibles aux agents chimiothérapeutiques que le reste des cellules de la masse tumorale [56]. Plus récemment, cette même observation a été faite pour les cellules souches pré-cancéreuses ou pré-leucémiques (pré-LSC) qui sont épargnées par la chimiothérapie actuelle et donc majoritairement responsables des cas de rechute dans la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T) [57]. Par conséquent, de nombreux efforts sont mis de l'avant depuis quelques années afin de mieux caractériser les propriétés des CSCs avec l'objectif de les cibler plus spécifiquement lors de la chimiothérapie [55].

1.3.2 La reprogrammation oncogénique et l'auto-renouvellement

Les leucémies offrent la meilleure évidence que les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont les cibles de mutations favorisant leur transformation en cellules souches cancéreuses (CSC) capables de soutenir indéfiniment la leucémogénèse [3]. Selon le modèle des cellules souches cancéreuses détaillé précédemment, les propriétés des HSCs sont dérégulées par des aberrations génétiques et/ou épigénétiques [55]. En effet, les deux principales propriétés perturbées au sein des HSCs sont celles d'auto-renouvellement et de prolifération. Normalement, dans le contexte de l'hématopoïèse, la capacité d'auto-renouvellement est hautement régulée et restreinte au compartiment des HSCs (**Figure 4**) [3]. Par ailleurs, certaines voies de signalisation régulent de façon importante l'équilibre entre les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des HSCs. Il n'est donc pas étonnant que les CSCs exploitent ces voies de signalisation intrinsèques aux HSCs afin de promouvoir leur expansion et leur persistance au sein de l'organisme [58]. Ceci explique alors la forte probabilité que les cellules souches soient les cibles de choix pour la transformation tumorigénique (**Figure 4**).

Toutefois, de nouvelles études ont révélé que l'activation d'oncogènes au sein des cellules progénitrices peut également les transformer en cellules souches pré-cancéreuses ou cancéreuses [59]. Pour que ce soit possible, les oncogènes doivent absolument réactiver ou conférer *de novo* une capacité d'auto-renouvellement, qui est normalement absente dans ces progéniteurs (**Figure 4**). Ce processus, dénommé reprogrammation oncogénique, survient très fréquemment dans divers types de leucémies aiguës malgré le fait que les oncogènes impliqués

et les étapes de leucémogénèse sont différents [60-63]. Généralement, les oncogènes activent des gènes essentiels pour l’auto-renouvellement via la transcription ou la modification épigénétique [64]. Ainsi, la ré-acquisition de la capacité d’auto-renouvellement constitue l’étape critique menant à la reprogrammation oncogénique et à la leucémogénèse.

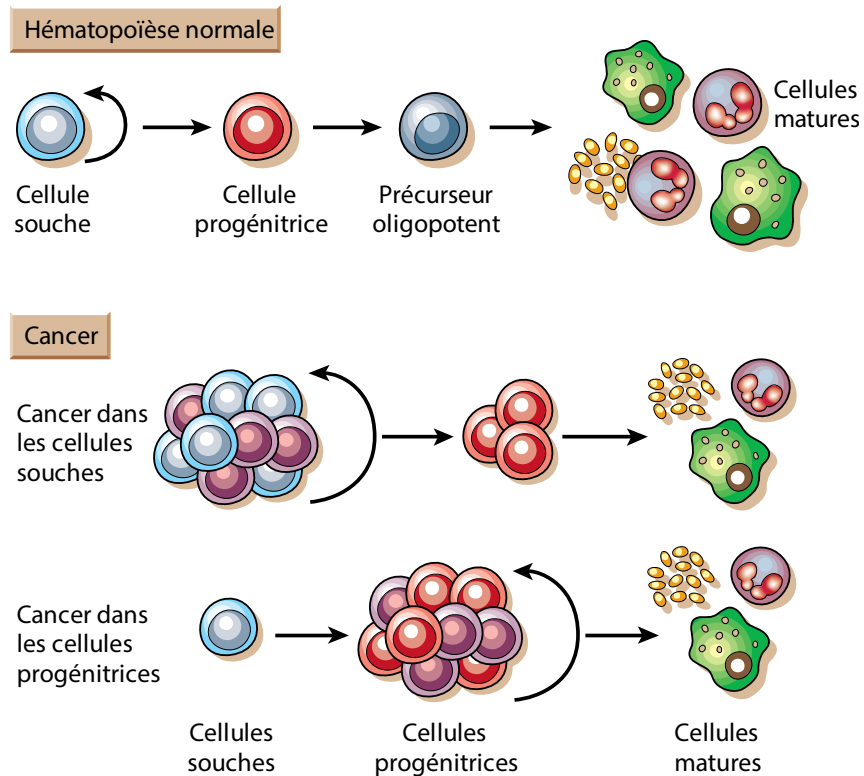


Figure 4. L’auto-renouvellement dans la reprogrammation oncogénique. Dans le contexte de l’hématopoïèse normale, la capacité d’auto-renouvellement est hautement régulée et restreinte au compartiment de cellules souches (haut). Dans le contexte du cancer, les cellules souches sont d’excellentes cibles pour la transformation oncogénique car elles possèdent déjà une capacité d’auto-renouvellement illimité qui est indispensable pour la leucémogénèse lorsqu’elle survient de façon incontrôlée (milieu). Si la transformation oncogénique cible les cellules progénitrices, il doit obligatoirement y avoir reprogrammation de ces cellules en cellules capables de s’auto-renouveler afin de mener à la leucémogénèse (bas).

Traduit et adapté de Reya et al. (2011) Nature (414)6859 : p. 105-11.

L’ensemble de ces résultats démontre clairement que les cellules pré-cancéreuses et cancéreuses sont à l’origine à la fois de la tumorigénèse et de la rechute, et qu’elles peuvent s’auto-renouveler de façon aberrante [3, 55]. Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes

moléculaires contribuant à l'auto-renouvellement et à la reprogrammation oncogénique est essentielle afin de développer des stratégies thérapeutiques ciblées contre les CSCs [58].

1.4 LA REPROGRAMMATION ONCOGÉNIQUE DANS LES LEUCÉMIES AIGÜES

1.4.1 La leucémie aiguë lymphoblastique de type T : SCL et LMO1

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est la forme de cancer la plus fréquente chez l'enfant (30%) [39]. À l'heure actuelle, la chimiothérapie combinatoire mène généralement à un taux de survie à long terme de plus de 85%, cependant environ 20% des enfants subissent des rechutes qui s'avèrent hautement mortelles, surtout si elles surviennent durant les 18 premiers mois de traitement [65]. D'autre part, le taux de survie chute à 68% à l'adolescence et il est encore plus faible chez l'adulte. À la lueur de ces statistiques, il est donc primordial de mieux élucider les altérations génomiques et les mécanismes moléculaires qui contribuent à la leucémogénèse.

La majorité des cas de leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T) pédiatrique sont causés par des réarrangements chromosomiques impliquant divers facteurs de transcription hématopoïétiques pouvant agir en tant qu'oncogènes. Parmi ceux-ci se retrouvent SCL/TAL1 (60%), TLX3/HOX11L2 (20%), LYL1 (10%), TLX1/HOX11 (5%) et MLL-ENL (2%) [66]. Alors que leur expression est normalement limitée durant le développement thymique (**Figure 5**), ces anomalies génomiques provoquent leur surexpression ectopique au sein des thymocytes. Par ailleurs, il a été découvert que plus de 60% des LAL-T possèdent des mutations activatrices dans le gène *NOTCH1*, un régulateur clé du destin des cellules T [67]. Par conséquent, cette expression aberrante de facteurs de transcription oncogéniques contribue de façon majeure à la leucémogénèse.

Tel que mentionné précédemment, SCL/TAL1 (*Stem cell leukemia/T-cell acute lymphocytic leukemia 1*), dorénavant appelé SCL, est un facteur de transcription appartenant à la famille bHLH (*Basic helix-loop-helix*) qui est anormalement exprimé dans 60% des cas de LAL-T [66]. Cet oncogène peut être activé par des réarrangements chromosomiques impliquant la séquence régulatrice du récepteur des cellules T (TCR) [48] ou par d'autres mécanismes, dont la présence de « super-enhancers » [68]. Cette surexpression ectopique de SCL au sein des précurseurs thymiques est souvent associée à la co-surexpression d'une protéine LMO (*LIM domain only*),

LMO1 ou LMO2 [66]. Tout comme SCL, LMO1/2 peut être exprimé anormalement en présence ou en absence de réarrangements chromosomiques [69]. Grâce à un modèle murin transgénique *SCL^{tg}LMO1^{tg}*, il a été démontré qu'il existe une coopérativité oncogénique entre ces deux facteurs de transcription. En effet, SCL et LMO1 collaborent au stade pré-leucémique (3-6 semaines après la naissance) pour causer l'expansion des précurseurs thymiques précoces ETP/DN1 (*Early thymic precursor/Double-negative 1*) suivie d'une expansion des thymocytes DN3/DN4. Or, le nombre de thymocytes double-positifs (DP) est diminué de plus de moitié indiquant que les oncogènes SCL-LMO1 inhibent partiellement la transition DN-DP [70]. Des études fonctionnelles approfondies ont révélé que la population de thymocytes DN3 augmentée au stade pré-leucémique est enrichie en cellules pouvant être transplantées de façon sériée. Plus particulièrement, les oncogènes SCL-LMO1 confèrent une capacité d'auto-renouvellement aberrante aux thymocytes DN3 en activant transcriptionnellement une signature génique « souche » qui inclue les gènes d'auto-renouvellement *Lyl1*, *Hhex* et *Nfe2* [63]. Ainsi, SCL et LMO1 reprogramment les thymocytes en cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC) capables d'initier la leucémie. D'autre part, le microenvironnement thymique contribue également à cette reprogrammation grâce au signal physiologique de NOTCH1, qui est maximal au stade DN3, et à l'expression de son effecteur MYC [63]. Cependant, une fois la reprogrammation établie, les pré-LSCs *SCL^{tg}LMO1^{tg}* deviennent indépendantes de ce microenvironnement car, tel que chez l'humain [67], plus de la moitié des souris *SCL^{tg}LMO1^{tg}* développent des mutations activatrices de *NOTCH1*. Ces mutations surviennent notamment au sein de ses domaines fonctionnels PEST (*Proline-, glutamic acid-, serine- and threonine-rich domain*) et HD (*Heterodimerization domain*) [70]. L'acquisition de ces mutations constitue alors l'évènement génétique majeur qui permet aux pré-LSCs d'évoluer en cellules propagatrices de leucémie (LPC), ce qui mène rapidement à la leucémogénèse. En effet, l'hyperactivation de NOTCH1 promeut l'expansion des pré-LSCs en leur conférant un avantage prolifératif et clonogénique, ce qui résulte en une expansion du nombre de thymocytes DN4 et ISP8 (*Immature single-positive CD8⁺*). Par conséquent, cette transformation par les oncogènes SCL, LMO1 et NOTCH1 fait progresser la leucémie d'un stade pré-leucémique à un stade leucémique en permettant aux thymocytes *SCL^{tg}LMO1^{tg}* de soutenir la leucémogénèse lorsque transplantés dans des souris receveuses [63, 70].

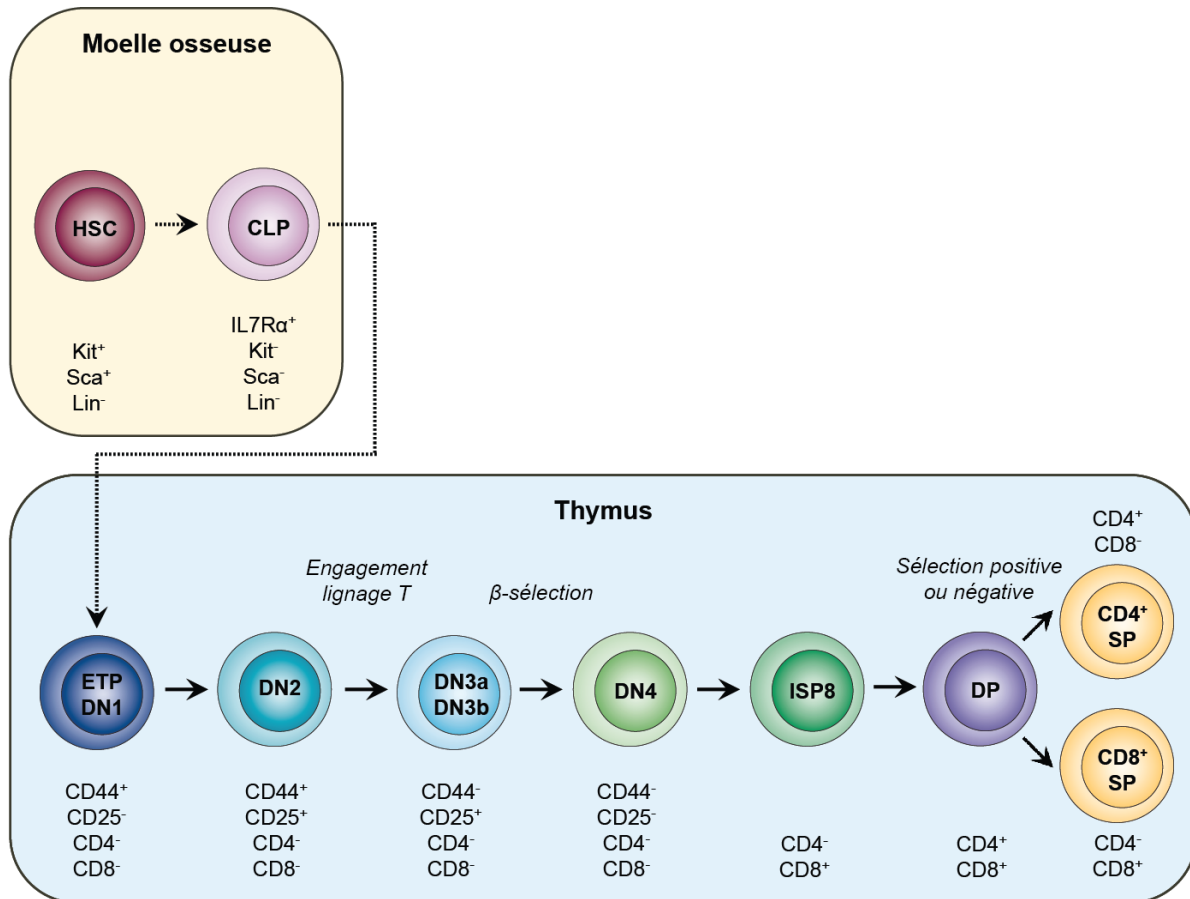


Figure 5. Le développement intra-thymique des cellules T. Ce processus débute au sein de la moelle osseuse où une cellule souche hématopoïétique (HSC) génère un progéniteur lymphoïde commun (CLP) via des étapes successives de différenciation (haut). Ce CLP migre vers le thymus pour ensuite y proliférer afin de produire des précurseurs thymiques précoces (ETP) qui progressent rapidement en thymocytes double-négatifs (DN). Ces thymocytes sont dits « double-négatifs » par l'absence des marqueurs de surface de cellules T matures ($CD4^+$ et $CD8^+$) et ils se distinguent en 4 sous-populations définies par l'expression des marqueurs CD25 et CD44, soit DN1 ($CD44^+CD25^-$), DN2 ($CD44^+CD25^+$), DN3 ($CD44^-CD25^+$) et DN4 ($CD44^-CD25^-$). Au stade DN2, les précurseurs thymiques s'engagent de façon définitive vers la lignée T et initient le réarrangement de leur *tcrβ*. Les thymocytes DN3a/b ayant réussi à produire un pré-TCR fonctionnel sont ensuite sélectionnés par le processus de β -sélection qui leur permet d'évoluer au stade DN4. À ce stade, les thymocytes acquièrent premièrement l'expression du marqueur de surface CD8 (ISP8) suivi de CD4, où les thymocytes sont dorénavant double-positifs (DP). Finalement, le processus de sélection positive ou négative détermine le type de cellule T simple-positif $CD4^+$ ou $CD8^+$ (SP) qui quittera le thymus.

Adapté de Fayard et al (2010) *Science Signaling* (3)135 : re5.

Malgré cette compréhension détaillée du processus de leucémogénèse, il n'y a toujours pas d'approche thérapeutique ciblée pour cette leucémie. En effet, les enfants atteints de ce type de

LAL-T doivent suivre une chimiothérapie combinatoire très agressive qui inclut l'asparaginase, la vincristine, la dexaméthasone et la doxorubicine, et qui peut durer de deux à trois ans afin d'établir une période de rémission [71]. Or, il est évident que ce type de traitement, qui survient généralement à un très jeune âge, possède de nombreux effets secondaires à long terme tels que des troubles cardiaques, respiratoires, osseux, de croissance, d'infertilité et d'apprentissage ainsi que des cancers secondaires [72]. D'autre part, le fait qu'environ 20% des enfants subissent des rechutes fréquemment mortelles révèle l'incapacité de la chimiothérapie actuelle d'éliminer toute présence de cellules leucémiques résiduelles. Récemment, il a été démontré que les pré-LSCs constituent un réservoir de cellules résistantes à la chimiothérapie actuelle [57] pouvant rétablir la leucémogénèse après une période de rémission [73]. Cette évidence souligne alors l'importance de mieux élucider les propriétés uniques et essentielles aux pré-LSCs afin de développer des approches thérapeutiques ciblées contre ces cellules, d'où l'objectif de ce projet de recherche de maîtrise portant sur les mécanismes d'auto-renouvellement et de reprogrammation oncogénique dans les leucémies aiguës.

1.4.2 La leucémie aiguë myéloïde : MLL-AF6

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent 35% de tous les cas de leucémies adultes et elles sont caractérisées par une expansion clonale de précurseurs myéloïdes non-différenciés [39]. Elles sont causées par une panoplie d'aberrations génétiques et chromosomiques qui ont récemment été sous-classifiées en 11 sous-groupes [74]. Malgré le fait que la chimiothérapie actuelle ait un taux de guérison de 35 à 40% chez les adultes âgés de moins de 60 ans, les patients de plus de 60 ans n'ont généralement qu'une médiane de survie de 5 à 10 mois due à la forte incidence d'effets secondaires néfastes [75]. Par conséquent, beaucoup d'efforts sont mis en place pour mieux comprendre l'hétérogénéité cytogénétique de la LAM dans le but de développer de nouvelles approches thérapeutiques moins chimiotoxiques et plus tolérables, notamment pour la population de patients plus âgés.

Plus particulièrement, il existe un type de LAM à faible valeur pronostique qui est associé à de nombreuses translocations chromosomiques impliquant le régulateur épigénétique MLL (*Mixed-lineage leukemia*) et plus de 70 partenaires protéiques nucléaires et cytoplasmiques [76]. De ces partenaires, AF4, AF9, ENL, AF10 et AF6 sont les plus fréquemment impliqués dans

ces leucémies (80%) [77]. Normalement, MLL est une histone méthyltransférase exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques. Elle promeut l'expression des gènes *HOX* qui sont essentiels pour le développement embryonnaire, l'hématopoïèse et la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me), une marque épigénétique activatrice de la transcription [78]. Or, les translocations chromosomiques fusionnent la région N-terminale de MLL aux régions C-terminales de ses partenaires protéiques, ce qui résulte en une protéine de fusion à potentiel oncogénique. D'autre part, il existe une région BCR (*Breakpoint cluster region*) de 8.3 kb au sein de MLL qui est à l'origine de la majorité de ces translocations chromosomiques. Plusieurs mécanismes moléculaires ont été proposés dans le but d'expliquer la récurrence des translocations MLL dans le BCR mais jusqu'à présent, aucun mécanisme à lui seul n'est applicable à toutes ces translocations [76].

Il est largement accepté que la leucémogénèse induite par les translocations de MLL avec des protéines ou facteurs de transcription nucléaires est médiée par l'activité transcriptionnelle de ses partenaires [79]. Cependant, il est fort improbable que des protéines cytoplasmiques puissent avoir de telles fonctions nucléaires [80]. Par exemple, la translocation chromosomique t(6;11)(q27;q23), ou MLL-AF6, est la plus fréquente des translocations MLL impliquant un partenaire de fusion normalement cytoplasmique [77]. En effet, la protéine AF6 (Afadin) ou MLLT4 (*Mixed-lineage leukemia translocated to 4*) est essentielle pour le maintien de l'intégrité structurale des jonctions cellulaires et pour le développement [81]. D'autant plus que sa perte d'expression promeut la migration et l'invasion cellulaire, la croissance tumorale et la métastase dans de nombreux cas de cancers du sein [82], du pancréas [83], de l'endomètre [84] et du colon [85]. D'ailleurs, dans le contexte de la leucémie MLL, un modèle d'étude postule que la perte de AF6 aux régions membranaires augmente la signalisation de RAS et promeut la croissance et la différenciation cellulaire contribuant à la transformation cellulaire [86]. Or, un autre modèle a démontré que la contribution oncogénique de AF6 provient de sa tendance naturelle à dimériser. En effet, seul le premier domaine d'association à RAS (RA1) au sein de la protéine AF6 est suffisant pour induire la dimérisation de MLL-AF6, ce qui provoque l'immortalisation de précurseurs myéloïdes *in vitro* et la leucémogénèse [87]. Tel que mentionné dans le chapitre précédent, il est déjà grandement accepté que l'étape d'acquisition d'auto-renouvellement constitue l'évènement critique menant à la reprogrammation oncogénique et au

développement de la leucémie, ce qui appuie fortement ce deuxième modèle. De plus, il y a de nombreuses évidences que d'autres partenaires cytoplasmiques de MLL, tels que AF1p, GAS7 [88] et GEPHYRIN [89], peuvent oligomériser et être impliqués dans l'activation oncogénique des protéines de fusion MLL. Jusqu'à présent, ces deux modèles contradictoires ont soulevés de nombreuses questions concernant la véritable capacité de AF6 à agir en tant qu'effecteur de RAS. De plus, il n'y a aucune évidence structurelle démontrant la réelle capacité de dimérisation de AF6. Ce projet de recherche tentera alors de résoudre les discordances entre ces deux modèles afin de mieux élucider le mécanisme de transformation oncogénique médié par la translocation chromosomique de MLL-AF6.

1.5 LE PROJET DE RECHERCHE

1.5.1 La problématique

Malgré que le processus de leucémogénèse diffère parmi les différents sous-types de leucémies aiguës, l'étape de reprogrammation oncogénique y demeure toujours essentielle. En effet, plusieurs oncogènes confèrent des capacités d'auto-renouvellement aberrantes aux progéniteurs hématopoïétiques, une propriété normalement restreinte aux cellules souches hématopoïétiques (HSC) [3]. Dans le contexte de la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T), les facteurs de transcription oncogéniques SCL et LMO1 activent une signature génique « souche » et reprogramment les thymocytes en cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC) capables de s'auto-renouveler [63, 70]. D'autre part, la protéine de fusion oncogénique MLL-AF6 impliquée dans la leucémie aiguë myéloïde (LAM) confère également une capacité d'auto-renouvellement aberrante aux progéniteurs myéloïdes par un mécanisme toujours contesté [86, 87]. Ainsi, ces cellules reprogrammées persistent davantage *in vivo* et sont responsables de l'initiation de la leucémie en plus de nombreux cas de rechutes [55]. Par conséquent, ces évidences soulignent l'importance de mieux élucider les mécanismes moléculaires contribuant à l'auto-renouvellement et à la reprogrammation oncogénique afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblées contre ces cellules reprogrammées.

1.5.2 L'hypothèse

Tel que mentionné, l'auto-renouvellement est essentiel aux étapes d'initiation, de propagation

et de rechute dans le contexte des leucémies aiguës [3, 55]. Ainsi, l'hypothèse principale de ce projet de recherche de maîtrise est que l'inhibition de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC) et leucémiques est suffisante pour perturber les processus de reprogrammation oncogénique et de leucémogénèse. Afin d'établir si cette inhibition s'avère une véritable stratégie thérapeutique, il est important d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires à la fois essentiels à l'auto-renouvellement et pouvant être ciblés de façon pharmacologique. Dans un premier temps, il a récemment été démontré que le taux de synthèse protéique module la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (HSC) [90, 91] et contribue également à l'émergence des pré-LSCs [92]. Nous postulons donc que les oncogènes SCL et LMO1 peuvent exploiter ce processus lors de l'activation du programme génique « souche » favorisant l'auto-renouvellement des thymocytes reprogrammés en pré-LSCs [63]. D'autre part, malgré l'absence d'évidences structurelles jusqu'à présent, nous proposons que la dimérisation, et non l'activation constitutive de RAS [86], est responsable de l'activité oncogénique de la protéine de fusion MLL-AF6 [87].

1.5.3 Les objectifs

L'objectif principal de ce projet de recherche de maîtrise est d'élucider davantage les mécanismes moléculaires contribuant à l'auto-renouvellement aberrant induit par les oncogènes SCL et LMO1 et la protéine de fusion MLL-AF6 impliqués dans la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T) et la leucémie aiguë myéloïde (LAM), respectivement, tout en envisageant la possibilité de cibler ces mécanismes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour ce faire, nous allons donc :

1. Évaluer la contribution du taux de synthèse protéique à l'auto-renouvellement des cellules souches pré-leucémiques reprogrammées par les oncogènes SCL et LMO1.
2. Caractériser le potentiel de dimérisation de la protéine de fusion oncogénique MLL-AF6 en identifiant les déterminants structuraux et biochimiques contribuant à l'auto-renouvellement des progéniteurs myéloïdes leucémiques.
3. Déterminer l'impact de l'inhibition de l'auto-renouvellement sur la reprogrammation oncogénique et la leucémogénèse en ciblant individuellement la synthèse protéique et la dimérisation pour chacun des deux modèles de leucémies aiguës.

1.6 RÉFÉRENCES

1. Dean, L. (2005). Chapter 1: Blood and the cells it contains, in *Blood groups and red cell antigens*, National Center for Biotechnology Information: United States (MD). p. 1-10. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/.
2. Orkin, S.H. (1995). Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol.* **7**(6): p. 870-7.
3. Reya, T., S.J. Morrison, M.F. Clarke, and I.L. Weissman (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* **414**(6859): p. 105-11.
4. Ng, Y.Y., M.R. Baert, E.F. de Haas, K. Pike-Overzet, and F.J. Staal (2009). Isolation of human and mouse hematopoietic stem cells. *Methods Mol Biol.* **506**: p. 13-21.
5. Morrison, S.J. and D.T. Scadden (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* **505**(7483): p. 327-34.
6. Seita, J. and I.L. Weissman (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* **2**(6): p. 640-53.
7. Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet.* **1**(1): p. 57-64.
8. Wang, L.D. and A.J. Wagers (2011). Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**(10): p. 643-55.
9. Hall, M.A., D.J. Curtis, D. Metcalf, A.G. Elefanty, K. Sourris, L. Robb, J.R. Gothert, S.M. Jane, and C.G. Begley (2003). The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(3): p. 992-7.
10. Lecuyer, E. and T. Hoang (2004). SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol.* **32**(1): p. 11-24.
11. Morrison, S.J. and J. Kimble (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* **441**(7097): p. 1068-74.
12. Rojas-Sutterlin, S. and T. Hoang (2013). Chapter 8: Hematopoietic stem cell quiescence and long term maintenance: Role of SCL/TAL1, in *Tumor dormancy and cellular quiescence: Vol. V.*, M.A. Hayat, Editor, Springer Science Company: Netherlands. p. 87-105.
13. Krause, D.S. (2002). Regulation of hematopoietic stem cell fate. *Oncogene.* **21**(21): p. 3262-9.
14. Reynaud, D., E. Ravet, M. Titeux, F. Mazurier, L. Renia, A. Dubart-Kupperschmitt, P.H. Romeo, and F. Pflumio (2005). SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. *Blood.* **106**(7): p. 2318-28.
15. Ramkumar, C., R.M. Gerstein, and H. Zhang (2013). Serial Transplantation of Bone Marrow to Test Self-renewal Capacity of Hematopoietic Stem Cells In Vivo, in *Stem Cells and Aging: Methods and Protocols*, K. Turksen, Editor, Humana Press: Totowa, NJ. p. 17-24.
16. Orford, K.W. and D.T. Scadden (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet.* **9**(2): p. 115-28.
17. Humphries, R.K., A.C. Eaves, and C.J. Eaves (1981). Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**(6): p. 3629-33.

18. Cheshier, S.H., S.J. Morrison, X. Liao, and I.L. Weissman (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**(6): p. 3120-5.
19. Matsumoto, A. and K.I. Nakayama (2013). Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochim Biophys Acta*. **1830**(2): p. 2335-44.
20. Li, J. (2011). Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. *Exp Hematol*. **39**(5): p. 511-20.
21. Viatour, P. (2012). Bridges between Cell Cycle Regulation and Self-Renewal Maintenance. *Genes Cancer*. **3**(11-12): p. 670-7.
22. Lacombe, J., S. Herblot, S. Rojas-Sutterlin, A. Haman, S. Barakat, N.N. Iscove, G. Sauvageau, and T. Hoang (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood*. **115**(4): p. 792-803.
23. Cheng, T., N. Rodrigues, H. Shen, Y. Yang, D. Dombkowski, M. Sykes, and D.T. Scadden (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21^{cip1}/waf1. *Science*. **287**(5459): p. 1804-8.
24. Jankovic, V., A. Ciarrocchi, P. Boccuni, T. DeBlasio, R. Benezra, and S.D. Nimer (2007). Id1 restrains myeloid commitment, maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**(4): p. 1260-5.
25. Lecuyer, E., S. Herblot, M. Saint-Denis, R. Martin, C.G. Begley, C. Porcher, S.H. Orkin, and T. Hoang (2002). The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood*. **100**(7): p. 2430-40.
26. Thoren, L.A., K. Liuba, D. Bryder, J.M. Nygren, C.T. Jensen, H. Qian, J. Antonchuk, and S.E. Jacobsen (2008). Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol*. **180**(4): p. 2045-53.
27. Kim, K.H. and J.M. Sederstrom (2015). Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Curr Protoc Mol Biol*. **111**: p. 28 6 1-11.
28. Lyons, A.B. and C.R. Parish (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*. **171**(1): p. 131-7.
29. Wilson, A., E. Laurenti, G. Oser, R.C. van der Wath, W. Blanco-Bose, M. Jaworski, S. Offner, C.F. Dunant, L. Eshkind, E. Bockamp, P. Lio, H.R. Macdonald, and A. Trumpp (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. **135**(6): p. 1118-29.
30. Trumpp, A., M. Essers, and A. Wilson (2010). Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. **10**(3): p. 201-9.
31. Till, J.E. and C.E. Mc (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. **14**: p. 213-22.
32. Bryder, D., D.J. Rossi, and I.L. Weissman (2006). Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*. **169**(2): p. 338-46.
33. Carral, A., J. de la Rubia, G. Martin, J. Martinez, G. Sanz, I. Jarque, A. Sempere, M.A. Soler, M.L. Marty, and M.A. Sanz (2002). Factors influencing hematopoietic recovery after autologous blood stem cell transplantation in patients with acute myeloblastic leukemia and with non-myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplant*. **29**(10): p. 825-32.
34. Arber, C., A. BitMansour, T.E. Sparer, J.P. Higgins, E.S. Mocarski, I.L. Weissman, J.A. Shizuru, and J.M. Brown (2003). Common lymphoid progenitors rapidly engraft

- and protect against lethal murine cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. **102**(2): p. 421-8.
35. BitMansour, A., S.M. Burns, D. Traver, K. Akashi, C.H. Contag, I.L. Weissman, and J.M. Brown (2002). Myeloid progenitors protect against invasive aspergillosis and *Pseudomonas aeruginosa* infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. **100**(13): p. 4660-7.
 36. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. **91**(5): p. 661-72.
 37. 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): p. 193-7.
 38. Kaushansky, K. (2008). Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*. **111**(3): p. 981-6.
 39. American Cancer Society (2017). *Cancer facts & figures 2017*. Available from: www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html.
 40. Bozzone, D.M. (2009). Chapter 1: What is leukemia?, in *The biology of cancer: Leukemia*, Chelsea House Infobase Publishing: United States (NY). p. 11-22.
 41. Roman, E. and A.G. Smith (2014). Chapter 1: Epidemiology, in *Lymphoma: Pathology, Diagnosis, and Treatment*, R. Marcus, J.W. Sweetenham, and M.E. Williams, Editors, Cambridge University Press: United Kingdom. p. 1-10.
 42. Fonseca, R., P.L. Bergsagel, J. Drach, J. Shaughnessy, N. Gutierrez, A.K. Stewart, G. Morgan, B. Van Ness, M. Chesi, S. Minvielle, A. Neri, B. Barlogie, W.M. Kuehl, P. Liebisch, F. Davies, S. Chen-Kiang, B.G. Durie, R. Carrasco, O. Sezer, T. Reiman, L. Pilarski, H. Avet-Loiseau, and G. International Myeloma Working (2009). International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. **23**(12): p. 2210-21.
 43. Wan, T.S. (2014). Cancer cytogenetics: methodology revisited. *Ann Lab Med*. **34**(6): p. 413-25.
 44. Staudt, L.M. (2003). Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N Engl J Med*. **348**(18): p. 1777-85.
 45. Boxer, L.M. (1994). The role of oncogenes in hematologic malignancies. *Annu Rev Med*. **45**: p. 1-11.
 46. Krug, U., A. Ganser, and H.P. Koeffler (2002). Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*. **21**(21): p. 3475-95.
 47. Osato, M. (2004). Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene*. **23**(24): p. 4284-96.
 48. Larmonie, N.S., W.A. Dik, J.P. Meijerink, I. Homminga, J.J. van Dongen, and A.W. Langerak (2013). Breakpoint sites disclose the role of the V(D)J recombination machinery in the formation of T-cell receptor (TCR) and non-TCR associated aberrations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. **98**(8): p. 1173-84.
 49. Salesse, S. and C.M. Verfaillie (2002). BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. **21**(56): p. 8547-59.

50. Lin, C.Y., J. Loven, P.B. Rahl, R.M. Paranal, C.B. Burge, J.E. Bradner, T.I. Lee, and R.A. Young (2012). Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*. **151**(1): p. 56-67.
51. Zhan, F., Y. Huang, S. Colla, J.P. Stewart, I. Hanamura, S. Gupta, J. Epstein, S. Yaccoby, J. Sawyer, B. Burington, E. Anaissie, K. Hollmig, M. Pineda-Roman, G. Tricot, F. van Rhee, R. Walker, M. Zangari, J. Crowley, B. Barlogie, and J.D. Shaughnessy, Jr. (2006). The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. **108**(6): p. 2020-8.
52. 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): p. 645-8.
53. Bonnet, D. and J.E. Dick (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. **3**(7): p. 730-7.
54. O'Brien, C.A., A. Kreso, and C.H. Jamieson (2010). Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res*. **16**(12): p. 3113-20.
55. Valent, P., D. Bonnet, R. De Maria, T. Lapidot, M. Copland, J.V. Melo, C. Chomienne, F. Ishikawa, J.J. Schuringa, G. Stassi, B. Huntly, H. Herrmann, J. Soulier, A. Roesch, G.J. Schuurhuis, S. Wohrer, M. Arock, J. Zuber, S. Cerny-Reiterer, H.E. Johnsen, M. Andreeff, and C. Eaves (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. **12**(11): p. 767-75.
56. Maugeri-Sacca, M., P. Vigneri, and R. De Maria (2011). Cancer stem cells and chemosensitivity. *Clin Cancer Res*. **17**(15): p. 4942-7.
57. Gerby, B., D.F. Veiga, J. Kros, S. Nourredine, J. Ouellette, A. Haman, G. Lavoie, I. Fares, M. Tremblay, V. Litalien, E. Ottoni, M. Kosic, D. Geoffrion, J. Ryan, P.S. Maddox, J. Chagraoui, A. Marinier, J. Hebert, G. Sauvageau, B.H. Kwok, P.P. Roux, and T. Hoang (2016). High-throughput screening in niche-based assay identifies compounds to target preleukemic stem cells. *J Clin Invest*. **126**(12): p. 4569-4584.
58. Borah, A., S. Raveendran, A. Rochani, T. Maekawa, and D.S. Kumar (2015). Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis*. **4**: p. e177.
59. Passegue, E., C.H. Jamieson, L.E. Ailles, and I.L. Weissman (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100 Suppl 1**: p. 11842-9.
60. Cozzio, A., E. Passegue, P.M. Ayton, H. Karsunky, M.L. Cleary, and I.L. Weissman (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev*. **17**(24): p. 3029-35.
61. Jamieson, C.H., L.E. Ailles, S.J. Dylla, M. Muijtjens, C. Jones, J.L. Zehnder, J. Gotlib, K. Li, M.G. Manz, A. Keating, C.L. Sawyers, and I.L. Weissman (2004). Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*. **351**(7): p. 657-67.
62. Krivtsov, A.V., D. Twomey, Z. Feng, M.C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J.E. Levine, J. Wang, W.C. Hahn, D.G. Gilliland, T.R. Golub, and S.A. Armstrong (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. **442**(7104): p. 818-22.

63. Gerby, B., C.S. Tremblay, M. Tremblay, S. Rojas-Sutterlin, S. Herblot, J. Hebert, G. Sauvageau, S. Lemieux, E. Lecuyer, D.F. Veiga, and T. Hoang (2014). SCL, LMO1 and Notch1 Reprogram Thymocytes into Self-Renewing Cells. *PLoS Genet.* **10**(12): p. e1004768.
64. Kreso, A. and J.E. Dick (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* **14**(3): p. 275-91.
65. Mullighan, C.G. (2013). Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* **50**(4): p. 314-24.
66. Ferrando, A.A. and A.T. Look (2003). Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* **40**(4): p. 274-80.
67. Weng, A.P., A.A. Ferrando, W. Lee, J.P.t. Morris, L.B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S.C. Blacklow, A.T. Look, and J.C. Aster (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* **306**(5694): p. 269-71.
68. Mansour, M.R., B.J. Abraham, L. Anders, A. Berezovskaya, A. Gutierrez, A.D. Durbin, J. Etchin, L. Lawton, S.E. Sallan, L.B. Silverman, M.L. Loh, S.P. Hunger, T. Sanda, R.A. Young, and A.T. Look (2014). Oncogene regulation. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science.* **346**(6215): p. 1373-7.
69. Hoang, T. (2010). Of mice and men: how an oncogene transgresses the limits and predisposes to T cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* **2**(21): p. 21ps10.
70. Tremblay, M., C.S. Tremblay, S. Herblot, P.D. Aplan, J. Hebert, C. Perreault, and T. Hoang (2010). Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes Dev.* **24**(11): p. 1093-105.
71. Cooper, S.L. and P.A. Brown (2015). Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am.* **62**(1): p. 61-73.
72. Fulbright, J.M., S. Raman, W.S. McClellan, and K.J. August (2011). Late effects of childhood leukemia therapy. *Curr Hematol Malig Rep.* **6**(3): p. 195-205.
73. Corces-Zimmerman, M.R. and R. Majeti (2014). Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia.* **28**(12): p. 2276-82.
74. Papaemmanuil, E., M. Gerstung, L. Bullinger, V.I. Gaidzik, P. Paschka, N.D. Roberts, N.E. Potter, M. Heuser, F. Thol, N. Bolli, G. Gundem, P. Van Loo, I. Martincorena, P. Ganly, L. Mudie, S. McLaren, S. O'Meara, K. Raine, D.R. Jones, J.W. Teague, A.P. Butler, M.F. Greaves, A. Ganser, K. Dohner, R.F. Schlenk, H. Dohner, and P.J. Campbell (2016). Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* **374**(23): p. 2209-21.
75. Dohner, H., D.J. Weisdorf, and C.D. Bloomfield (2015). Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* **373**(12): p. 1136-52.
76. Aplan, P.D. (2006). Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms. *DNA Repair (Amst).* **5**(9-10): p. 1265-72.
77. Krivtsov, A.V. and S.A. Armstrong (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer.* **7**(11): p. 823-33.
78. Hess, J.L. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med.* **10**(10): p. 500-7.

79. Zeisig, B.B., S. Schreiner, M.P. Garcia-Cuellar, and R.K. Slany (2003). Transcriptional activation is a key function encoded by MLL fusion partners. *Leukemia*. **17**(2): p. 359-65.
80. Dimartino, J.F. and M.L. Cleary (1999). Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol*. **106**(3): p. 614-26.
81. Mandai, K., Y. Rikitake, Y. Shimono, and Y. Takai (2013). Afadin/AF-6 and canoe: roles in cell adhesion and beyond. *Prog Mol Biol Transl Sci*. **116**: p. 433-54.
82. Fournier, G., O. Cabaud, E. Josselin, A. Chaix, J. Adelaide, D. Isnardon, A. Restouin, R. Castellano, P. Dubreuil, M. Chaffanet, D. Birnbaum, and M. Lopez (2011). Loss of AF6/afadin, a marker of poor outcome in breast cancer, induces cell migration, invasiveness and tumor growth. *Oncogene*. **30**(36): p. 3862-74.
83. Xu, Y., R. Chang, Z. Peng, Y. Wang, W. Ji, J. Guo, L. Song, C. Dai, W. Wei, Y. Wu, X. Wan, C. Shao, and L. Zhan (2015). Loss of polarity protein AF6 promotes pancreatic cancer metastasis by inducing Snail expression. *Nat Commun*. **6**: p. 7184.
84. Yamamoto, T., T. Mori, M. Sawada, H. Matsushima, F. Ito, M. Akiyama, and J. Kitawaki (2015). Loss of AF-6/afadin induces cell invasion, suppresses the formation of glandular structures and might be a predictive marker of resistance to chemotherapy in endometrial cancer. *BMC Cancer*. **15**: p. 275.
85. Sun, T.T., Y. Wang, H. Cheng, H.Z. Xiao, J.J. Xiang, J.T. Zhang, S.B. Yu, T.A. Martin, L. Ye, L.L. Tsang, W.G. Jiang, J. Xiaohua, and H.C. Chan (2014). Disrupted interaction between CFTR and AF-6/afadin aggravates malignant phenotypes of colon cancer. *Biochim Biophys Acta*. **1843**(3): p. 618-28.
86. Manara, E., E. Baron, C. Tregnago, S. Aveic, V. Bisio, S. Bresolin, R. Masetti, F. Locatelli, G. Basso, and M. Pigazzi (2014). MLL-AF6 fusion oncogene sequesters AF6 into the nucleus to trigger RAS activation in myeloid leukemia. *Blood*. **124**(2): p. 263-72.
87. Liedtke, M., P.M. Ayton, T.C. Somervaille, K.S. Smith, and M.L. Cleary (2010). Self-association mediated by the Ras association 1 domain of AF6 activates the oncogenic potential of MLL-AF6. *Blood*. **116**(1): p. 63-70.
88. So, C.W., M. Lin, P.M. Ayton, E.H. Chen, and M.L. Cleary (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell*. **4**(2): p. 99-110.
89. Eguchi, M., M. Eguchi-Ishimae, and M. Greaves (2004). The small oligomerization domain of gephyrin converts MLL to an oncogene. *Blood*. **103**(10): p. 3876-82.
90. Signer, R.A., J.A. Magee, A. Salic, and S.J. Morrison (2014). Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature*. **509**(7498): p. 49-54.
91. Sanchez, C.G., F.K. Teixeira, B. Czech, J.B. Preall, A.L. Zamparini, J.R. Seifert, C.D. Malone, G.J. Hannon, and R. Lehmann (2016). Regulation of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Controls Germline Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell*. **18**(2): p. 276-90.
92. Cai, X., L. Gao, L. Teng, J. Ge, Z.M. Oo, A.R. Kumar, D.G. Gilliland, P.J. Mason, K. Tan, and N.A. Speck (2015). Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell*. **17**(2): p. 165-77.

CHAPITRE 2: BIOGÉNÈSE DES RIBOSOMES ET SYNTHÈSE PROTÉIQUE

SCL controls ribosomal gene expression and protein synthesis in normal hematopoietic and pre-leukemic stem cells

Elizabeth Ottoni^{1,2}, Shanti Rojas-Sutterlin^{1,a}, Mathieu Tremblay^{1,b}, Maxime Parisotto¹, Bastien Gerby^{1,c}, Diogo FT Veiga^{1,d}, Véronique Litalien¹, André Haman¹ and Trang Hoang^{1,3,*}

¹ Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

² Molecular Biology Program, Faculty of Medicine, Université de Montréal

³ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal

* Corresponding author

Trang Hoang, Ph.D

Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC)

Department of Pharmacology, Université de Montréal

2950 Chemin de Polytechnique, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

Pavillon Marcelle-Coutu, Room 1480; Tel: (514) 343-6970

email: trang.hoang@umontreal.ca

Current address:

^a École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Switzerland

^b McGill Cancer Center, Montreal, Quebec, Canada

^c INSERM U1037, Team 16, Cancer Research Center of Toulouse, France

^d Jackson Laboratory for Genomic Medicine, Farmington, Connecticut, USA

Running Title: *SCL controls protein synthesis*

In preparation for submission

2.1 AUTHOR CONTRIBUTION

EO conceived and designed the SCL-LMO1 pre-leukemic and leukemic portions of the project and SRS conceived and designed the HSC portion of the project. EO and SRS performed the experiments and analyzed the data. EO wrote the manuscript with contributions from SRS and TH. MT, MP and BG performed experiments. DTFV analyzed bioinformatics data. VL and AH supplied technical support. TH supervised the project, the experimental design and the writing of the manuscript.

2.2 ABSTRACT

The SCL transcription factor plays a critical role in normal hematopoietic stem cells (HSCs) and, together with the LMO1 oncogene, in reprogramming normal thymocytes into pre-leukemic stem cells (pre-LSCs) that drive T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) development. Here, we identify a novel role of SCL in down-regulating ribosome biogenesis and protein synthesis in these two self-renewing populations. This is associated with decreased cell size and proliferation and sustained self-renewal activity during 5-fluorouracil (5-FU)-induced proliferative stress in normal HSCs and, in conjunction with LMO1, during leukemia initiation. Subsequently, leukemia progression is associated with the up-regulation of both ribosome biogenesis and protein synthesis in SCL-LMO1 leukemic thymocytes, thus increasing cell proliferation and differentiation. Lastly, pharmacological treatment of SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes revealed their sensitivity to 2-ME2 and PI-103, as these inhibitors potentiate a further deleterious decrease in cell size and protein levels. Taken together, this study highlights the previously uncharacterized and critical role of SCL-regulated ribosome biogenesis and protein synthesis in both normal and pre-leukemic stem cells.

2.3 INTRODUCTION

Cancers arise from the dysregulation of normal cell functions that notably include changes in gene expression, cell metabolism, proliferation and differentiation [1]. In the case of Acute lymphoblastic leukemia (ALL), which is the most frequent form of pediatric cancer [2], these changes are imparted by the ectopic activation and/or expression of hematopoietic transcription factor oncogenes [3]. Indeed, the SCL and LMO1 oncogenes, which are expressed in 60% of

T-cell leukemias (T-ALL) [4], have been shown to reprogram DN3 thymocytes into pre-leukemic stem cells (pre-LSCs) that are capable of self-renewal [5, 6]. As these pre-LSCs are spared by current chemotherapies [7] and drive leukemia relapse [8], elucidation of the molecular mechanisms that promote pre-LSC function and chemoresistance is of utmost importance [9].

The SCL hematopoietic transcription factor belongs to the bHLH family and its transcriptional activity depends on the nucleation of a multimeric complex involving LIM domain only (LMO1/2) and E2A proteins [10]. SCL is highly expressed in normal HSCs where it regulates self-renewal, quiescence and long-term competence [11]. However, chromosomal translocations frequently place *SCL* and *LMO1* under the regulation of the *Tcr* gene locus thus resulting in their ectopic expression in thymocytes [12]. While oncogenic reprogramming of DN3 thymocytes into self-renewing pre-LSCs is a necessary initiating event [6], this is not sufficient for progression to overt T-ALL. Indeed, gain-of-function *NOTCH1* mutations, which occur in more than 60% of T-ALL cases [13], are required for leukemia progression whereby they transform pre-LSCs into leukemia-propagating cells (LPCs) [5], which are efficiently eradicated by chemotherapy [6, 7]. In contrast, pre-LSCs are less chemosensitive than LPCs [7]. The challenge is therefore to develop new therapeutic approaches to target the pre-LSC population responsible for relapse [8]. Thus, new insights into pre-LSC biology and activity would significantly contribute to this endeavour.

An understanding of the mechanism that control HSC self-renewal activity may shed new light on pre-LSCs. Recently, HSC functions were found to require a highly regulated protein synthesis rate in order to maintain proper HSC function, namely donor cell reconstitution [14]. Interestingly, ribosomal protein (RP) gene mutations in *RPL5* and *RPL10* [15], *RPL11* [16] and *RPL22* [17] are found in roughly 10% of children with T-ALL. Moreover, several other cancer types [18] have been associated with RP gene mutations, including inherited bone marrow failure syndromes known as ribosomopathies [19]. Further evidence linking ribosome biogenesis to hematological malignancies was recently shown in the case of patients with loss-of-function *RUNX1* mutations [20]. Indeed, decreased ribosome biogenesis was shown to confer stress resistance to hematopoietic stem and progenitor cells thus providing these pre-LSCs with

a selective advantage over normal hematopoietic cells [21]. In addition to its role in tumorigenesis, decreased ribosome and protein biogenesis was shown to be essential for the maintenance of self-renewal potential in *Drosophila* germline stem cells, whereas an increase in biogenesis favored differentiation [22]. Furthermore, regulators of ribosome biogenesis and translation, such as the S6 kinase 1 (S6K1), have also been implicated in HSC self-renewal and leukemia maintenance in an MLL-AF9 model [23]. Taken together, these new findings have begun to highlight the importance of ribosomal and translational control in both normal and malignant hematopoiesis [24], and these processes could also present interesting targets for cancer therapy [25].

In the present study, we identify a novel role of the SCL hematopoietic transcription factor in regulating ribosomal gene expression and protein synthesis in normal HSCs during stress response to 5-FU treatment, in SCL-LMO1 reprogrammed pre-leukemic thymocytes and in leukemia-propagating cells.

2.4 RESULTS

2.4.1 SCL regulates ribosome and protein synthesis in normal HSCs

Various methodological approaches have converged on identifying hematopoietic stem cells as small cells with low buoyant density [26-28], small diameters and low forward light scattering properties [29]. Moreover, these small cells harbor a distinctively low rate of protein synthesis, which is required to maintain both HSC reconstitution activity and self-renewal capacities [14, 22]. Since we previously showed that the SCL transcription factor is a critical regulator of normal hematopoietic stem cell function, specifically after a proliferative stress induced by limiting dilution or long-term transplantations [11], we directly addressed the question of whether *Scf* gene dosage may control cell size and protein synthesis in stress response.

HSC proliferative stress was provoked by two intraperitoneal administrations of the alkylating agent 5-fluorouracil (5-FU) in C57BL/6J wild type (WT; CD45.2⁺) and *Scf*^{+/-} (CD45.2⁺) mice at a one-week interval period (**Figure 1A**). Ten days after the initial 5-FU treatment, mice were transplanted with a life-sparing dose of compromised bone marrow progenitor and hematopoietic support cells (SC; 10⁵ cells) from syngeneic Pep3^b CD45.1⁺ mice [30]. At day

30, a portion of the 5-FU-treated mice were sacrificed and bone marrow cells were harvested to assess cell size using the forward scatter (FSC) parameter in flow cytometry (FACS). This analysis confirmed that long-term HSCs (Lin⁻Sca⁺CD150⁺CD48⁻) were significantly smaller than the more mature Lin⁻Sca⁻ (LIN⁻) progenitor cells (**Figure 1B**). The c-Kit surface marker could not be used to distinguish these HSC populations because its expression is decreased after 5-FU treatment [31]. Interestingly, monoallelic loss of *Scl* (*SCL*^{+/-}) did not alter LIN⁻ FSC distribution however, it caused a two-fold cell size increase in the long-term HSC population, where SCL activity is the most critical [11]. As protein synthesis is a critical determinant of cell size [32], we next assessed *in vivo* relative protein synthesis rates in the different HSC and progenitor populations by administering an alkyne analog of puromycin (O-propargyl-puromycin; OP-Puro) [33] to 5-FU-treated WT and *SCL*^{+/-} mice, as previously described [14]. OP-Puro incorporation into nascent polypeptide chains was then detected by azide-alkyne cycloaddition reaction [33] and quantified by flow cytometry. Consistent with previous studies [14], wild type HSCs showed significantly lower protein synthesis rates compared to LIN⁻ cells (**Figure 1C**). Strikingly, protein synthesis in long-term HSCs was two-fold increased upon monoallelic loss of *Scl* (*Scl*^{+/-}). RNA-sequencing (RNA-seq) of this HSC population revealed that approximately 80% of ribosomal protein genes exhibited ≥ 1.3 -fold change in *Scl*^{+/-} compared to WT HSCs (**Figure 1D**). Indeed, all identified ribosomal protein genes were globally up-regulated in *Scl*^{+/-} HSCs whereas the remaining genes showed neither enrichment for up- or down-regulation (**Figure 1E**). Interestingly, 63% of the up-regulated ribosomal protein genes harboured SCL peaks in the vicinity of the transcription start site (grey boxes; **Figure 1D**) according to available ChIP-seq datasets for the murine hematopoietic progenitor cell line (HPC7; NCBI accession # GSE22178). SCL promoter binding of these genes was further validated by chromatin immunoprecipitation using the same cell line (**Figure 1F**). Interestingly, we also observed enriched SCL binding at the promoters of translation initiation factors (*Eif2b1* to *Eif4e*) and elongation (*Eef1b2*), polysome formation (*Srp14*) and ribosomal RNA (rRNA) processing (*Ncl* and *Rn45s*) indicating that SCL might also play an integral role in transcriptionally regulating genes involved in more global ribosomal and translation control (**Figure S1A**). Taken together, these results identify a novel role of the SCL hematopoietic transcription factor in down-regulating ribosome and protein biogenesis, associated with the functional maintenance of normal HSCs in response to 5-FU-induced proliferative stress.

2.4.2 SCL-LMO1 oncogenes decrease cell size and protein synthesis in pre-leukemic thymocytes

Increased endogenous and genotoxic stress resistance is a hallmark of pre-leukemic stem cells (pre-LSCs) as this confers them with a competitive advantage over normal hematopoietic stem and progenitor cells [20]. As SCL is frequently overexpressed in pediatric T-ALL [4] and the SCL-LMO1 oncogenes reprogram normal DN3 thymocytes into self-renewing pre-LSCs [6], we asked the question of whether SCL might also down-regulate ribosome and protein synthesis in this pre-leukemic target cell population.

We first assessed steady-state thymocyte cell size in mice separately overexpressing SCL or LMO1 on the basis of their forward light scattering properties (**Figure 2A**). Interestingly, we observed that overexpression of SCL alone did not generally decrease cell size in any of the double-negative (DN1-DN4), ISP8 or double-positive (DP) thymocyte populations (**Figure 2B**). Also, although cell size appeared to be significantly decreased in DN1 LMO1 thymocytes, this represented only a 4% decrease in cell size and it was not consistently observed in the other assessed populations. More importantly, cell size analysis of total thymocytes from 5-week-old pre-leukemic (pre-LK) SCL-LMO1 overexpressing mice revealed a generally smaller forward scatter when compared to age-matched WT mice (**Figure 2C**). This represented a significant 8 to 10% decrease in cell size in DN1, DN3 and DN4 thymocytes, but not in ISP8 or DP thymocytes (**Figure 2D** and **S2A**, full scale). Next, we performed *in vitro* OP-Puro assays on CD4⁺CD8⁺ immunodepleted SCL-LMO1 pre-leukemic and WT thymocytes maintained in coculture with MS5 stromal cells expressing the NOTCH1 Delta-like 4 ligand (DL4; MS5-DL4) [7]. Consistent with the decrease in cell size, SCL-LMO1 pre-LK total thymocytes generally incorporated less OP-Puro than their WT counterparts (**Figure 2E**). Indeed, protein synthesis rates were decreased between 5 to 15% in the target DN3 SCL-LMO1 pre-LSCs and the downstream DN4 thymocyte population (**Figure 2F**), but not in the ISP8 or DP thymocytes. Intriguingly, SCL-LMO1 DN1 thymocytes had a near 5-fold increase in relative protein synthesis despite their smaller cell size. In light of these results, the SCL-LMO1 oncogenes generally tend to down-regulate both cell size and protein synthesis rates in pre-leukemic thymocytes.

2.4.3 Decreased protein synthesis in SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes correlates with decreased ribosomal gene expression and limited proliferation

Just as in normal HSCs, we demonstrated that SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes have decreased cell size and protein synthesis rates. To verify whether this was also associated with down-regulated ribosomal protein genes, we analyzed microarray data obtained from thymocytes harvested from *Cd3*^{-/-} wild type (WT) and SCL-LMO1 pre-leukemic mice (pre-LK) at 5 weeks of age (**Figure 3A**), in which all thymocytes are arrested at the DN3 stage due to a non-functional pre-TCR/TCR [34]. Importantly, the frequency of SCL-LMO1-induced pre-LSCs is not altered by *Cd3* deficiency [6]. This analysis revealed a 30% reduction in expression for several ribosomal protein genes from *Cd3*^{-/-} SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes (**Figure 3B**). This represented a significant global down-regulation of ribosomal protein gene expression (**Figure 3C**) consistent with the previously observed decrease in cell size and protein synthesis rates in SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes (**Figure 2C-F**). Furthermore, as ribosome biogenesis has been tightly associated with cell growth and cell proliferation control [35, 36], we assessed cell proliferation using a CFSE cell division tracking assay performed on purified SCL-LMO1 DN3 thymocytes (**Figure 2A**). As expected, we observed that SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes underwent significantly fewer cell divisions as opposed to their WT DN3 counterparts (**Figure 3D**). Taken together, our results show that the SCL-LMO1 oncogenes decrease cell size and protein synthesis in pre-leukemic thymocytes by down-regulating ribosomal gene expression, thus limiting cell proliferation.

2.4.4 SCL-LMO1 leukemic thymocytes acquire increased protein synthesis, ribosomal gene expression and proliferation rates

Transcriptome analysis of SCL-LMO1 pre-leukemic and leukemic thymocytes indicate a significant and global increase in the expression of ribosomal protein genes with progression to T-ALL (**Figure 4F**). We therefore evaluated cell size in wild type (WT) and SCL-LMO1 leukemic (LK) thymocytes using FSC analysis (**Figure 4A**). By this criteria, total transformed LK thymocytes were larger than their age-matched WT thymocytes (**Figure 4B**). Indeed, nearly all SCL-LMO1 LK thymocyte populations had significantly increased cell sizes compared to WT and SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes (**Figure 4C** and **S2B-C**, full scale). Correlating

with their larger size, SCL-LMO1 LK total thymocytes incorporated much more OP-Puro than WT thymocytes (**Figure 4D**), exhibiting significantly increased protein synthesis rates across all thymocyte populations (**Figure 4E**). Notably, the SCL-LMO1 DN1 thymocytes, the DN3 thymocytes which are the target for the acquisition of transforming *NOTCH1* mutations [5], and the ISP8 thymocytes which represent the abundant leukemia-propagating cell (LPC) population [6], showed the highest fold increases in protein synthesis. Interestingly, up-regulation of translation in SCL-LMO1 DN3 pre-leukemic thymocytes appeared to promote DN3 cell differentiation into ISP8 thymocytes as these cells were significantly expanded in leukemic mice (**Figure S3A-B**). Lastly, these changes in ribosome and protein biogenesis also correlated with an increase in proliferation rates for SCL-LMO1 leukemic thymocytes (**Figure 4G**) when compared to pre-leukemic thymocytes (**Figure 3D**), although division rates were not completely restored to that of wild type thymocytes. In light of these findings, and as SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes transform into leukemia-propagating cells following the acquisition of *NOTCH1* mutations, we can infer that a switch from low to high ribosome and protein synthesis rates is essential for leukemia progression.

2.4.5 SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes are sensitive to ribosome and protein synthesis inhibitors

We recently performed a high-throughput screening of FDA-approved compounds on primary SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes in a niche-based assay [7]. From this we discovered that the estrogen derivative 2-methoxyestradiol (2-ME2) efficiently abrogated their viability and self-renewal capacity *in vivo* by down-regulating MYC translation and inhibiting SCL-LMO1 activity. In parallel, 2-ME2 was also shown to inhibit translation initiation by increasing eIF4E association to its inhibitor 4E-BP1 [37]. Our screen also identified several compounds classified as mTOR inhibitors (data not shown), which have separately been shown to exhibit anti-leukemic activity, as is the case for the dual PI3K/mTOR inhibitor PI-103 [38]. In light of these results, we assessed the effect of 2-ME2 and PI-103 on both cell size and protein synthesis rates of SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes (**Figure 5A**). Drug treatment time (20 hours) and concentrations (1 μ M 2-ME2 and 200 nM PI-103) were optimized in order to measure quantifiable cellular changes without significantly inhibiting cell viability (data not shown). As

such, we first observed that wild type (WT) thymocytes sustained an average decrease of 18% in their relative rates of protein synthesis with both 2-ME2 and PI-103 treatments (**Figure 5B**) but without significantly affecting cell size (**Figure S4A**) or overall cell viability (data not shown). However, SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes, which were already shown to be significantly smaller than WT thymocytes (**Figure 2C-D**), underwent an additional 5-10% decrease in cell size with PI-103 treatment but not with 2-ME2 (**Figure 5C**). This was associated with a significant decrease of 18 to 25% in protein synthesis in the double-negative SCL-LMO1 thymocyte populations (**Figure 5D**), which also provoked a slight decrease in cell viability (data not shown). Taken together, these results demonstrate that SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes have consistently smaller cell sizes and protein synthesis rates when compared to WT thymocytes, and these are further significantly decreased following brief treatment courses with 2-ME2 and PI-103, thus highlighting their sensitivity to ribosome and protein synthesis inhibitors.

2.5 DISCUSSION

In the present study, we first characterized a newly discovered function of the SCL hematopoietic transcription factor in down-regulating ribosomal protein gene expression and protein synthesis in normal hematopoietic stem cells, a process which we show is uniquely dependent on *Scl* gene dosage. Since SCL is essential for the long term maintenance of HSC functions, including self-renewal, in response to 5-FU-induced proliferative stress, we surmised that only a slight 1.3-fold increase in ribosomal protein gene expression is sufficient to perturb HSC function. Our observations concur with the functional importance of tightly regulated protein synthesis rates in HSCs [14]. Interestingly, all genes involved in ribosome biogenesis (ribosomal protein, *Eef*, *Eif*, and rRNA processing genes) were 10-fold less bound by SCL than other target genes known to be positively regulated by SCL [6, 11, 39, 40]. This suggests that SCL-mediated transcriptional repression might occur via a different mechanism but whether it involves a different DNA-binding context or co-repressor recruitment remains to be determined.

Conversely, SCL-LMO1 reprogrammed pre-leukemic thymocytes have decreased cell size, protein synthesis and ribosomal protein gene expression which altogether limit cell proliferation. This phenotype also correlates with our previously published data where we show

that SCL-LMO1 imparts aberrant self-renewal capacities to these reprogrammed thymocytes [6]. This is consistent with other work that recently linked decreased ribosome and protein synthesis with sustained self-renewal of germline stem cells [22]. As such, we believe that translational reprogramming by the SCL-LMO1 oncogenes could establish a cellular state favoring self-renewal and near-quiescence, thus contributing to the emergence of so-called “hibernating” pre-leukemic stem cells which can perdure and ultimately lead to leukemia development.

Third, the study of SCL-LMO1 leukemic thymocytes revealed that pre-leukemic cells undergo a switch from low to high protein synthesis rates, which correlate with overall increased cell size and expression of ribosomal protein genes. Moreover, this was associated with increased cell proliferation and a release from the differentiation blockage at the DN3 stage which is specific to pre-leukemic stem cells. Taken together, these results are consistent with previous studies that showed that increased protein synthesis triggers stem cell differentiation [22] and that cancer cells require higher translation rates to sustain intensive proliferation [18, 41, 42]. We believe that the acquisition of *NOTCH1* gain-of-function mutations, which are found in more than 60% of T-ALL cases [13], might be sufficient to initiate and drive this increased translation. Indeed, NOTCH1 and its downstream effector MYC [43] and PI3K/AKT/mTOR pathways [44] have been shown to up-regulate ribosome and protein biogenesis.

Lastly, we investigated whether ribosome and protein biogenesis inhibitors would be efficient in targeting SCL-LMO1 pre-leukemic stem cells, as these cells are resistant to current chemotherapies [7] and represent an important reservoir for leukemia relapse [8]. Indeed, we had previously identified 2-ME2 as an inhibitor of SCL-LMO1 pre-LSC viability and activity [7], and 2-ME2 was separately shown to target eIF4E and decrease protein synthesis in osteosarcoma cells [37]. Moreover, several PI3K and mTOR inhibitors were also identified in our high-throughput screening of FDA-approved compounds (unpublished data), leading us to assess the effect of PI-103, a dual PI3K/mTOR inhibitor, on SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes. As such, we found that protein synthesis rates were decreased on average by 18% in wild type thymocytes but without apparent changes in cell size and viability. On the contrary, SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes were sensitive to 2-ME2 and PI-103 treatment as these

inhibitors potentiated the decrease in cell size and protein synthesis already observed in untreated pre-leukemic thymocytes thus provoking a slight but noticeable inhibition of viability. Although further testing is required to validate this hypothesis, we suggest that cells possess an intrinsic threshold for tolerable perturbations of ribosome and protein biogenesis and that changes exceeding this threshold are deleterious towards cell function and viability. In parallel, inhibition of cap-dependant mRNA translation can also decrease oncogene expression thus altering pre-leukemic stem cell activity [24]. Taken together, this study provides novel evidence that SCL controls ribosome biogenesis and protein synthesis in normal hematopoietic and pre-leukemic stem cells, and that pharmacological inhibition of these processes presents a promising therapeutic avenue in T-ALL.

2.6 MATERIALS AND METHODS

2.6.1 Mouse models and cell lines

All mice were maintained in a pathogen-free animal facility according to the Canadian Council on Animal Care and institutional guidelines. Experimental protocols were approved by the Committee of Ethics and Animal Deontology (CDEA) of the Université de Montréal. C57BL/6J (Wild type; WT) and Pep3^b mice are from the Jackson Laboratory. *Scl* heterozygous (*Scl*^{+/-}) mice [45] were a generous gift from Dr GC Begley (Amgen Inc.). Transgenic mice models were previously described: *pSil-TSCL* (*SCL*^{tg}; SCL) [46], *Lck-LMO1* (*LMO1*^{tg}; LMO1) [47], and *Cd3*^{-/-} [34]. All transgenic mice models were maintained on a C57BL/6J background for more than 12 generations. Double- (*SCL*^{tg}*LMO1*^{tg}; SCL-LMO1) and triple- (*Cd3*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg}; *Cd3*^{-/-} SCL-LMO1) transgenic mice models were generated by cross-breeding and genotypes were verified by PCR.

The previously described murine multipotent hematopoietic precursor cell line HPC7 [48] was generously donated by Dr Leif Carlsson from the University of Umeå (Sweden). Cells were maintained in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 100 ng/mL recombinant murine Stem Cell Factor (SCF; Shenandoah). The generation of the MS5-DL4 stromal cell line expressing the NOTCH1 Delta-like 4 ligand (DLL4) was previously described [7] and cells were cultured in

Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification (α MEM; Gibco) 10% inactivated FBS supplemented with 10 μ g/mL puromycin (Sigma) to maintain DLL4 expression.

2.6.2 Immunomagnetic depletion, thymocyte coculture on MS5-DL4 stromal cells and 2-ME2/PI-103 treatment

Thymi from 4 to 6-week-old pre-leukemic (pre-LK) or 13 to 18-week-old leukemic (LK) SCL-LMO1 mice and their respective age-matched C57BL/6J wild type (WT) control mice were harvested and thymocytes were extracted. Double-negative (DN) pre-LK thymocytes were enriched by immunomagnetic bead cell depletion of CD4⁺- and CD8⁺-expressing double-positive (DP) and single-positive (SP) thymocytes, as previously described [11]. Both SCL-LMO1 pre-LK DN thymocytes and total LK thymocytes were resuspended in complete T-cell media containing α MEM, 10% inactivated FBS, 10 mM HEPES (Gibco), 1 mM sodium pyruvate (Gibco), 2 mM Glutamax (Gibco), 55 μ M β -mercaptoethanol, 5 ng/mL FLT3 ligand (R&D System) and 5 ng/mL IL-7 ligand (R&D System). 10⁶ thymocytes (10⁶/mL) were coculture overnight on previously plated MS5-DL4 stromal cells (4x10⁴ cells per well) in 24-well plates for next-day *in vitro* OP-Puromycin protein synthesis analysis. For experiments requiring 20-hour 2-methoxyestradiol (2-ME2) or PI-103 treatment, drugs were added to the culture media at 1 μ M and 200 nM respectively.

2.6.3 OP-Puromycin protein synthesis analysis

In vivo quantification of protein synthesis in hematopoietic stem and progenitors cells (HSC) was performed as described [14]. Briefly, O-propargyl-puromycin (OP-Puro; Medchem Source) was dissolved in DMSO (50 mg/mL) and the working solution (5 mg/mL diluted in PBS pH 6.5) was injected intraperitoneally (50 mg/kg of body weight). One hour later mice were euthanized and bone marrow was collected. 25x10⁶ cells were stained with antibodies against lineage markers (B220, CD3, Gr1 and TER119), CD48 and CD45.1 and 10⁶ cells in the CD45.1^{Lin}^{low} population were purified for subsequent analysis. Sorted cells were stained with antibodies against Sca1, c-Kit and CD150. In parallel, unsorted cells were also stained to evaluate fluorescence intensity in the OP-Puro channel of total bone marrow. After washing, the cells were fixed, permeabilized, and OP-Puro was detected by performing an azide-alkyne

cycloaddition with the Click-iT® Cell Reaction Buffer Kit (Life Technologies) and Alexa Fluor® 488-azide (Life Technologies), as described [14]. Relative rates of protein synthesis were calculated according to the formula below:

$$RPS = \frac{(MFI\ OP - MFI\ DMSO)\ Pop}{(MFI\ OP - MFI\ DMSO)\ tBM}$$

MFI OP: mean fluorescence intensity (Alexa Fluor® 488 channel) of cells from OP-Puro-treated mice. MFI DMSO: mean fluorescence intensity (Alexa Fluor® 488 channel) of DMSO-treated mice. *Pop*: population of interest. *tMPPMPP*: total bone marrow.

In vitro protein synthesis quantification was performed on 10⁶ AD.10 cells or cocultured SCL-LMO1 pre-LK and LK thymocytes. Briefly, cells were treated with 10 µM OP-Puro (Medicinal Chemistry core facility, Institute for Research in Immunology and Cancer – Université de Montréal) or DMSO for 30 minutes at 37°C. Cells were collected, removed from drug and/or OP-Puro containing media, stained for T-cell flow cytometry analysis (detailed below), and then fixed and permeabilized using 1% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) in phosphate-buffered saline (PBS) and 0,1% saponin (Sigma) in PBS supplemented with 3% inactivated FBS respectively. OP-Puro labelling chemistry was performed using the Click-iT® Cell Reaction Buffer Kit (Life Technologies) and a fluorescently labelled picolyl azide moiety (Alexa Fluor® 488-azide; Life Technologies), according to manufacturer's instructions. OP-Puro incorporation was assessed by flow cytometry (Alexa Fluor® 488 channel) in all T-cell populations and the relative rate of protein synthesis (RPS) was quantified according to the following formula:

$$RPS = \frac{(MFI\ OP - MFI\ DMSO)\ SCL\ pop}{(MFI\ OP - MFI\ DMSO)\ WT\ tot}$$

MFI OP: mean fluorescence intensity (Alexa Fluor® 488 channel) of OP-Puro-treated cells. MFI DMSO: mean fluorescence intensity (Alexa Fluor® 488 channel) of DMSO-treated cells. *SCL pop*: T-cell population of interest in SCL-LMO1 pre-leukemic or leukemic thymocytes. *WT tot*: Total T-cell population in wild type thymocytes.

2.6.4 Flow cytometry and cell size analysis

Single-cell suspensions of thymocytes extracted from C57BL/6J wild type and SCL-LMO1 pre-

leukemic or leukemic mice, at the indicated age, were stained for flow cytometry analysis, as previously described [49]. Immunostaining for T-cell population analysis was performed using selective antibodies against Thy1.2 (30-H12), CD4 (RM4-5), CD8 (53-6.7), CD25 (PC61), CD44 (IM7) and CD45.2 (104). Immunostaining for Lin⁻Sca1⁺Kit⁺ hematopoietic stem and progenitor cells was performed using selective antibodies against Sca1 (D7), CD150 (TC15-12F12.2), CD48 (HM48-1) and CD45.2 (104). Cells expressing lineage surface markers B220 (RA3-6B2), CD3 (145-2C11), FC ϵ RI α (MAR-1), Gr1 (RB6-8C5) and TER119 (TER-119) were stained with biotinylated antibodies and a secondary streptavidin antibody. All antibodies used were purchased from either BD Biosciences, eBioscience or BioLegend. Dead or apoptotic (sub-G1) cells were excluded by propidium iodide (Sigma) or DAPI (Sigma) staining respectively. FACS analysis was performed on an LSRII cytometer and cell sorting was performed on a FACS Aria I cytometer (BD Biosciences). Cell size analysis was performed using the forward scatter (FSC) parameter measuring the cell volume of the different HSC and T-cell populations.

2.6.5 Chromatin immunoprecipitation and quantitative PCR

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed on 20×10^6 HPC7 cells in exponential growth phase (5×10^5 cells/mL). Briefly, cell pellets were resuspended and fixed in 2% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) PBS solution for 10 minutes at room temperature with agitation. Glycine was added to a final concentration of 0.15 M for paraformaldehyde quenching. Cells were pelleted and washed twice with 10 mL cold PBS/EDTA 5 mM for two 5-minute agitation periods at 4°C. Cells were then first agitated for 30 minutes at 4°C in a cytosolic lysis solution (10 mM Tris-HCl pH 8, 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 10 mM EDTA and protease inhibitors) and then nuclear pellets were lysed in a nuclear lysis solution (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM MgCl₂, 1% SDS, 10 mM EDTA and protease inhibitors). Chromatin extracts were sonicated into 150-300 bp DNA fragments using a Bioruptor (Diagenode). An aliquot of chromatin extract was kept for isolation of input DNA, while remaining chromatin samples were incubated overnight at 4°C with goat anti-mouse SCL (sc-12984X; Santa Cruz Biotechnology) and its respective IgG serum control (Sigma). DNA-protein complexes were then immunoprecipitated using magnetic Protein G-coupled

beads (Dynabeads; Invitrogen), sequentially washed once in Low-salt buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X100 and 0.1% SDS), twice in High-salt buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% Triton X100 and 0.1% SDS), once in LiCl buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.25 M LiCl, 1% NP-40 and 1% sodium deoxycholate), and three times in TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8 and 1 mM EDTA), and eluted twice in 0.1 M NaHCO₃ 1% SDS. Eluted chromatin samples were incubated at 65°C overnight with 1% Chelex100 resin (Sigma) for reverse crosslinking of DNA-protein complexes. Immunoprecipitated DNA was then extracted once in phenol:chloroform and then once in chloroform, and precipitated overnight at -20°C in 30 mM NaOAc pH 5.2 with 75 µg GlycoBlue (Invitrogen). Lastly, DNA pellets were resuspended in 10 mM Tris-HCl pH 8 and used for quantitative PCR.

Quantitative PCR (qPCR) was performed in 384-well plates using the LightCycler® 480 analyzer (Roche). Specific primer pairs were designed to target the SCL peaks observed in available HPC7 ChIP-Seq datasets (NCBI accession # GSE22178) for a panel of genes involved in ribosome biogenesis and translation initiation and elongation (primer list and sequences available upon request). Immunoprecipitated DNA was amplified using the PerfeCTa SYBR® Green FastMix ROX PCR master mix (Quanta Bio). Measurements were performed in triplicates and the fraction of input (%) was calculated for each immunoprecipitated gene.

2.6.6 CFSE cell division analysis

Thymocytes were harvested from Wild type (WT), SCL-LMO1 pre-leukemic (pre-LK) and SCL-LMO1 leukemic (LK) mice. Double-negative (DN) thymocytes were enriched by immunomagnetic bead cell depletion of CD4⁺- and CD8⁺-expressing double-positive (DP) and single-positive (SP) thymocytes, as previously described. Cells were then stained with CellTrace™ CFSE dye (7,5 mM; Invitrogen) according to manufacturer's instructions. DN3 thymocytes containing high levels of CFSE dye (CFSE^{High}) were sorted by flow cytometry (FACSARIAI; BD Biosciences) and then placed in coculture with MS5-DL4 stromal cells for 72 hours, as previously described. CFSE dye levels retained in thymocytes were then quantified by flow cytometry and CFSE peaks were assigned using FlowJo and ModFit software.

2.6.7 RNA-Sequencing and microarray analysis

Lin⁻Sca1⁺150⁺48⁺45.1⁻ cells were purified from the bone marrow of *Scl*^{+/-} and WT mice one month post 5-FU treatment. RNA extracted was prepared using the TruSeq RNA kit (Illumina) and sequenced in the Illumina HiSeq2000 (Genomics core facility, Institute for Research in Immunology and Cancer – Université de Montréal). Low quality bases (quality below 20) in the paired-end reads were trimmed off using the Trimmomatic tool [50], and processed reads were aligned to the mouse genome mm10 using Tophat2/Bowtie2 v2.0.7 [51], and transcripts were quantified (FPKM values) using cuffdiff v.2.1.1.

RNAs collected from *Cd3*^{-/-} WT, *Cd3*^{-/-} SCL-LMO1 pre-leukemic and leukemic, and *Cd3*^{+/+} SCL-LMO1 leukemic thymocytes were amplified and hybridized onto Affymetrix Mouse Genome 430A 2.0 arrays (Ottawa Genome Centre, Ottawa, Ontario, Canada), as previously described [6] (NCBI accession # GSE74659).

2.7 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Leif Carlsson (University of Umeå, Sweden) for generously providing the HPC7 cell line, Danièle Gagné and Gaël Dulude for assistance with flow cytometry, and Véronique Litalien and André Haman for animal and experiment technical support. This work was funded by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR; to TH), the Canadian Cancer Society Research Institute (CCSRI; to TH), the Leukemia Lymphoma Society of Canada (to TH), and the Cancer Research Society Inc. (to TH). Studentships were awarded from the CIHR (to EO and MT), the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS; to EO, SRS and MT), the Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales (FESP) of the Université de Montréal (to EO), the Guy-Mongeau foundation (to SRS) and the Cole Foundation (to SRS, MT, BG and DFTV).

2.8 REFERENCES

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**(5): p. 646-74.
2. Mullighan, C.G. (2013). Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. **50**(4): p. 314-24.

3. Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. **278**(5340): p. 1059-64.
4. Ferrando, A.A. and A.T. Look (2003). Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. **40**: p. 274-280.
5. Tremblay, M., C.S. Tremblay, S. Herblot, P.D. Aplan, J. Hebert, C. Perreault, and T. Hoang (2010). Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes Dev*. **24**(11): p. 1093-105.
6. Gerby, B., C.S. Tremblay, M. Tremblay, S. Rojas-Sutterlin, S. Herblot, J. Hebert, G. Sauvageau, S. Lemieux, E. Lecuyer, D.F. Veiga, and T. Hoang (2014). SCL, LMO1 and Notch1 Reprogram Thymocytes into Self-Renewing Cells. *PLoS Genet*. **10**(12): p. e1004768.
7. Gerby, B., D.F. Veiga, J. Krosł, S. Nourreddine, J. Ouellette, A. Haman, G. Lavoie, I. Fares, M. Tremblay, V. Litalien, E. Ottoni, M. Kasic, D. Geoffrion, J. Ryan, P.S. Maddox, J. Chagraoui, A. Marinier, J. Hebert, G. Sauvageau, B.H. Kwok, P.P. Roux, and T. Hoang (2016). High-throughput screening in niche-based assay identifies compounds to target preleukemic stem cells. *J Clin Invest*. **126**(12): p. 4569-4584.
8. Corces-Zimmerman, M.R. and R. Majeti (2014). Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia*. **28**(12): p. 2276-82.
9. Valent, P., D. Bonnet, R. De Maria, T. Lapidot, M. Copland, J.V. Melo, C. Chomienne, F. Ishikawa, J.J. Schuringa, G. Stassi, B. Huntly, H. Herrmann, J. Soulier, A. Roesch, G.J. Schuurhuis, S. Wohrer, M. Arock, J. Zuber, S. Cerny-Reiterer, H.E. Johnsen, M. Andreeff, and C. Eaves (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. **12**(11): p. 767-75.
10. Lecuyer, E., S. Lariviere, M.C. Sincennes, A. Haman, R. Lahlil, M. Todorova, M. Tremblay, B.C. Wilkes, and T. Hoang (2007). Protein stability and transcription factor complex assembly determined by the SCL-LMO2 interaction. *J Biol Chem*. **282**(46): p. 33649-58.
11. Lacombe, J., S. Herblot, S. Rojas-Sutterlin, A. Haman, S. Barakat, N.N. Iscove, G. Sauvageau, and T. Hoang (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood*. **115**(4): p. 792-803.
12. Larmonie, N.S., W.A. Dik, J.P. Meijerink, I. Homminga, J.J. van Dongen, and A.W. Langerak (2013). Breakpoint sites disclose the role of the V(D)J recombination machinery in the formation of T-cell receptor (TCR) and non-TCR associated aberrations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. **98**(8): p. 1173-84.
13. Weng, A.P., A.A. Ferrando, W. Lee, J.P.t. Morris, L.B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S.C. Blacklow, A.T. Look, and J.C. Aster (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. **306**(5694): p. 269-71.
14. Signer, R.A., J.A. Magee, A. Salic, and S.J. Morrison (2014). Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature*. **509**(7498): p. 49-54.
15. De Keersmaecker, K., Z.K. Atak, N. Li, C. Vicente, S. Patchett, T. Girardi, V. Gianfelici, E. Geerdens, E. Clappier, M. Porcu, I. Lahortiga, R. Luca, J. Yan, G. Hulselmans, H. Vranckx, R. Vandepoel, B. Sweron, K. Jacobs, N. Mentens, I. Wlodarska, B. Cauwelier, J. Cloos, J. Soulier, A. Uyttebroeck, C. Bagni, B.A. Hassan, P. Vandenberghe, A.W. Johnson, S. Aerts, and J. Cools (2013). Exome sequencing

- identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* **45**(2): p. 186-90.
16. Tzoneva, G., A. Perez-Garcia, Z. Carpenter, H. Khiabani, V. Tosello, M. Allegretta, E. Paietta, J. Racevskis, J.M. Rowe, M.S. Tallman, M. Paganin, G. Basso, J. Hof, R. Kirschner-Schwabe, T. Palomero, R. Rabadan, and A. Ferrando (2013). Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med.* **19**(3): p. 368-71.
 17. Rao, S., S.Y. Lee, A. Gutierrez, J. Perrigoue, R.J. Thapa, Z. Tu, J.R. Jeffers, M. Rhodes, S. Anderson, T. Oravec, S.P. Hunger, R.A. Timakhov, R. Zhang, S. Balachandran, G.P. Zambetti, J.R. Testa, A.T. Look, and D.L. Wiest (2012). Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. *Blood.* **120**(18): p. 3764-73.
 18. Goudarzi, K.M. and M.S. Lindstrom (2016). Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review). *Int J Oncol.* **48**(4): p. 1313-24.
 19. Narla, A. and B.L. Ebert (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood.* **115**(16): p. 3196-205.
 20. Cai, X., L. Gao, L. Teng, J. Ge, Z.M. Oo, A.R. Kumar, D.G. Gilliland, P.J. Mason, K. Tan, and N.A. Speck (2015). Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell.* **17**(2): p. 165-77.
 21. Ito, K. and K. Ito (2015). Resistance in the Ribosome: RUNX1, pre-LSCs, and HSPCs. *Cell Stem Cell.* **17**(2): p. 129-31.
 22. Sanchez, C.G., F.K. Teixeira, B. Czech, J.B. Preall, A.L. Zamparini, J.R. Seifert, C.D. Malone, G.J. Hannon, and R. Lehmann (2016). Regulation of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Controls Germline Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell.* **18**(2): p. 276-90.
 23. Ghosh, J., M. Kobayashi, B. Ramdas, A. Chatterjee, P. Ma, R.S. Mali, N. Carlesso, Y. Liu, D.R. Plas, R.J. Chan, and R. Kapur (2016). S6K1 regulates hematopoietic stem cell self-renewal and leukemia maintenance. *J Clin Invest.* **126**(7): p. 2621-5.
 24. Girardi, T. and K. De Keersmaecker (2015). T-ALL: ALL a matter of Translation? *Haematologica.* **100**(3): p. 293-5.
 25. Quin, J.E., J.R. Devlin, D. Cameron, K.M. Hannan, R.B. Pearson, and R.D. Hannan (2014). Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta.* **1842**(6): p. 802-16.
 26. Worton, R.G., E.A. McCulloch, and J.E. Till (1969). Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. *J Cell Physiol.* **74**(2): p. 171-82.
 27. Worton, R.G., E.A. McCulloch, and J.E. Till (1969). Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. *J Exp Med.* **130**(1): p. 91-103.
 28. Jones, R.J., J.E. Wagner, P. Celano, M.S. Zicha, and S.J. Sharkis (1990). Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature.* **347**(6289): p. 188-9.
 29. Acar, M., K.S. Kocherlakota, M.M. Murphy, J.G. Peyer, H. Oguro, C.N. Inra, C. Jaiyeola, Z. Zhao, K. Luby-Phelps, and S.J. Morrison (2015). Deep imaging of bone

- marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. **526**(7571): p. 126-30.
30. Szilvassy, S.J., R.K. Humphries, P.M. Lansdorp, A.C. Eaves, and C.J. Eaves (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**(22): p. 8736-40.
 31. Randall, T.D. and I.L. Weissman (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood*. **89**(10): p. 3596-606.
 32. Marguerat, S. and J. Bahler (2012). Coordinating genome expression with cell size. *Trends Genet*. **28**(11): p. 560-5.
 33. Liu, J., Y. Xu, D. Stoleru, and A. Salic (2012). Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**(2): p. 413-8.
 34. Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier, and B. Malissen (1995). Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J*. **14**(19): p. 4641-53.
 35. Thomas, G. (2000). An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat Cell Biol*. **2**(5): p. E71-2.
 36. Donati, G., L. Montanaro, and M. Derenzini (2012). Ribosome biogenesis and control of cell proliferation: p53 is not alone. *Cancer Res*. **72**(7): p. 1602-7.
 37. Maran, A., K.L. Shogren, and M.J. Yaszemski (2016). The estrogen metabolite 2-methoxyestradiol regulates eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and inhibits protein synthesis in MG63 osteosarcoma cells. *Genes & Diseases*. **3**(2): p. 153-158.
 38. Park, S., N. Chapuis, V. Bardet, J. Tamburini, N. Gallay, L. Willems, Z.A. Knight, K.M. Shokat, N. Azar, F. Viguie, N. Ifrah, F. Dreyfus, P. Mayeux, C. Lacombe, and D. Bouscary (2008). PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia*. **22**(9): p. 1698-706.
 39. Lahlil, R., E. Lecuyer, S. Herblot, and T. Hoang (2004). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol Cell Biol*. **24**(4): p. 1439-52.
 40. Lacombe, J., G. Kros, M. Tremblay, B. Gerby, R. Martin, P.D. Aplan, S. Lemieux, and T. Hoang (2013). Genetic interaction between Kit and Scl. *Blood*. **122**(7): p. 1150-61.
 41. Ruggero, D. and P.P. Pandolfi (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer*. **3**(3): p. 179-92.
 42. Silvera, D., S.C. Formenti, and R.J. Schneider (2010). Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer*. **10**(4): p. 254-66.
 43. van Riggelen, J., A. Yetil, and D.W. Felsher (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer*. **10**(4): p. 301-9.
 44. Chan, J.C., K.M. Hannan, K. Riddell, P.Y. Ng, A. Peck, R.S. Lee, S. Hung, M.V. Astle, M. Bywater, M. Wall, G. Poortinga, K. Jastrzebski, K.E. Sheppard, B.A. Hemmings, M.N. Hall, R.W. Johnstone, G.A. McArthur, R.D. Hannan, and R.B. Pearson (2011). AKT promotes rRNA synthesis and cooperates with c-MYC to stimulate ribosome biogenesis in cancer. *Sci Signal*. **4**(188): p. ra56.
 45. Elefanty, A.G., C.G. Begley, D. Metcalf, L. Barnett, F. Kontgen, and L. Robb (1998). Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor

- SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(20): p. 11897-902.
46. Aplan, P.D., C.A. Jones, D.S. Chervinsky, X. Zhao, M. Ellsworth, C. Wu, E.A. McGuire, and K.W. Gross (1997). An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J.* **16**(9): p. 2408-19.
 47. McGuire, E.A., C.E. Rintoul, G.M. Sclar, and S.J. Korsmeyer (1992). Thymic overexpression of Ttg-1 in transgenic mice results in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Mol Cell Biol.* **12**(9): p. 4186-96.
 48. Pinto do, O.P., A. Kolterud, and L. Carlsson (1998). Expression of the LIM-homeobox gene LH2 generates immortalized steel factor-dependent multipotent hematopoietic precursors. *EMBO J.* **17**(19): p. 5744-56.
 49. Herblot, S., A.M. Steff, P. Hugo, P.D. Aplan, and T. Hoang (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol.* **1**(2): p. 138-44.
 50. Bolger, A.M., M. Lohse, and B. Usadel (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* **30**(15): p. 2114-20.
 51. Kim, D., G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley, and S.L. Salzberg (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**(4): p. R36.

2.9 FIGURES

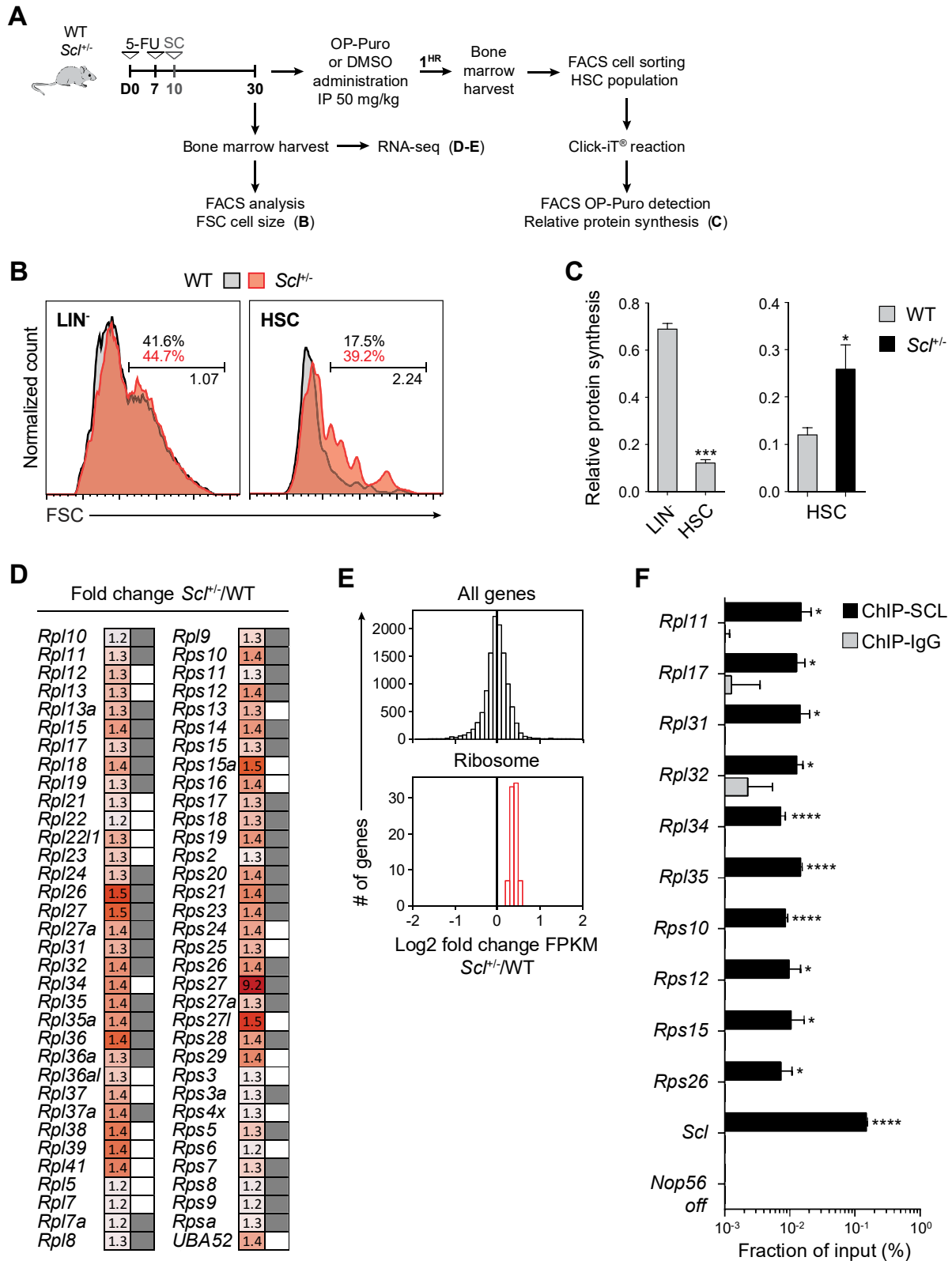


Figure 1. SCL regulates ribosome and protein synthesis in normal HSCs. (A) Experimental strategy to assess *Scl* gene dosage (*Scl*^{+/-}) effect on HSC cell size, *in vivo* protein synthesis and ribosomal protein gene expression after 5-FU-induced proliferative stress. (B) FSC cell size distribution of Wild type (WT; grey) and *Scl*^{+/-} (red) Lin⁻Sca⁻ (LIN⁻) progenitors and Lin⁻Sca⁺CD150⁺CD48⁻ (HSC) long-term HSCs reveals increased cell size in *Scl*^{+/-} HSCs. Shown are the respective % of gated cells and cell size fold changes. (C) Relative rates of protein synthesis, as calculated from *in vivo* incorporation of OP-Puromycin in LIN⁻ and HSC cells from WT mice only (left) and in HSC cells from WT and *Scl*^{+/-} mice (right), shows increased protein synthesis in *Scl*^{+/-} HSCs. n=6 mice per genotype. Data represents mean ± SEM. *p≤0.05; ***p≤0.0005. (D) RNA-Sequencing reveals up-regulation of ribosomal protein genes (*Rpl* and *Rps*) in *Scl*^{+/-} HSCs (≥1.3 *Scl*^{+/-}/WT fold change; shades of red). Grey boxes indicate the presence of SCL peaks at the TSS (±2 kb) according to available ChIP-Sequencing datasets in murine multipotent hematopoietic progenitor cells (HPC7; NCBI accession # GSE22178). (E) Log2 FPKM fold changes (*Scl*^{+/-}/WT) represent the distribution of all genes (n=23351) versus ribosomal protein genes (n=81), which are globally up-regulated in *Scl*^{+/-} HSCs. (F) Chromatin immunoprecipitation in HPC7 cells validates the observed SCL TSS peaks from ChIP-Seq datasets in D. Data represents mean fraction of input (%) for each immunoprecipitated gene by SCL antibody (ChIP-SCL) or IgG serum (ChIP-IgG) ± SD (triplicate values representative of 2 separate experiments). Respectively, *Scl* and *Nop56 off* (TSS -1 kb) serve as positive and negative controls for SCL binding. *p≤0.05; ****p≤0.001.

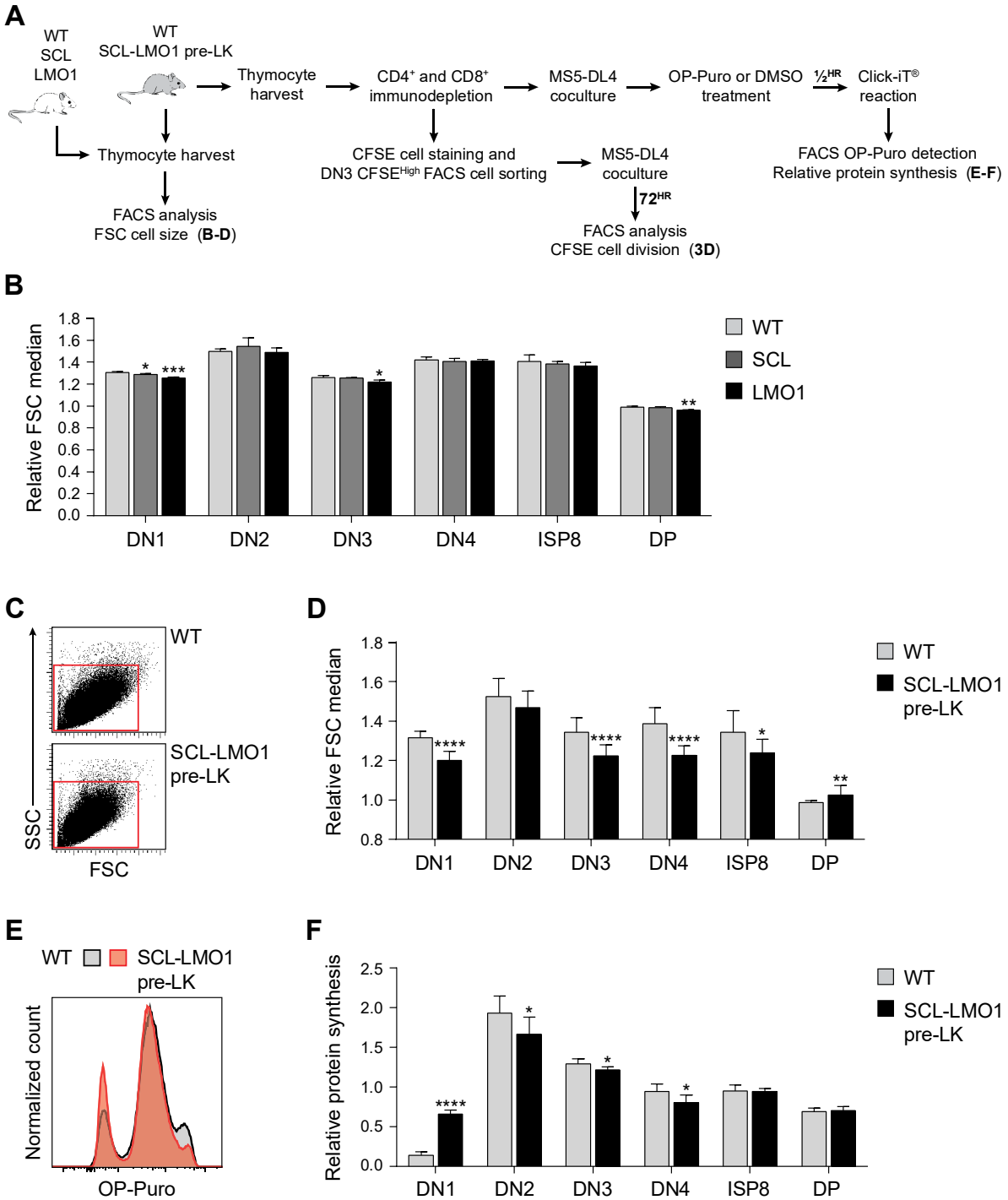


Figure 2. SCL-LMO1 oncogenes decrease cell size and protein synthesis in pre-leukemic thymocytes. (A) Experimental strategy to assess SCL, LMO1 or SCL-LMO1 oncogene effect on thymocyte cell size, *in vitro* protein synthesis and cell proliferation (3D). (B) Relative FSC cell size analysis of individual thymocyte populations from SCL and LMO1 mice compared to WT mice shows no significant changes in cell size (n=3 mice per genotype). (C) FSC-SSC plots show globally decreased FSC scatter for SCL-LMO1 pre-leukemic (pre-LK) total thymocytes

(representative of n=11 mice per genotype). Red boxes designate arbitrary FSC and SSC cut-offs based on WT distribution. **(D)** Relative FSC cell size analysis of individual thymocyte populations reveals significant decreases in cell size for DN1, DN3 and DN4 SCL-LMO1 pre-LK thymocytes. Y-axis cropped below 0.8 to highlight modest but significant changes in cell size (full scale in **S2A**). **(E)** *In vitro* OP-Puromycin (OP-Puro) incorporation is globally decreased in SCL-LMO1 pre-LK total thymocytes (red) compared to total WT thymocytes (grey). Data representative of 2 separate experiments with thymocyte pools from 9 WT mice and 3 SCL-LMO1 mice per experiment. **(F)** Relative rates of protein synthesis, as calculated from *in vitro* OP-Puro incorporation in individual thymocyte populations from WT and SCL-LMO1 pre-LK mice, shows decreased protein synthesis in all DN SCL-LMO1 pre-LK thymocytes (n=2 with thymocyte pools from 9 WT and 3 SCL-LMO1 mice per experiment). Data represents mean \pm SD. *p \leq 0.05; **p \leq 0.01; ***p \leq 0.005; ****p \leq 0.001. DN1-4: double-negative (CD4⁻CD8⁻) stage 1 (CD25⁻CD44⁺), 2 (CD25⁺CD44⁺), 3 (CD25⁺CD44⁻) and 4 (CD25⁻CD44⁻); ISP8: immature single-positive CD8⁺ (CD4⁻CD8^{Low}); DP: double-positive (CD4⁺CD8⁺).

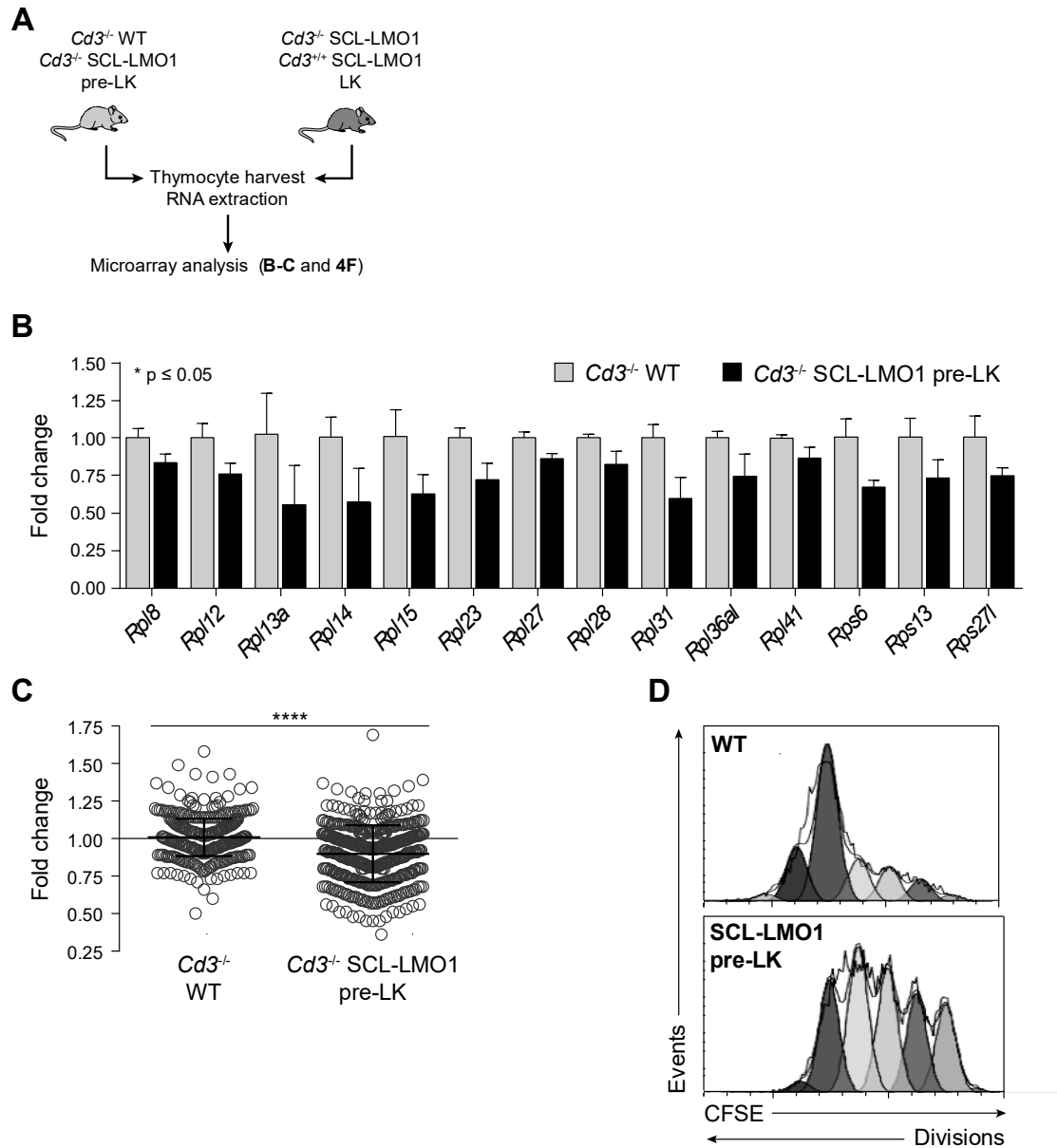


Figure 3. Decreased protein synthesis in SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes correlates with decreased ribosomal gene expression and limited proliferation. (A) Experimental strategy to assess ribosomal protein gene expression by microarray analysis in *Cd3*^{-/-} WT and SCL-LMO1 pre-leukemic (pre-LK) thymocytes, and *Cd3*^{-/-} or *Cd3*^{+/-} SCL-LMO1 leukemic (LK) thymocytes (4F). (B) Microarray analysis reveals several significantly down-regulated ribosomal protein genes (*Rpl* and *Rps*) in *Cd3*^{-/-} SCL-LMO1 pre-LK thymocytes. Data represents mean \pm SD. * $p \leq 0.05$. (C) *Cd3*^{-/-} SCL-LMO1/WT fold changes for all individual ribosomal protein genes (circles) shows a global down-regulation of the ribosome pathway in SCL-LMO1 pre-LK thymocytes (**** $p \leq 0.001$). (D) Increased CFSE dye retention in sorted DN3 SCL-LMO1 pre-LK thymocytes maintained in coculture for 72 hours with MS5-DL4 stromal cells indicates decreased proliferative capacity compared to DN3 WT thymocytes (representative of two separate experiments).

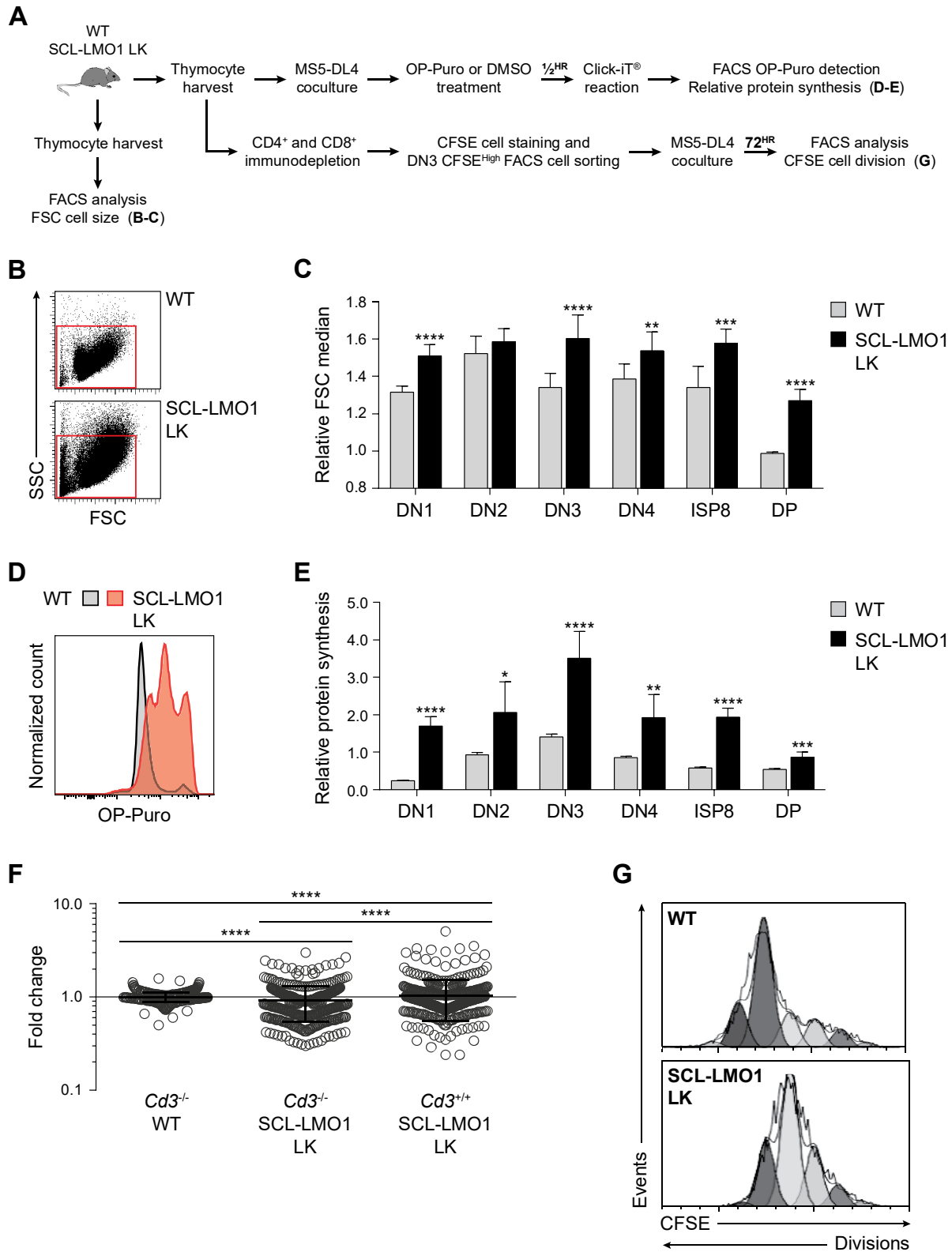


Figure 4. SCL-LMO1 leukemic thymocytes acquire increased protein synthesis, ribosomal gene expression and proliferation rates. (A) Experimental strategy to assess SCL-LMO1

oncogene effect on leukemic thymocyte cell size, *in vitro* protein synthesis, ribosomal protein gene expression and cell proliferation. **(B)** FSC-SSC plots show globally increased FSC scatter for SCL-LMO1 leukemic (LK) total thymocytes (representative of n=4 mice per genotype). Red boxes designate the same arbitrary FSC and SSC cut-offs based on WT distribution as in **2C**. **(C)** Relative FSC cell size analysis of individual thymocyte populations reveals significantly increased cell sizes in all populations for SCL-LMO1 LK mice when compared to WT mice (n=4 mice per genotype). Y-axis cropped below 0.8 to highlight modest but significant changes in cell size (full scale in **S2B**). **(D)** *In vitro* OP-Puromycin (OP-Puro) incorporation is globally increased in SCL-LMO1 LK total thymocytes (red) compared to total WT thymocytes (representative of n=4 mice per genotype). **(E)** Relative rates of protein synthesis, as calculated from *in vitro* OP-Puro incorporation in individual thymocyte populations from WT and SCL-LMO1 LK mice, shows increased protein synthesis in all SCL-LMO1 LK thymocytes (n=4 per genotype). **(F)** Microarray analysis of *Cd3^{-/-}* or *+/+* SCL-LMO1/WT fold changes for all individual ribosomal protein genes (circles) shows a global up-regulation of the ribosome pathway in SCL-LMO1 LK thymocytes (****p≤0.001). **(G)** Decreased CFSE dye retention in sorted DN3 SCL-LMO1 LK thymocytes maintained in coculture for 72 hours with MS5-DL4 stromal cells shows efficient proliferative capacity (representative of two separate experiments). Data represents mean ± SD. *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.005; ****p≤0.001. DN1-4: double-negative (CD4⁻CD8⁻) stage 1 (CD25⁻CD44⁺), 2 (CD25⁺CD44⁺), 3 (CD25⁺CD44⁻) and 4 (CD25⁻CD44⁻); ISP8: immature single-positive CD8⁺ (CD4⁻CD8^{Low}); DP: double-positive (CD4⁺CD8⁺).

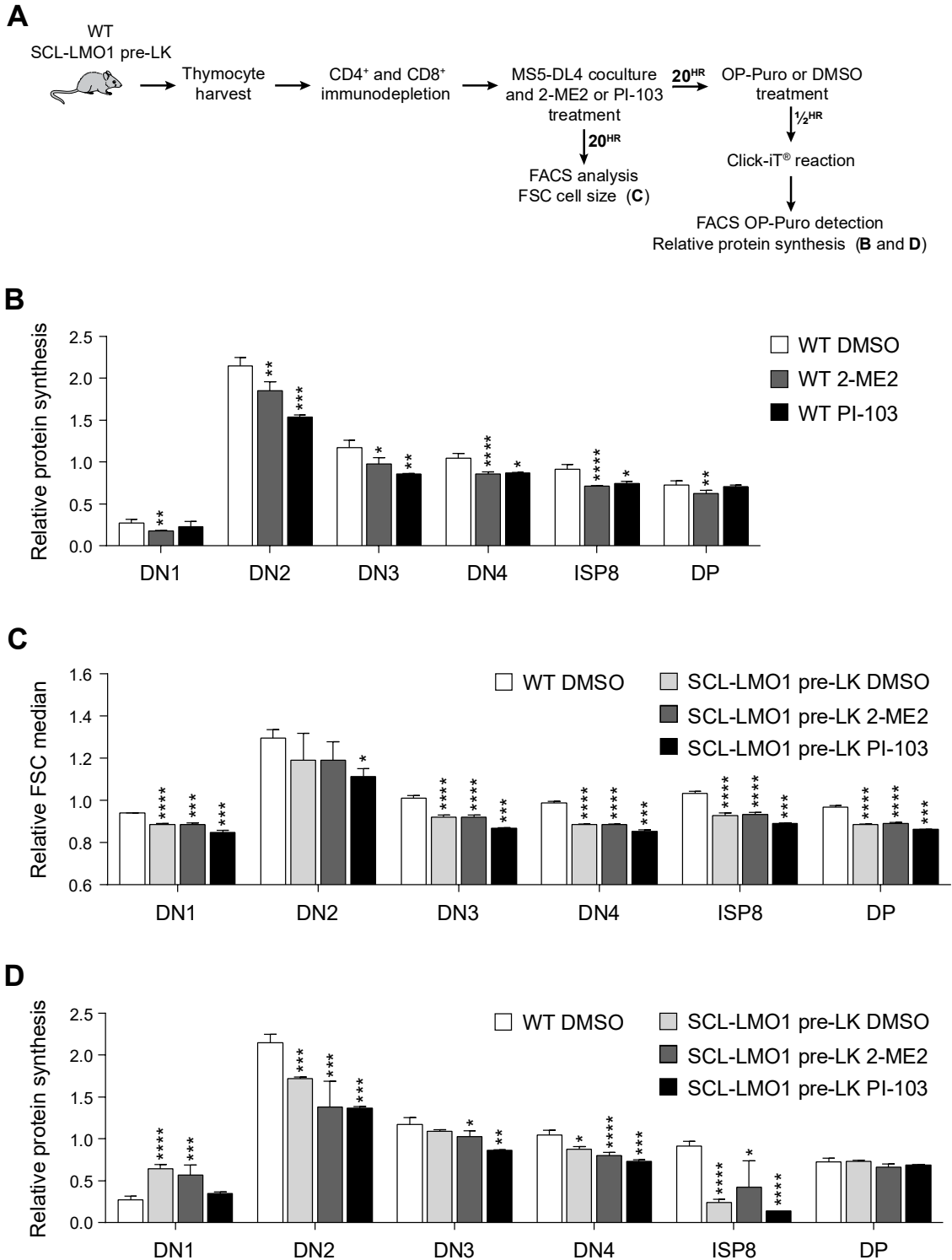


Figure 5. SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes are sensitive to ribosome and protein synthesis inhibitors. (A) Experimental strategy to assess the effect of ribosomal and translational inhibition on SCL-LMO1 pre-leukemic (pre-LK) thymocyte cell size and protein synthesis. 20-hour 2-methoxyestradiol (2-ME2; 1 μ M; n=2) and PI-103 (200 nM; n=1)

treatments (B-D) were performed on thymocyte pools from 9 WT mice and 3 SCL-LMO1 pre-LK mice per experiment. (B) 2-ME2 and PI-103 decrease the relative rates of protein synthesis in all WT thymocyte populations, as calculated from *in vitro* OP-Puro incorporation. (C) Post-treatment relative FSC cell size analysis of individual thymocyte populations reveals potentiated decreases in cell size for SCL-LMO1 pre-LK thymocytes. Y-axis cropped below 0.6 to highlight modest but significant changes in cell size. (D) Post-treatment relative rates of protein synthesis, as calculated from *in vitro* OP-Puro incorporation in individual thymocyte populations from WT and SCL-LMO1 pre-LK mice, shows potentiated decreases in protein synthesis for SCL-LMO1 pre-LK thymocytes. Data represents mean \pm SD. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$; **** $p \leq 0.001$. DN1-4: double-negative (CD4⁻CD8⁻) stage 1 (CD25⁻CD44⁺), 2 (CD25⁺CD44⁺), 3 (CD25⁺CD44⁻) and 4 (CD25⁻CD44⁻); ISP8: immature single-positive CD8⁺ (CD4⁻CD8^{Low}); DP: double-positive (CD4⁺CD8⁺).

2.10 SUPPLEMENTARY FIGURES

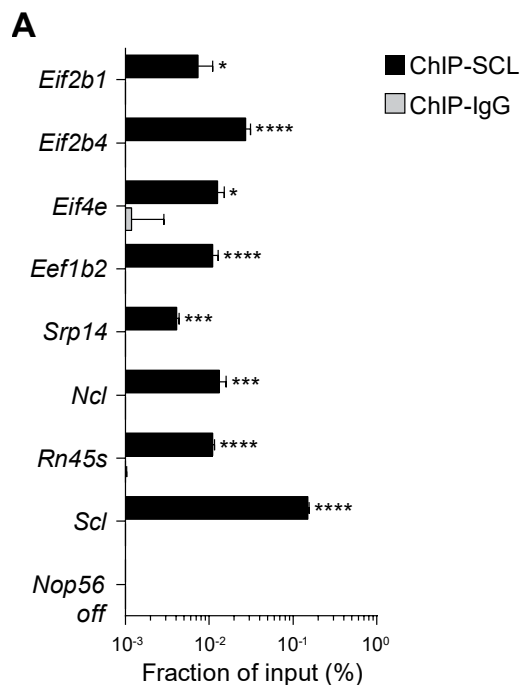


Figure S1. SCL binds promoters of genes involved in translation initiation and elongation, polysome formation and rRNA processing. (A) Chromatin immunoprecipitation in HPC7 cells reveals SCL promoter binding of genes involved in translation initiation (*Eif2b1*, *Eif2b4* and *Eif4e*) and elongation (*Eef1b2*), polysome formation (*Srp14*) and ribosomal RNA (rRNA) processing (*Ncl* and *Rn45s*). Data represents mean fraction of input (%) for each immunoprecipitated gene by SCL antibody (ChIP-SCL) or IgG serum (ChIP-IgG) \pm SD (triplicate values representative of 2 separate experiments). Respectively, *Scl* and *Nop56 off* (TSS -1 kb) serve as positive and negative controls for SCL binding. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$; **** $p \leq 0.001$.

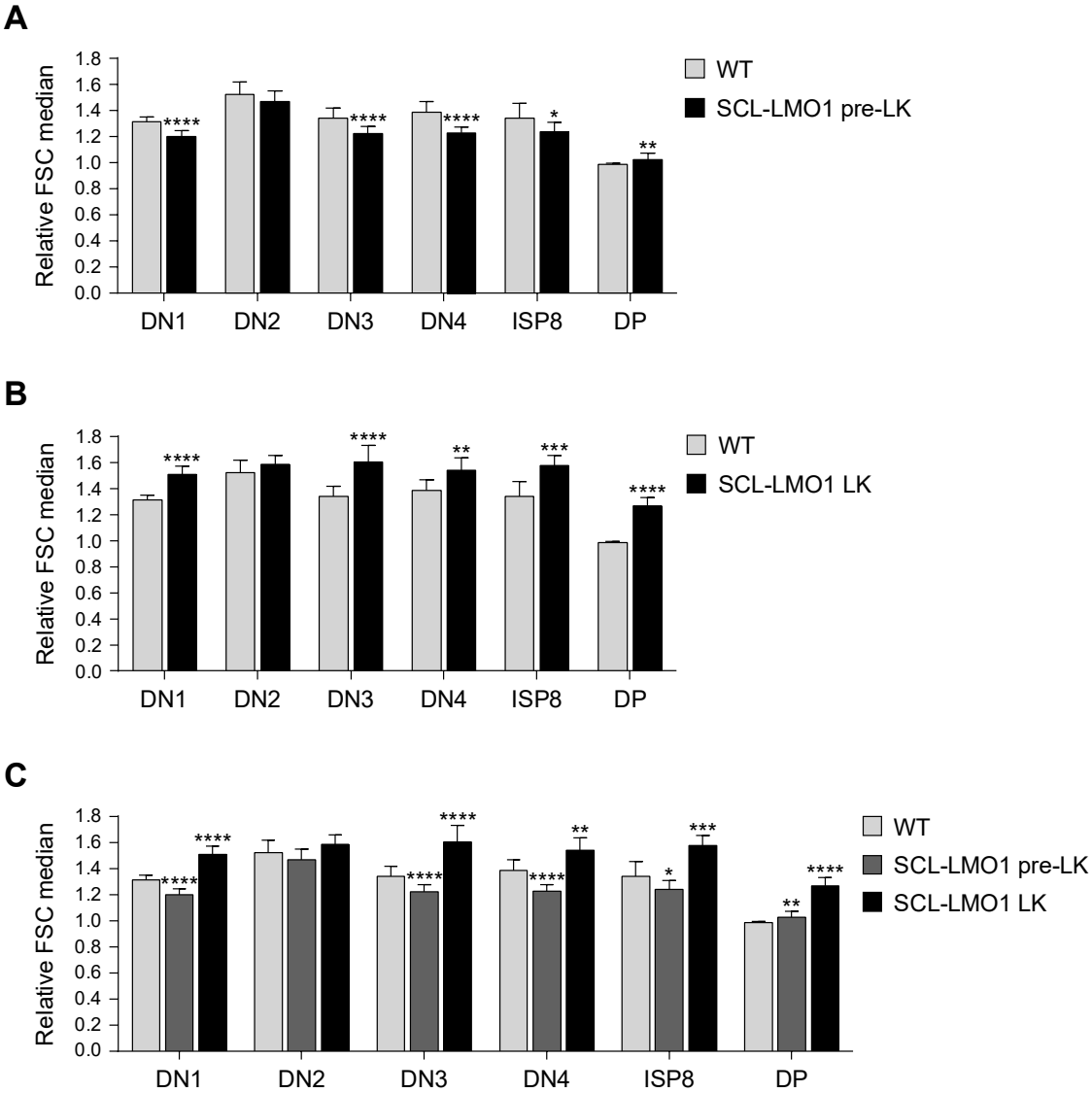


Figure S2. SCL-LMO1 pre-leukemic and leukemic thymocytes have differential cell sizes compared to wild type thymocytes. (A) Relative FSC cell size analysis of individual thymocyte populations reveals significant decreases in cell size for DN1, DN3 and DN4 SCL-LMO1 pre-LK thymocytes when compared to WT thymocytes (n=11 mice per genotype). Alternative full scale figure to **2D**. (B) Relative FSC cell size analysis of individual thymocyte populations reveals significantly increased cell sizes in all populations for SCL-LMO1 LK mice when compared to WT mice (n=4 mice per genotype). Alternative full scale figure to **4C**. (C) Combined data from **A** and **B** to show differential cell sizes in WT and SCL-LMO1 pre-LK and LK thymocyte populations. Data represents mean \pm SD. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.005$; **** $p \leq 0.001$. DN1-4: double-negative ($CD4^-CD8^-$) stage 1 ($CD25^-CD44^+$), 2 ($CD25^+CD44^+$), 3 ($CD25^+CD44^-$) and 4 ($CD25^-CD44^-$); ISP8: immature single-positive $CD8^+$ ($CD4^+CD8^{Low}$); DP: double-positive ($CD4^+CD8^+$).

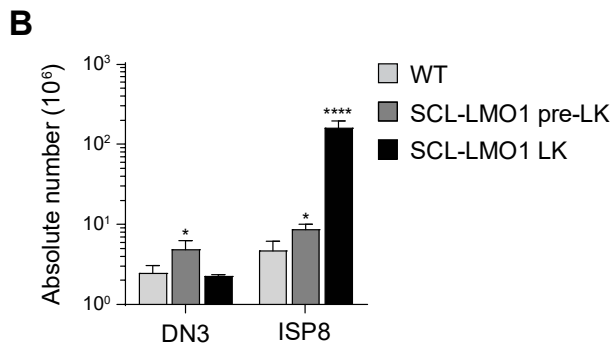
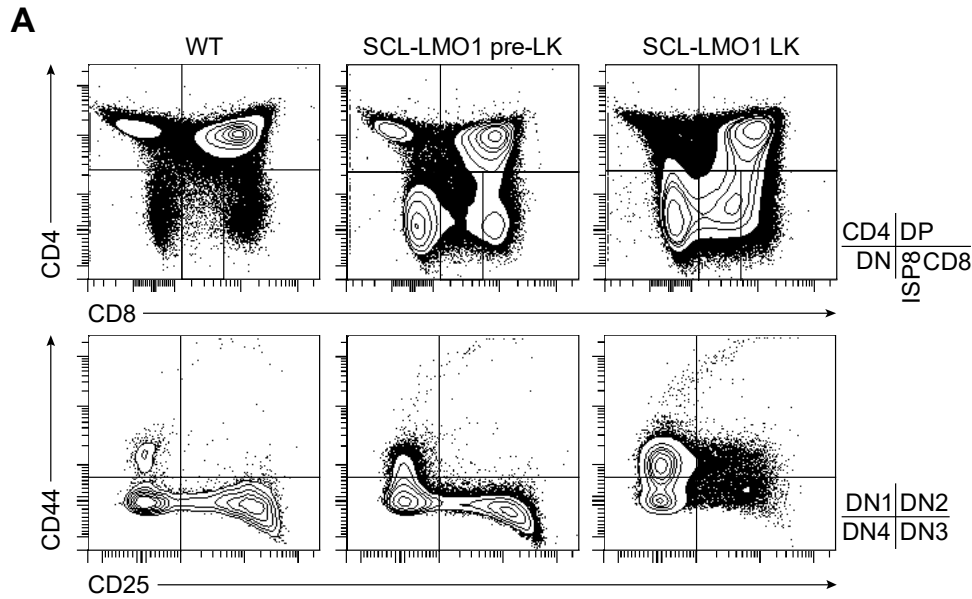


Figure S3. Increased protein synthesis in SCL-LMO1 pre-leukemic thymocytes correlates with release from DN3 differentiation blockage. (A) Flow cytometry analysis of the different thymocyte populations in wild type (WT), SCL-LMO1 pre-leukemic (pre-LK) and SCL-LMO1 leukemic (LK) mice. Data representative of n=4 mice per genotype. CD4: single-positive CD4⁺ (CD4⁺CD8⁻); DP: double-positive (CD4⁺CD8⁺); CD8: single-positive CD8⁺ (CD4⁻CD8⁺); ISP8: immature single-positive CD8⁺ (CD4⁻CD8^{Low}); DN1-4: double-negative (CD4⁻CD8⁻) stage 1 (CD25⁻CD44⁺), 2 (CD25⁺CD44⁺), 3 (CD25⁺CD44⁻) and 4 (CD25⁻CD44⁻). (B) Compared to WT mice, absolute numbers of DN3 and ISP8 thymocytes are increased in SCL-LMO1 pre-LK mice but ISP8 thymocytes are significantly expanded at the expense of DN3 thymocytes in SCL-LMO1 LK mice (n=4 mice per genotype). Data represents mean ± SD. * p≤0.05; ****p≤0.001.

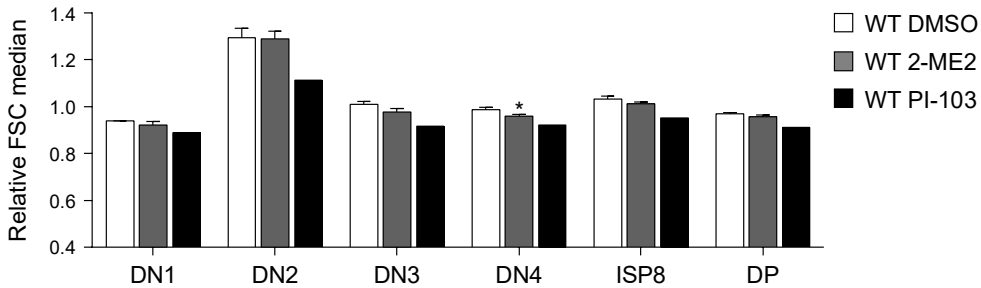
A

Figure S4. Ribosome and protein synthesis inhibitors do not significantly decrease cell size in wild type thymocytes. (A) 20-hour 2-methoxyestradiol (2-ME2; 1 μ M; n=2) and PI-103 (200 nM; n=1) treatments were performed on thymocyte pools from 9 WT mice per experiment. Post-treatment relative FSC cell size analysis of individual thymocyte populations shows no significant decreases in cell size for WT thymocytes. Y-axis cropped below 0.4 to highlight insignificant changes in cell size. Data represents mean \pm SD. * $p \leq 0.05$.

2.11 SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

2.11.1 5-fluorouracil treatment

5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/mL) (Sandoz) was diluted 1:3.5 in sterile PBS prior to injection. On day 0, mice were weighted and injected with an appropriate volume of diluted 5-FU to receive 115 mg/kg of body weight via intraperitoneal injection (Terumo), followed by a second injection on day 7. Mice that had lost weight between the first and second injections were discarded. On day 10, 5-FU-treated mice were transplanted with support cells via tail vein transplantation (10^5 compromised BM cells, details below). Antibiotics (Baytril, Bayer HealthCare) were administered in drinking water immediately after the support cell administration. Cages were changed every second day to reduce the risks of infections. For dose response experiment, 5-FU doses ranged from 50 to 135 mg/kg of body weight and performed as above. The IC_{50} was calculated with Prism (GraphPad Software) using a sigmoidal regression (variable slope).

2.11.2 Compromised bone marrow cells

Compromised bone marrow (BM) cells were prepared as described [1]. Briefly, Pep3^b (CD45.1⁺) mice were irradiated at 800 cGy and transplanted with 10^6 BM cells from the same

strain. Mice were kept at least one month prior to serving as a source of support cells for 5-FU-treated mice (CD45.2⁺). 5-FU-treated cells and support cells were discriminated based on CD45.2 and CD45.1 isoform respectively by flow cytometry.

2.12 SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Szilvassy, S.J., R.K. Humphries, P.M. Lansdorp, A.C. Eaves, and C.J. Eaves (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(22): p. 8736-40.

CHAPITRE 3 : DIMÉRISATION

Evolution of AF6-RAS Association and its Implications in Mixed-Lineage Leukemia

Matthew J. Smith^{1,2,*}, Elizabeth Ottoni¹, Noboru Ishiyama³, Marilyn Goudreault¹, André Haman¹, Claus Meyer⁵, Monika Tucholska⁴, Genevieve Gasmi-Seabrook³, Serena Menezes³, Rob C. Laister³, Mark D. Minden^{3,6}, Rolf Marschalek⁵, Anne-Claude Gingras^{4,7}, Trang Hoang^{1,8} and Mitsuhiro Ikura^{3,6,*}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal

³Campbell Family Cancer Research Institute, Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, Ontario, Canada

⁴Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada

⁵Institute of Pharmaceutical Biology, Goethe-University of Frankfurt, Frankfurt, Germany

⁶Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

⁷Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

⁸Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal

*Corresponding authors

Matthew J. Smith, Ph.D

Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC)

Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal

2950 Chemin de Polytechnique, Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

Pavillon Marcelle-Coutu, Rm 4306-11; Tel: (514) 343-5704

email: matthew.james.smith@umontreal.ca

Mitsuhiro Ikura, Ph.D.

Department of Medical Biophysics, University of Toronto

Division of Signaling Biology, Ontario Cancer Institute

101 College Street, Toronto, Ontario, Canada, M5G 1L7

MaRS, Toronto Medical Discovery Tower, Rm 4-804; Tel: (416) 581-7550

email: mikura@uhnres.utoronto.ca

Running Title: *RAS-AF6 Binding and its Association with MLL Translocation*

In preparation for submission

3.1 AUTHOR CONTRIBUTION

This project was conceived and designed by M.J.S. and M.I. M.J.S., E.O., N.I., M.G., A.H., S.M, and R.L. performed experiments and analyzed data. M.T. and G.G-S. supplied technical support and experimental assistance. C.M. and R.M. assembled and analyzed genomic sequencing data. M.M., A-C.G. and T.H. supervised experimental designs and analyzed data. The manuscript was prepared by M.J.S. and M.I., with input from N.I., M.M., A-C.G. and T.H.

3.2 ABSTRACT

Elucidation of activation mechanisms governing protein fusions is essential for therapeutic development. *MLL* undergoes rearrangement with numerous partners, including a recurrent translocation fusing the epigenetic regulator to a cytoplasmic RAS effector, AF6/afadin. We determine that AF6 employs a non-canonical, evolutionarily conserved α -helix to bind RAS, unique to AF6 and the classical RASSF effectors. Further, all patients with *MLL*-AF6 translocations express fusion proteins missing only this helix from AF6, resulting in exposure of hydrophobic residues that induce dimerization. We provide evidence that oligomerization is the dominant mechanism driving oncogenesis from rare *MLL* translocation partners, and employ our mechanistic understanding of *MLL*-AF6 to examine how dimers induce leukemia. Proteomic data resolve association of dimerized *MLL* with gene expression modulators, and inhibiting dimerization disrupts formation of these complexes while completely abrogating leukemogenesis in mice. Oncogenic gene translocations are thus selected under pressure from protein structure/function, underscoring the complex nature of chromosomal rearrangements.

3.3 INTRODUCTION

Chromosomal translocations arising from genomic instability result in gene fusions that drive an estimated 20% of human cancers, predominantly haematological malignancies [1]. Rearrangements of the mixed-lineage leukemia (*MLL*) gene result in acute myeloid and lymphoid leukemias in both adults and children, cancers associated with poor prognosis and which urgently require new therapeutic strategies [2]. *MLL* encodes a large histone methyltransferase involved in regulating expression of *HOX* genes [3]. Translocations of *MLL* in hematopoietic cells result in fusions comprising the N-terminal domain of *MLL* and a

C-terminal region encoded by myriad partner genes [4]. The divergent properties of fusion partners and the mechanism by which they activate MLL have been an area of intense study for over two decades, but how such a diverse set of partners are able to activate MLL epigenetic activity remains an open question.

The t(6;11)(q27;q23) chromosomal translocation fuses *MLL* to *AF6* [5], creating a fusion implicated in adult, pediatric and infant AML, pro-B ALL and adult T-ALL [6-10]. Expressed is a 334 kDa nuclear protein comprising the N-terminus of MLL and most of AF6 (**Fig. 1a**). A putative RAS GTPase effector, AF6 is unique amongst recurrent MLL partners in that it normally functions outside the nucleus at sites of cell-cell contact [11-14]. It has been proposed that AF6-mediated MLL activation is dependent on its first RAS association (RA) domain, and that this domain might self-associate [15]. Oligomerization of some other partners has been functionally implicated in MLL activation [16-20]. A separate model contends that loss of AF6 from membrane-proximal regions augments RAS signaling to alternative growth and differentiation effector pathways, leading to RAS-mediated cellular transformation [21].

Whether AF6 truly functions as a RAS effector is not known and there is no data indicating that RAS binding domains have any capacity to oligomerize. There also remains no mechanistic understanding of MLL-AF6 nor a biophysically defined system to investigate the properties of MLL dimerization. Here, we report the structure and mechanism behind AF6-RAS association and its unusual dependence on a highly conserved, auxiliary α -helix. These observations allowed for elucidation of RA1 dimerization *via* a unique mechanism. Structural insight to an MLL dimer-inducer allowed us to study the prevalence and role of MLL dimerization, including identification of associated proteins, sub-nuclear dynamics, the significance of *MLL* breakpoint positions, and that inhibiting dimerization completely blocks leukemogenesis.

3.4 RESULTS

3.4.1 AF6 association with RAS

We sought to determine whether AF6 is a true RAS effector and whether its RA1 domain is oligomeric. An evolutionary approach establishes AF6 amongst the most conserved RAS effectors. We performed BLAST analysis on predicted protein sequences from the primordial

metazoan *Trichoplax adhaerens*, one of the earliest multicellular organisms [22], using 52 RA domains from the human proteome (**Supplementary Fig. 1a**). Sequence conservation and domain organization identified seven remarkably conserved RAS effectors including: RAF, PI3K, RASSF, RASIP, RALGEF, GRB and AF6. The RA1 domain of *T. adhaerens* B3RXP4 shares 66% identity with human AF6 RA1, and secondary structure predictions suggested a $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ ubiquitin fold characteristic of RA domains [23]. Based on these conserved properties, we designed an *E. coli* expression construct and purified the AF6 RA1 domain (residues 37-136). Following assignment of $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ backbone resonances, we could corroborate the predicted secondary structure elements using chemical shift indices (CSI; **Supplementary Fig. 1b-c**). Importantly, we observed two distinct RA1 fractions during purification by size exclusion chromatography (**Fig. 1b**), verified as monomer and dimer by multi-angle light scattering (MALS; **Supplementary Fig. 2a**). Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to measure an affinity of AF6 RA1 for RAS-GMMPNP (**Fig. 2b**). The determined K_d of 17.8 μM is an order of magnitude weaker than most RA domains, accounting for the position of AF6 near the bottom of a RAS effector hierarchy [24]. These data establish AF6 as an effector, but do not explain its unusual propensity to dimerize.

To gain further insight to the structure and function of AF6 RA1 we solved a three dimensional structure of this domain complexed with RAS at 2.5Å resolution (**Fig. 1c** and **Supplementary Fig. 2c**). RAS and AF6 crystallized with 1:1 stoichiometry, and RA1 adopted the predicted ubiquitin fold topology. Further, RA1 presented the same pattern of protein-protein interaction observed in other effectors, an inter-protein β strand between $\beta 2$ of RA1 and the switch I region of RAS supported by an interaction with the C-terminus of $\alpha 1$ in the RA domain (**Fig. 1d**). Coordination of the binding interface by a Lys residue in $\beta 2$ is a conserved element of effector-RAS complexes, mediated by K58 in AF6. These structural data support our preliminary analysis and uphold AF6 as a RAS effector, but still could not resolve the low affinity of AF6-RAS binding or RA1 dimerization.

3.4.2 Detection of an αN helix

A search model used for refinement of the AF6-RAS structure was a complex between RASSF5/NORE1A and RAS (PDB 3DDC) [25]. Sequence alignments clustered AF6 RA1 with

the domains of RASSF1-6 (**Supplementary Fig. 1a**). The RASSF5 RA domain exhibits the archetypal ubiquitin fold, but its structure revealed an additional α -helix N-terminal to the core domain that mediates a non-canonical interaction with the switch II region of RAS [25]. Superposition of our AF6-RAS structure with RASSF5-RAS demonstrates the position of this auxiliary helix (designated α N; **Fig. 1e**). Secondary structure predictions on residues N-terminal to the RA1 domain of AF6 suggested an analogous helix (**Fig. 1f**). To resolve this, we purified a RA1 extended 30 amino acids at the N-terminus (residues 6-136). CSI analysis based on assigned $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ backbone resonances for this extended domain confirmed a helical segment aligned to AF6 residues 6-20 (**Fig. 2a** and **Supplementary Fig. 2d**). Using these data, we built a structure of the AF6-RAS complex with incorporated α N helix by homology modeling (**Fig. 2b**). At the interface are two residues from AF6 α N (Leu27/Phe28, corresponding to Cys220/Leu221 of RASSF5) that mediate an interaction with RAS switch II residues Ile36, Tyr64 and Met67. The Leu-Phe motif is completely conserved in AF6 orthologues (**Fig. 2c**), and we took advantage of this to functionally validate our model. We postulated that an extended AF6 RA1 domain would have increased affinity to RAS *via* the α N-switch II interface, and that mutation of the Leu-Phe motif would decrease affinity. Indeed, using ITC we obtained a K_d of 4.1 μM for α N-extended RA1, 4-fold tighter than the core RA1 domain (**Fig. 2d** and **Supplementary Fig. 3a**). Mutation of AF6 residues Leu-Phe to negatively charged aspartate completely disrupted the interaction (**Supplementary Fig. 3b**). These results support our structural model and functionally correlate α N with RAS binding. They also explain the inability of AF6 RA1 to compete with other RAS effectors [24], as the canonical domain lacks the auxiliary α -helix required for a high affinity interaction.

To determine the distribution of α N in RAS effectors, we performed a comprehensive analysis of residues N-terminal to β 1 in 52 human RA domains. Secondary structure predictions determine that AF6 and the RA domains of RASSF1-6 are the only RAS effectors with α N (**Supplementary Fig. 3c**). RIN1 and ARAP have α -helices N-terminal to α 1 that are components of preceding domains (VPS9 and GAP, respectively). PI3K domains have several short helices, evident in a PI3K-RAS structure [26], but these do not contact the RAS G domain. RAPH1 and RAIM have N-terminal helices that function as coiled-coils, analogous to

Lamellipodin [27]. Thus, we propose that AF6 and RASSF1-6 are the only RA domains that bind RAS *via* the non-canonical switch II interface.

To substantiate the position of α N we used two NMR approaches. First, a 31 residue fragment encompassing the α -helix (AF6 6-36, which displays α -helical propensity) was titrated into ^{15}N -AF6 RA1. We observed exchange broadening of residues in $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQCs corresponding to sequential segments in the β 1, β 2 and α 2 regions of RA1, overlapping completely with our α N model (**Supplementary Fig. 4a-c**). In a second approach, we assessed combined chemical shift differences (Δ ppm) of backbone $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ resonances from the core RA1 domain versus the α N-extended domain (**Supplementary Fig. 4d**), a direct evaluation of α N-mediated rearrangements in RA1. We observed substantial Δ ppm values generated by α N incorporated in *cis* correspond exactly with CSPs induced by α N in *trans* (**Fig. 2e**). These data validate position of the α N-helix, and reveal how functional evolution of the helix imparts a distinct mode of RAS recognition dependent on a structural component not present in other effectors.

3.4.3 Insertion of α N blocks leukemogenesis

The *MLL-AF6* translocation generates an MLL fusion with AF6 residues 36-1651, truncating only 35 residues comprising the α N helix (**Fig. 1a**). In contrast to core RA1 (37-136; **Fig. 1b**), we observed just a single monomer fraction during purification of α N-extended RA1 (**Fig. 3a**). This suggested that loss of α N in MLL-AF6 may be responsible for its dimerization *via* RA1. To examine this, we employed blue native PAGE (BN-PAGE) [28] to resolve oligomeric states for RA1 and the α N-extended domain. At 150 μM these proteins present clearly distinct dimerization capacities (**Fig. 3b**). RA1 displays two uniform bands, monomer and dimer, while α N-RA1 was almost completely monomeric. α N-RA1 also displayed increased thermal stability (**Fig. 3c**). α N is coded by exon 1 in the *AF6* gene, followed by a long intron 1, with the remaining domain coded by exons 2 and 3 (**Fig. 3d**). This organization is completely conserved in *T. adhaerens*, substantiating the importance of α N to AF6 function by its robust evolutionary conservation. Thus, dimerization of MLL-AF6 results from loss of the AF6 α N helix, which has been necessarily retained to facilitate RAS binding.

We sought to determine the mechanism of RA1 dimerization resulting from truncation of α N.

Structural analysis revealed several residues in RA1 would be exposed upon loss of α N (**Fig. 3e**), primarily hydrophobic residues at the α N-RA1 interface (Phe39, Gly41, Val42, Leu111, Val112, Leu115, and positively charged Arg61). We hypothesized that exposure of these residues would generate a hydrophobic patch nucleating dimerization, and systematically mutated them to aspartate (37-136). BN-PAGE showed F39D or V42D mutations collapse distinctive monomer-dimer bands to a single monomeric band (**Fig. 3f**). Mutations to distal sites or the α 2-helix retained monomer-dimer equilibrium. While these data elucidate a mechanism for the single described *MLL-AF6* translocation [8], we considered whether this was characteristic. We determined *AF6* breakpoints using sequencing data from 62 patients possessing *MLL-AF6* translocations (**Fig. 3g**). 60 of these patients had breakpoints within intron 1. The two remaining breakpoints are spliced *MLL* partners [29] located upstream of *AF6* exon 1, which also generate fusions lacking only α N. Thus, all 62 patients express MLL-AF6 with only α N deleted, supporting a protein-selection determinant of leukemogenesis.

To directly address this, we used three approaches to assess whether reinsertion of α N between MLL and AF6 would disrupt its leukemogenic activity (**Fig. 4a**). Retroviral constructs were generated to express MLL fused to AF6 RA1 dimer (37-136) or α N/RA1 monomer (6-136). MLL-AF6^{NCR} (N-terminal conserved region, 35-348), equally leukemogenic as MLL-AF6 [15], was used as a positive control and the vector and AF6^{NCR} alone (35-314) as negative controls (**Supplementary Fig. 5a-c**). Cumulative growth curves of transduced primary mouse bone marrow (BM) cells revealed MLL-AF6^{NCR} and MLL-RA1 expressing cells in logarithmic growth, whereas MLL- α N/RA1 cells were indistinguishable from controls (**Supplementary Fig. 5d**). In serial replating assays, expression of MLL fused with AF6^{NCR} or RA1 conferred immortalization to myeloid progenitors while MLL- α N/RA1 did not (**Fig. 4b**). Morphologically, cells immortalized by either MLL-AF6^{NCR} or MLL-RA1 grew in compact blast colonies (CFU-blast) while MLL- α N/RA1 resembled control cultures (**Fig. 4c**). The total numbers of CFU-blasts expanded $\sim 10^9$ fold over 3 replatings, indicating that dimerized MLL-AF6 drives a robust self-renewal. The expansion of CFU-blasts occurred at the expense of multipotent progenitors (CFU-GEMM, **Supplementary Fig. 5e**) which were present in control cultures but absent from all experimental groups on first replating. Introducing α N to block dimerization completely abrogated self-renewal activity. Finally, transduced BM cells

were transplanted into 8-12 week old irradiated mice to determine oncogenic potential. All mice transplanted with MLL-AF6^{NCR} or MLL-RA1 were leukemic five weeks after transplantation. There was a 93-95% invasion of the bone marrow and peripheral blood by donor-derived cells which were exclusively myeloblasts (**Supplementary Fig. 5g**). The myeloid/lymphoid (M/L) ratio was 73-74 on average for MLLAF6^{NCR} or MLL-RA1, compared to the expected M/L ratio of 5 in control groups. Therefore, our observations are consistent with the myeloid bias enforced by the oncogene, which was remarkably restored to near-normal by α N. Moreover, re-insertion of α N brought reconstitution down to control levels observed with the empty vector (**Fig. 4d**). Mice receiving MLL- α N/RA1 cells were non-leukemic at 5 weeks and these mice remained leukemia-free out to 10 weeks. Finally, a hallmark of leukemic transformation is the capacity to re-induce AML in serial transplantation. We therefore re-transplanted MLL-AF6^{NCR} or MLL-RA1 expressing bone marrow cells into secondary and tertiary recipients (**Supplementary Fig. 5f**). In both secondary and tertiary transplantation, mice from both groups developed rapid and invasive myeloid leukemias that spread to the thymus and secondary lymphoid organs within one month (**Fig. 4e** and **Supplementary Fig. 5h**). Together, these results demonstrate that MLL-AF6-induced leukemogenesis critically depends on RA1 dimerization triggered by deletion of α N, a recurring structural determinant observed in all 62 MLL-AF6 translocations. This validates our biochemical data and confirms that truncation of the α N helix at the MLL-AF6 interface is critical for MLL activation.

3.4.4 Interactors of AF6-induced MLL dimers

Besides *AF6*, the five most common *MLL* translocation partners encode nuclear proteins that regulate gene expression (*AF4*, *AF9*, *AF10*, *ENL*, *ELL*) [4]. Their fusion to MLL results in activation of transcription and epigenetic processes consistent with their intrinsic biological functions, compartmentalization and interaction networks [16, 30-33]. It is not known if dimer-induced activation of MLL could invoke similar pathways. To resolve this, we sought to exploit the capacity for α N to inhibit dimerization and identify proteins interacting specifically with MLL dimers. We first built a comprehensive MLL interactome using available proteomic data (**Supplementary Table 1**). The interactome comprises four key complexes, specifically: DotCom, super elongation complex (SEC), polycomb repressive complex (PRC) and WDR5

(**Supplementary Fig. 6a**). As MLL fusions are large nuclear proteins, we choose not to use standard affinity-based proteomics but a proximity biotinylation assay called BioID [34]. MLL baits were fused with a mutant biotin ligase (BirA*) that covalently modifies preys in living cells and permits identification of proximal proteins. Our baits included the N-terminal region of MLL alone (MLLN), MLL-AF6 RA1 dimer (37-137), or MLL-AF6 α N/RA1 monomer (6-136). We filtered data from two biological replicates with SAINT [35], identifying 199 high-confidence bait-prey relationships (**Supplementary Table 2**). Gene ontology (GO) annotation of the global data set indicates MLLN, MLL-RA1 and MLL- α N/RA1 associate primarily with RNA processing and ribosomal proteins in the nucleolus (**Fig. 5a**), but also with transcription and chromatin modifying proteins in the nucleoplasm. This is consistent with a nuclear localization of MLL-AF6 [5] and detection of other MLL partners at subnuclear foci [36]. As we were predominantly interested in monomer/dimer-specific partners, we filtered preys biotinylated specifically by monomeric MLLN and MLL- α N/RA1, or by dimeric MLL-RA1 (**Fig. 5b-c**). Dimers exclusively associated with nucleoplasm proteins, whereas monomeric-exclusive partners were nucleolar. We enriched these interaction sets with data from iRefIndex [37] (**Supplementary Table 3**). The resulting diagram shows two clearly distinct interaction networks, one specific to monomeric MLLN and MLL- α N/RA1, and another to dimeric MLL-RA1 (**Fig. 6a**). Significantly, the MLL dimer network contains two complexes from the interactome: components of SEC and DotCom. The central component of DotCom, DOT1L, is known to play a vital role in MLL-AF6 leukemogenesis [38, 39]. To validate these interactions we performed immunoprecipitations of the MLL fusion proteins followed by Western blotting for endogenous binding partners (**Fig. 6b**). All proteins encompassing the N-terminal half of MLL co-precipitated the tumour suppressor MENIN, known to directly bind MLLN [40, 41] and uniformly identified by BioID, but only full length MLL-AF6 and MLL-RA1 bound the DotCom components DOT1L and AF17. Insertion of α N between MLL and AF6 completely abrogated these interactions. Collectively, our results establish that MLL shuttles between the nucleolus and nucleoplasm, and that dimerization of MLL imparts a capacity to interact with key mediators of gene expression.

3.4.5 MLL breakpoint positions

Having mechanistic knowledge of MLL-AF6 activation, we sought to answer an outstanding question concerning breakpoint positions within *MLL*. Patient sequence data confirmed *AF6* translocations occurred within the 8.5 kb *MLL* breakpoint cluster region (BCR; **Fig. 7a**). Nearly all *AF6* breakpoints map to *MLL* intron 9, highly unusual for recurrent fusion partners that typically demonstrate a uniform distribution (**Fig. 7b**). A standard explanation for this is genetic complementation of expansion elements [42], but analysis of mobile and repeat elements indicated the majority of *MLL-AF6* breakpoints actually occur outside mobile elements (**Supplementary Table 4**). We considered instead that protein function might drive the unusual breakpoint distribution. Amino acids coded by *MLL* exons 9-11 vary widely in hydrophobicity (**Supplementary Fig. 6b**). The frequent AF6 fusion with residues coded by *MLL* exon 9 would place a small number of hydrophobic residues adjacent to RA1, but fusion to exons 10 or 11 would generate a hydrophobic interface that may affect dimerization. We assessed this using BN-PAGE of RA1 N-terminally extended by residues coded by *MLL* exons 9 or 10 (**Fig. 7c**). Exon9-RA1 demonstrated monomer-dimer equilibrium, but the exon10-RA1 fusion was monomeric. Exon11-RA1, highly infrequent in our patient data set, proved completely insoluble under a variety of expression and purification conditions. These data explain that the abnormal distribution of *MLL* breakpoints in *AF6* translocations is favoured by a protein functional mechanism rather than a genetic determinant.

Extensive work has gone towards rationalizing partners in the *MLL* recombinome. While fusion to proteins capable of oligomerization can activate MLL [16-20], it is not known if this is a dominant mechanism that could explain the numerous infrequent translocations. We therefore used bioinformatics to assess whether 56 MLL partners [4] had oligomerization potential. 20 of these were annotated as nuclear proteins, which we excluded due to potentially distinct mechanisms (i.e. binding to gene expression modulators). We then performed predictions for coiled coils within the remaining 36 partners, 20 of which contained high confidence coiled coil regions that follow MLL breakpoints (**Supplementary Table 5** and **Supplementary Fig. 7a**). Overall, MLL partners were 5-fold more likely to contain coiled coil regions than a set of randomly selected proteins (**Supplementary Table 6**). 9 of the 16 partners with no coiled coils

contain oligomerization domains, and another 5 C-terminal SH3 domains with dimerization potential (**Supplementary Table 7** and **Supplementary Fig. 7b-c**). Thus, 34/36 MLL partner proteins can oligomerize (**Fig. 7d**). MLL fusion with one remaining partner, BTBD18, truncates a modular domain (**Supplementary Fig. 7d**) [43] and fuses MLL with a small helix-turn-helix comprising a hydrophobic patch (**Fig. 7e** and **Supplementary Fig. 6c**). We postulated that exposure of these residues may function analogously to AF6 RA1, and generated a fusion of BTBD18 residues 97-134 with a RAS binding domain from ARAF that is intrinsically monomeric (**Supplementary Fig. 6d**). BN-PAGE presents two distinct fractions, indicative of a monomer-dimer equilibrium precipitated by addition of the BTBD18 residues (**Fig. 7f**). Therefore, dimerization mediated by exposure of hydrophobic core residues is a novel and conserved MLL activation mechanism, joining oligomerization *via* coiled coils or modular domains to rationalize nearly all non-nuclear partners in the MLL recombinome. The final common genetic anomaly driving *MLL* leukemias is a partial tandem gene duplication (PTD) that produces a fusion of two MLL N-termini [44], effectively replicating dimerization.

3.5 DISCUSSION

To begin conceptualizing how genetic abnormalities drive individual cancers, we must understand the complex molecular function of gene products. For *MLL*-driven leukemias this has required analysis of numerous, seemingly random fusion partners. Here we provide a molecular mechanism of MLL activation resulting from its fusion with AF6, and evidence that oligomerization is a universal property of MLL partners normally localized outside the nucleus. Such gain-of-function fusions likely mimic oligomerization modulated intrinsically by the MLL PHD fingers [45], encoded immediately downstream of the *MLL* BCR and thus absent in fusion proteins. Our proteomics data indicate that dimerized MLL recruits a network of protein complexes analogous to direct fusion of MLL with transcriptional activators. We demonstrate that MLL-AF6 physically complexes with DOT1L, the first demonstration that MLL dimers do so and an explanation for why DOT1L inhibitors have efficacy in MLL-AF6-driven leukemias. This implies that targeting the DOT1L [38, 39, 46] may have efficacy for all MLL dimer-driven leukemias. Alternatively, we show that disruption of dimerization inhibits leukemogenesis, and by extension individual dimer interfaces should serve as targets for molecular therapy.

The functional mechanisms governing MLL-AF6 activation exemplify the complex nature of chromosomal rearrangements. α N plays a vital role in the association of AF6 with RAS, making it indispensable from an evolutionary standpoint. Between the α N coding exon and those encoding the remaining RA1 domain is intron 1, which has expanded from 5.6 kb in *T. adhaerens* to 37.3 kb in humans. Such intron expansion is characteristic of higher order genomes, and our data illustrate the potential deleterious effects this could have on fitness. Further, it is interesting to consider how frequently chromosomal translocations must occur to generate gain-of-function MLL fusion proteins with regularity, as only exposure of hydrophobic residues at α N interface provides transformative capacity in the context of MLL-AF6. Fusions occurring downstream of *AF6* intron 1, should they occur, would not confer growth advantages and are therefore not found in clinical samples. Finally, the activation mechanism illustrated here might itself be quite informative from the standpoint of protein domain evolution. Rather than a slow Darwinian accumulation of point mutations being necessary to connect a new structural element to an existing globular domain [47], it is possible that gene fusions can achieve this instantly [48]. Moreover, oligomerization is an important driver of new protein function including assembly of novel complexes [49, 50], and this seems simply accomplished by exposure of hydrophobic core residues. Our data thus have implications for numerous acute leukemias, identify a subset of RAS effectors which bind *via* a non-canonical mechanism, and have implications for evolutionary aspects of protein function.

3.6 MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs and antibodies, Purification of recombinant proteins, Cell culture and immunoprecipitation, Proteomics and aspects of the *in vivo* analysis are described in Supplementary methods.

3.6.1 NMR spectroscopy

NMR data were recorded at 25°C on an 800 MHz Bruker AVANCE II spectrometer equipped with a 5 mm TCI CryoProbe, or a 600 MHz Bruker UltraShield spectrometer with 1.7 mm CryoProbe. NMR samples were prepared in buffer containing 20 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂ and 10% D₂O unless otherwise noted. Two-dimensional

$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra [51] as well as triple resonance HNCACB [52] and CBCACONH [53] spectra were collected for the backbone chemical-shift assignments. Spectra were processed with NMRPipe [54] and analyzed using NMRView [55].

3.6.2 Biochemical and biophysical protein analysis

AF6 RA domain interactions with GMPPNP-loaded RAS were measured using a Microcal VP-ITC instrument. Stock solutions were diluted into filtered and degassed 20 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 and 1 mM DTT. Experiments were carried out at 25°C. Heats of dilution were determined from control experiments in which RA domains were titrated into buffer alone plus 500 μM GMPPNP. Data were fitted using the software Origin 7 (Microcal). Far-UV circular dichroism (CD) data were collected using a Jasco J-815 CD spectrometer (Jasco/Folio Instruments) with 0.1 cm path length ES quartz cuvettes, wavelength scan rates at 20 nm min^{-1} , a response time of 8 sec and bandwidth of 1 nm. Spectra were corrected for buffer contributions. Thermal melts were acquired in 1°C increments at a scan rate of 1°C min^{-1} . Light scattering measurements were made with a Dynapro DLS module (Wyatt Technologies) using a scattering angle of 90° and incident laser light of 825 nm. Blue native (BN) PAGE was carried out as described [28], using 15% acrylamide gels for separating RA domains. Proteins were purified by size exclusion chromatography and concentrated to 100-150 μM for BN-PAGE analysis.

3.6.3 Crystallography

Crystals of AF6 RA1 (37-136) bound to RAS were obtained by incubating purified RA1 monomer fraction (450 μM) and GMPPNP-loaded RAS (450 μM) against a crystallization solution (20 mM K_2HPO_4 , 18% (w/v) PEG-3350) by vapor diffusion at 25°C. Crystals could not be obtained under the same conditions using $\alpha\text{N}/\text{RA1}$ (6-136) and RAS. Crystals were soaked in crystallization solution containing 25% glycerol for data collection at 100 K. Diffraction data were collected at the Advanced Photon Source beamline 19 (Argonne National Laboratory, Argonne, IL) and processed with HKL2000 [56]. Statistics pertaining to the diffraction data are in **Supplementary Fig. 2c**. The structure was determined at 2.5Å resolution. The structure was solved by molecular replacement using the structure of RASSF5 RA domain

complexed with RAS (PDB 3DDC) [25] as a search model. The final models were generated by successive rounds of refinement using PHENIX [57] accompanied by manual model building with Coot [58]. Modelling of the AF6 RA1 α N-helix was done using Coot and the RASSF5-RAS structure. Molecular graphics representations were prepared using PyMOL.

3.6.4 *In vivo* oncogenic potential of MLL-AF6

For gene transfer into BM cells, pMSCV constructs consisting of in-frame fusions between MLL and various protein partners (MSCV, -Flag-AF6^{NCR}, -MLL-AF6^{NCR}, -MLL-AF6^{RA1}, -MLLAF6 ^{α N/RA1}) were used to produce high-titer, helper-free recombinant retroviruses by transduction of the GP+E86 retroviral packaging cell line (ATCC) with VSV-G-pseudotyped MSCV particles [59]. Twelve-week-old C57BL/6J mice were injected IP with 150 mg/kg 5-Fluorouracil (5-FU; Sigma) and bone marrow cells were harvested 4 days later for gene transfer. Briefly, cells were resuspended at 10^6 cells/mL in Iscove modified Dulbecco's medium (IMDM; Gibco) supplemented with 15% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 ng/mL stem cell factor (SCF), 100 ng/mL IL-11, 10 ng/mL IL-6, 10 ng/mL thrombopoietin and 50 mM α -monothioglycerol (Sigma). Cells were then cocultured on irradiated (1500 cGy) virus-producing GP+E86 cells in the presence of polybrene (0.8 μ g/mL; Sigma-Aldrich) for 48 hours as described [60]. RT-PCR analysis to confirm expression was performed by extracting whole RNA (Qiagen) and generating cDNA with reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT) (Invitrogen). PCR was done using a forward primer specific for sequence encoding the C-terminus of MLL, and reverse primers specific for sequence encoding the AF6 α N (for MLL- α N/RA1), the AF6 RA1 domain (for MLL-RA1) or the AF6 RA2 domain (for MLL-AF6^{NCR}). For Flag-AF6^{NCR}, the same reverse primer was used with a forward primer in pMSCV.

For the transplantation assays, eight to twelve-week-old recipient B6.SJK-*Ptprc*^a *Pep3*^b/BoyJ (CD45.1⁺) mice were irradiated at 800 cGy and transplanted with 2×10^5 retrovirally infected total BM (CD45.2⁺) cells in conjunction with a life-sparing dose of host (CD45.1⁺) total BM (5×10^4) cells [60, 61]. Engraftment (donor-derived CD45.2⁺ cells) was assessed by flow cytometry analysis of peripheral blood, bone marrow, spleen and thymus 5 weeks after transplantation using lineage specific antibodies: Gr-1, CD11b (myeloid cells), B220 (B cells), Thy1.2 (T cells), and CD71 (erythroid precursors).

3.7 ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Cancer Research Society (CRS, to M.I., T.H. and A.-C.G.), the Canadian Cancer Society Research Institute (CCSRI, to M.I., T.H. and A.-C.G.) and the Princess Margaret Hospital Foundation (to M.I.). T.H. is also supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), the Leukemia Lymphoma Society (LLS) of Canada, the National Science and Engineering Council of Canada (NSERC), the MERST Québec and Fonds de Recherche du Québec (FRQ)-Nature et Technologie. A.-C.G. is supported by a CIHR Foundation grant. DFG-Grant MA1876/11-1 supported the contribution of C.M and R.M. M.J.S. was the recipient of a Canadian Breast Cancer Foundation Fellowship and an Ontario Cancer Institute Knudson Postdoctoral Fellowship. E.O. received a CIHR studentship. M.I. and A.-C.G. hold Canada Research Chairs in Cancer Structural Biology and in Functional Proteomics. The infrastructure of IRIC is supported in part by a group grant from FRQ-Santé. The Canada Foundation for Innovation funded the 800- and 600-MHz NMR spectrometers and the mass spectrometers.

3.8 REFERENCES

1. Mitelman, F., B. Johansson, and F. Mertens (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. **7**(4): p. 233-45.
2. Muntean, A.G. and J.L. Hess (2012). The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu Rev Pathol*. **7**: p. 283-301.
3. Milne, T.A., S.D. Briggs, H.W. Brock, M.E. Martin, D. Gibbs, C.D. Allis, and J.L. Hess (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell*. **10**(5): p. 1107-17.
4. Meyer, C., J. Hofmann, T. Burmeister, D. Groger, T.S. Park, M. Emerenciano, M. Pombo de Oliveira, A. Renneville, P. Villarese, E. Macintyre, H. Cave, E. Clappier, K. Mass-Malo, J. Zuna, J. Trka, E. De Braekeleer, M. De Braekeleer, S.H. Oh, G. Tsaur, L. Fechina, V.H. van der Velden, J.J. van Dongen, E. Delabesse, R. Binato, M.L. Silva, A. Kustanovich, O. Aleinikova, M.H. Harris, T. Lund-Aho, V. Juvonen, O. Heidenreich, J. Vormoor, W.W. Choi, M. Jarosova, A. Kolenova, C. Bueno, P. Menendez, S. Wehner, C. Eckert, P. Talmant, S. Tondeur, E. Lippert, E. Launay, C. Henry, P. Ballerini, H. Lapillone, M.B. Callanan, J.M. Cayuela, C. Herbaux, G. Cazzaniga, P.M. Kakadiya, S. Bohlander, M. Ahlmann, J.R. Choi, P. Gameiro, D.S. Lee, J. Krauter, P. Cornillet-Lefebvre, G. Te Kronnie, B.W. Schafer, S. Kubetzko, C.N. Alonso, U. zur Stadt, R. Sutton, N.C. Venn, S. Izraeli, L. Trakhtenbrot, H.O. Madsen, P. Archer, J. Hancock, N. Cerveira, M.R. Teixeira, L. Lo Nigro, A. Moricke, M. Stanulla, M. Schrappe, L. Sedek, T. Szczepanski, C.M. Zwaan, E.A. Coenen, M.M.

- van den Heuvel-Eibrink, S. Strehl, M. Dworzak, R. Panzer-Grumayer, T. Dingermann, T. Klingebiel, and R. Marschalek (2013). The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. **27**(11): p. 2165-76.
5. Joh, T., K. Yamamoto, Y. Kagami, H. Kakuda, T. Sato, T. Yamamoto, T. Takahashi, R. Ueda, K. Kaibuchi, and M. Seto (1997). Chimeric MLL products with a Ras binding cytoplasmic protein AF6 involved in t(6;11) (q27;q23) leukemia localize in the nucleus. *Oncogene*. **15**(14): p. 1681-7.
 6. Akao, Y. and M. Isobe (2000). Molecular analysis of the rearranged genome and chimeric mRNAs caused by the t(6;11)(q27;q23) chromosome translocation involving MLL in an infant acute monocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. **27**(4): p. 412-7.
 7. Martineau, M., R. Berger, D.M. Lillington, A.V. Moorman, and L.M. Secker-Walker (1998). The t(6;11)(q27;q23) translocation in acute leukemia: a laboratory and clinical study of 30 cases. EU Concerted Action 11q23 Workshop participants. *Leukemia*. **12**(5): p. 788-91.
 8. Tanabe, S., N.J. Zeleznik-Le, H. Kobayashi, C. Vignon, R. Espinosa, 3rd, M.M. LeBeau, M.J. Thirman, and J.D. Rowley (1996). Analysis of the t(6;11)(q27;q23) in leukemia shows a consistent breakpoint in AF6 in three patients and in the ML-2 cell line. *Genes Chromosomes Cancer*. **15**(4): p. 206-16.
 9. Hayette, S., I. Tigaud, V. Maguer-Satta, L. Bartholin, X. Thomas, C. Charrin, M. Gadoux, J.P. Magaud, and R. Rimokh (2002). Recurrent involvement of the MLL gene in adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **99**(12): p. 4647-9.
 10. Poirel, H., K. Rack, E. Delabesse, I. Radford-Weiss, X. Troussard, C. Debert, D. Leboeuf, C. Bastard, F. Picard, A. Veil-Buzyn, G. Flandrin, O. Bernard, and E. Macintyre (1996). Incidence and characterization of MLL gene (11q23) rearrangements in acute myeloid leukemia M1 and M5. *Blood*. **87**(6): p. 2496-505.
 11. Beaudoin, G.M., 3rd, C.M. Schofield, T. Nuwal, K. Zang, E.M. Ullian, B. Huang, and L.F. Reichardt (2012). Afadin, a Ras/Rap effector that controls cadherin function, promotes spine and excitatory synapse density in the hippocampus. *J Neurosci*. **32**(1): p. 99-110.
 12. Sawyer, J.K., N.J. Harris, K.C. Slep, U. Gaul, and M. Peifer (2009). The Drosophila afadin homologue Canoe regulates linkage of the actin cytoskeleton to adherens junctions during apical constriction. *J Cell Biol*. **186**(1): p. 57-73.
 13. Sato, T., N. Fujita, A. Yamada, T. Ooshio, R. Okamoto, K. Irie, and Y. Takai (2006). Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. **281**(8): p. 5288-99.
 14. Yamamoto, T., N. Harada, Y. Kawano, S. Taya, and K. Kaibuchi (1999). In vivo interaction of AF-6 with activated Ras and ZO-1. *Biochem Biophys Res Commun*. **259**(1): p. 103-7.
 15. Liedtke, M., P.M. Ayton, T.C. Somerville, K.S. Smith, and M.L. Cleary (2010). Self-association mediated by the Ras association 1 domain of AF6 activates the oncogenic potential of MLL-AF6. *Blood*. **116**(1): p. 63-70.
 16. Martin, M.E., T.A. Milne, S. Bloyer, K. Galoian, W. Shen, D. Gibbs, H.W. Brock, R. Slany, and J.L. Hess (2003). Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell*. **4**(3): p. 197-207.

17. Eguchi, M., M. Eguchi-Ishimae, and M. Greaves (2004). The small oligomerization domain of gephyrin converts MLL to an oncogene. *Blood*. **103**(10): p. 3876-82.
18. Ono, R., H. Nakajima, K. Ozaki, H. Kumagai, T. Kawashima, T. Taki, T. Kitamura, Y. Hayashi, and T. Nosaka (2005). Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis. *J Clin Invest*. **115**(4): p. 919-29.
19. Hsu, K. and A.T. Look (2003). Turning on a dimer: new insights into MLL chimeras. *Cancer Cell*. **4**(2): p. 81-3.
20. So, C.W., M. Lin, P.M. Ayton, E.H. Chen, and M.L. Cleary (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell*. **4**(2): p. 99-110.
21. Manara, E., E. Baron, C. Tregnago, S. Aveic, V. Bisio, S. Bresolin, R. Masetti, F. Locatelli, G. Basso, and M. Pigazzi (2014). MLL-AF6 fusion oncogene sequesters AF6 into the nucleus to trigger RAS activation in myeloid leukemia. *Blood*. **124**(2): p. 263-72.
22. Ringrose, J.H., H.W.P. van den Toorn, M. Eitel, H. Post, P. Neerinx, B. Schierwater, A.F. Maarten Altelaar, and A.J.R. Heck (2013). Deep proteome profiling of *Trichoplax adhaerens* reveals remarkable features at the origin of metazoan multicellularity. *Nature Communications*. **4**: p. 1408.
23. Mott, H.R. and D. Owen (2015). Structures of Ras superfamily effector complexes: What have we learnt in two decades? *Crit Rev Biochem Mol Biol*. **50**(2): p. 85-133.
24. Smith, M.J. and M. Ikura (2014). Integrated RAS signaling defined by parallel NMR detection of effectors and regulators. *Nat Chem Biol*. **10**(3): p. 223-30.
25. Stieglitz, B., C. Bee, D. Schwarz, O. Yildiz, A. Moshnikova, A. Khokhlatchev, and C. Herrmann (2008). Novel type of Ras effector interaction established between tumour suppressor NORE1A and Ras switch II. *EMBO J*. **27**(14): p. 1995-2005.
26. Pacold, M.E., S. Suire, O. Perisic, S. Lara-Gonzalez, C.T. Davis, E.H. Walker, P.T. Hawkins, L. Stephens, J.F. Eccleston, and R.L. Williams (2000). Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell*. **103**(6): p. 931-43.
27. Chang, Y.C., H. Zhang, M.L. Brennan, and J. Wu (2013). Crystal structure of Lamellipodin implicates diverse functions in actin polymerization and Ras signaling. *Protein Cell*. **4**(3): p. 211-9.
28. Wittig, I., H.P. Braun, and H. Schagger (2006). Blue native PAGE. *Nat Protoc*. **1**(1): p. 418-28.
29. Meyer, C., T. Burmeister, S. Strehl, B. Schneider, D. Hubert, O. Zach, O. Haas, T. Klingebiel, T. Dingermann, and R. Marschalek (2007). Spliced MLL fusions: a novel mechanism to generate functional chimeric MLL-MLLT1 transcripts in t(11;19)(q23;p13.3) leukemia. *Leukemia*. **21**(3): p. 588-90.
30. Biswas, D., T.A. Milne, V. Basrur, J. Kim, K.S. Elenitoba-Johnson, C.D. Allis, and R.G. Roeder (2011). Function of leukemogenic mixed lineage leukemia 1 (MLL) fusion proteins through distinct partner protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(38): p. 15751-6.
31. Monroe, S.C., S.Y. Jo, D.S. Sanders, V. Basrur, K.S. Elenitoba-Johnson, R.K. Slany, and J.L. Hess (2011). MLL-AF9 and MLL-ENL alter the dynamic association of

- transcriptional regulators with genes critical for leukemia. *Exp Hematol.* **39**(1): p. 77-86 e1-5.
32. Mueller, D., C. Bach, D. Zeisig, M.P. Garcia-Cuellar, S. Monroe, A. Sreekumar, R. Zhou, A. Nesvizhskii, A. Chinnaiyan, J.L. Hess, and R.K. Slany (2007). A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood.* **110**(13): p. 4445-54.
 33. Okuda, H., M. Kawaguchi, A. Kanai, H. Matsui, T. Kawamura, T. Inaba, I. Kitabayashi, and A. Yokoyama (2014). MLL fusion proteins link transcriptional coactivators to previously active CpG-rich promoters. *Nucleic Acids Res.* **42**(7): p. 4241-56.
 34. Roux, K.J., D.I. Kim, M. Raida, and B. Burke (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.* **196**(6): p. 801-10.
 35. Teo, G., G. Liu, J. Zhang, A.I. Nesvizhskii, A.C. Gingras, and H. Choi (2014). SAINTexpress: improvements and additional features in Significance Analysis of INTeractome software. *J Proteomics.* **100**: p. 37-43.
 36. Erfurth, F., C.S. Hemenway, A.C. de Erkenez, and P.H. Domer (2004). MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia.* **18**(1): p. 92-102.
 37. Razick, S., G. Magklaras, and I.M. Donaldson (2008). iRefIndex: a consolidated protein interaction database with provenance. *BMC Bioinformatics.* **9**: p. 405.
 38. Deshpande, A.J., L. Chen, M. Fazio, A.U. Sinha, K.M. Bernt, D. Banka, S. Dias, J. Chang, E.J. Olhava, S.R. Daigle, V.M. Richon, R.M. Pollock, and S.A. Armstrong (2013). Leukemic transformation by the MLL-AF6 fusion oncogene requires the H3K79 methyltransferase Dot1l. *Blood.* **121**(13): p. 2533-41.
 39. Daigle, S.R., E.J. Olhava, C.A. Therkelsen, A. Basavapathruni, L. Jin, P.A. Boriack-Sjodin, C.J. Allain, C.R. Klaus, A. Raimondi, M.P. Scott, N.J. Waters, R. Chesworth, M.P. Moyer, R.A. Copeland, V.M. Richon, and R.M. Pollock (2013). Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood.* **122**(6): p. 1017-25.
 40. Murai, M.J., M. Chruszcz, G. Reddy, J. Grembecka, and T. Cierpicki (2011). Crystal structure of menin reveals binding site for mixed lineage leukemia (MLL) protein. *J Biol Chem.* **286**(36): p. 31742-8.
 41. Yokoyama, A., T.C. Somerville, K.S. Smith, O. Rozenblatt-Rosen, M. Meyerson, and M.L. Cleary (2005). The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell.* **123**(2): p. 207-18.
 42. Greaves, M.F. and J. Wiemels (2003). Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* **3**(9): p. 639-49.
 43. Alonso, C.N., C. Meyer, M.S. Gallego, J.G. Rossi, A.P. Mansini, P.L. Rubio, A. Medina, R. Marschalek, and M.S. Felice (2010). BTBD18: A novel MLL partner gene in an infant with acute lymphoblastic leukemia and inv(11)(q13;q23). *Leuk Res.* **34**(11): p. e294-6.
 44. Basecke, J., J.T. Whelan, F. Griesinger, and F.E. Bertrand (2006). The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* **135**(4): p. 438-49.
 45. Fair, K., M. Anderson, E. Bulanova, H. Mi, M. Tropschug, and M.O. Diaz (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol.* **21**(10): p. 3589-97.

46. Shen, C., S.Y. Jo, C. Liao, J.L. Hess, and Z. Nikolovska-Coleska (2013). Targeting recruitment of disruptor of telomeric silencing 1-like (DOT1L): characterizing the interactions between DOT1L and mixed lineage leukemia (MLL) fusion proteins. *J Biol Chem.* **288**(42): p. 30585-96.
47. Soskine, M. and D.S. Tawfik (2010). Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nat Rev Genet.* **11**(8): p. 572-82.
48. Marsh, J.A., H. Hernandez, Z. Hall, S.E. Ahnert, T. Perica, C.V. Robinson, and S.A. Teichmann (2013). Protein complexes are under evolutionary selection to assemble via ordered pathways. *Cell.* **153**(2): p. 461-70.
49. Levy, E.D. and S. Teichmann (2013). Structural, evolutionary, and assembly principles of protein oligomerization. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **117**: p. 25-51.
50. Ali, M.H. and B. Imperiali (2005). Protein oligomerization: how and why. *Bioorg Med Chem.* **13**(17): p. 5013-20.
51. Bodenhausen, G. and D.J. Ruben (1980). Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters.* **69**(1): p. 185-189.
52. Wang, A.C., P.J. Lodi, J. Qin, G.W. Vuister, A.M. Gronenborn, and G.M. Clore (1994). An efficient triple-resonance experiment for proton-directed sequential backbone assignment of medium-sized proteins. *J Magn Reson B.* **105**(2): p. 196-8.
53. Grzesiek, S. and A. Bax (1993). Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins. *J Biomol NMR.* **3**(2): p. 185-204.
54. Delaglio, F., S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR.* **6**(3): p. 277-93.
55. Johnson, B.A. (2004). Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol.* **278**: p. 313-52.
56. Otwinowski, Z. and W. Minor (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**: p. 307-26.
57. Adams, P.D., P.V. Afonine, G. Bunkoczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, and P.H. Zwart (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **66**(Pt 2): p. 213-21.
58. Emsley, P. and K. Cowtan (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
59. Yang, Y., E.F. Vanin, M.A. Whitt, M. Fornerod, R. Zwart, R.D. Schneiderman, G. Grosveld, and A.W. Nienhuis (1995). Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Hum Gene Ther.* **6**(9): p. 1203-13.
60. Lacombe, J., G. Krosl, M. Tremblay, B. Gerby, R. Martin, P.D. Aplan, S. Lemieux, and T. Hoang (2013). Genetic interaction between Kit and Scl. *Blood.* **122**(7): p. 1150-61.
61. Lacombe, J., S. Herblot, S. Rojas-Sutterlin, A. Haman, S. Barakat, N.N. Iscove, G. Sauvageau, and T. Hoang (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood.* **115**(4): p. 792-803.

domain (blue) complexed with RAS (red) bound to GMPPNP (yellow). Statistics in **Fig. 2c**. **(d)** Ribbons diagram shows the binding interface between AF6 RA1 domain (blue) and RAS-GMPPNP (red-yellow). Contact residues are labeled and displayed as sticks. **(e)** Structural alignment of AF6 RA1 domain (blue) complexed with RAS-GMPPNP (grey) and RASSF5 RA domain (orange) bound to RAS-GMPPNP (PDB 3DDC). RASSF5 is the only known RAS effector with an α N helix that contacts the switch II region of RAS. **(f)** RASSF5 contacts the RAS switch II region *via* an α -helix located N-terminal to the β 1-strand of the RA domain (top, from PDB 3DDC). Predictions of secondary structure upstream of β 1 from the AF6 RA1 domain suggest the presence of an analogous helix (bottom, dashed). H = α -helix, S = β -strand (JPRED).

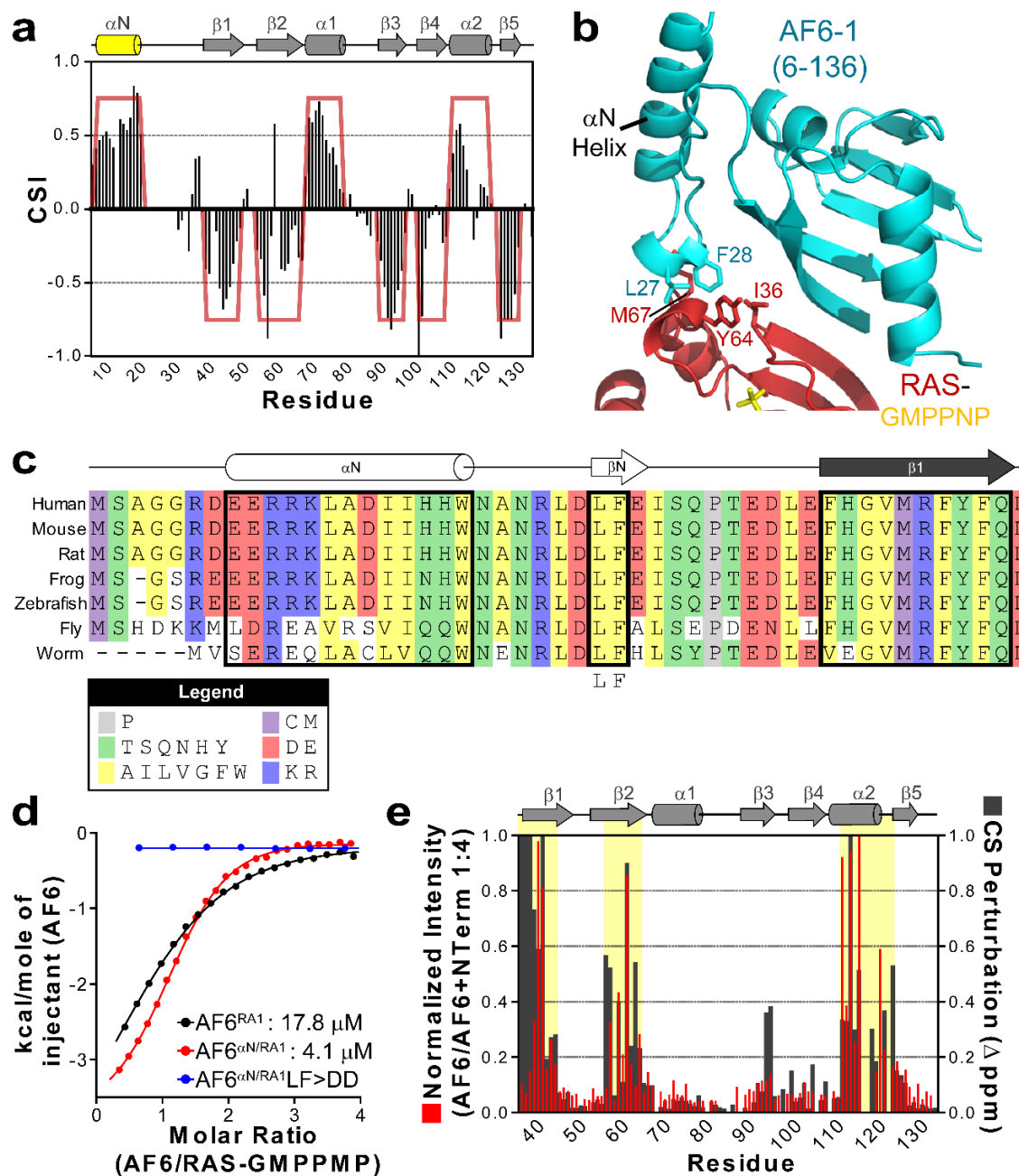


Fig. 2. The α N helix is present in AF6 and augments its binding to RAS. **(a)** CSI versus residue number for the AF6 RA1 domain extended 31 residues at the N-terminus (6-137). Four positive CSI values indicate α -helix; four negative values indicate β -strand. Resulting secondary structure arrangement depicted at top reveals the N-terminal α -helix (yellow). **(b)** Ribbons diagram depicting our homology model of the AF6 RA1 domain and α N helix (blue) complexed with RAS-GMPPNP (red-yellow) based on structural alignment with RASSF5-RAS (PDB 3DDC). Leu27 and Phe28, bottom of α N helix, contact switch II residues Met67, Tyr64 and Ile36 of RAS (marked, sticks). **(c)** Amino acid alignment of residues upstream of the core RA1 domain in 7 evolutionarily conserved AF6 orthologues. A Leu-Phe motif in the loop between

α N and β 1 is completely conserved (boxed). **(d)** ITC analyses of the interactions between AF6 and RAS-GMPPNP. Core RA1 domain binds RAS with a K_d of 17.8 μ M (black), an order of magnitude weaker than most RAS-effector interactions. The α N-extended domain exhibits a 4.5-fold increase in affinity (red; K_d of 4.1 μ M), while a L27D/F28D double mutant showed no heats of association (blue). **(e)** Experimental validation of the model by two NMR-based approaches. Left axis, normalized chemical shift perturbations induced in $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of the AF6 RA1 domain by a purified AF6 fragment encompassing the α N helix (6-36). Right axis, combined chemical shift differences (Δ ppm) of backbone ^1H and ^{15}N resonances from the core RA1 domain (37-136) vs extended RA1 domain that incorporates the α N helix (6-136). The α N helix in either experiment affects the same three regions (yellow), indicated in domain diagram at top.

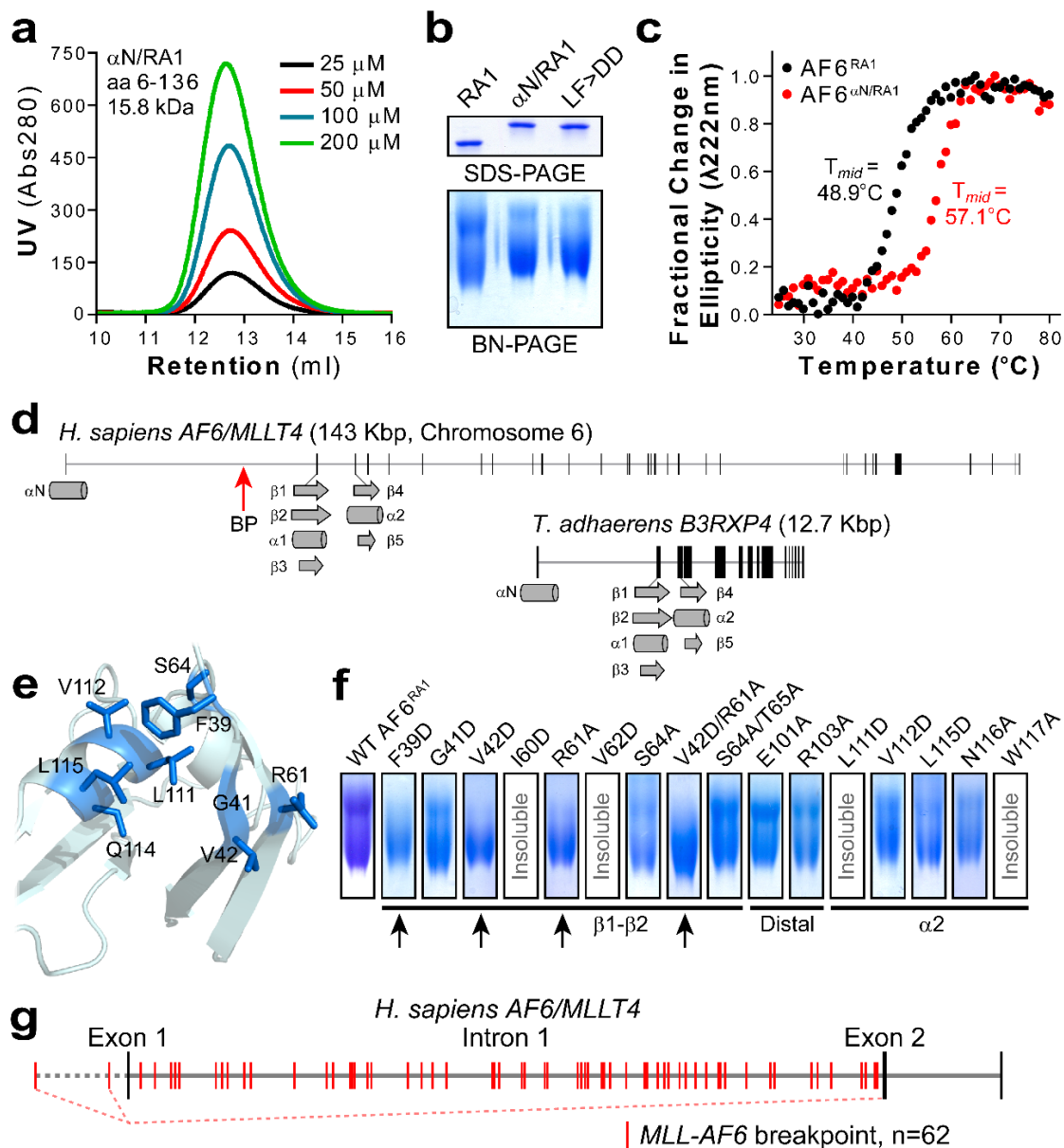


Fig. 3. Inclusion of the α N helix stabilizes the AF6 RA1 domain and prevents its dimerization, but this secondary structure element is lost in all *MLL-AF6* patients. **(a)** Size exclusion chromatography of purified AF6 α N-RA1 domain (residues 6-136) presents a single monomer peak at several concentrations. **(b)** BN-PAGE analysis of purified core AF6 RA1 domain (37-136), α N-extended RA1 domain (6-136), and α N-extended RA1 domain double mutant deficient in RAS binding (L27D/F28D). **(c)** Thermal stability of the core (37-136, black) and α N-extended (6-136, red) RA1 domains. Melting curves were normalized to the maximal change in ellipticity monitored by far-UV CD at 222 nm. **(d)** Analysis of the human *AF6* gene structure shows that exon 1 encodes the α N helix, is followed by a large intron 1, and exons 2 and 3 encode the remaining structural elements of RA1 (top). This gene structure is completely conserved in *B3RXP4* of the primordial metazoan *T. adhaerens* (bottom). The known breakpoint with *MLL* resides in the first intron (red arrow). **(e)** Ribbons diagram displaying normally buried

residues, mostly hydrophobic, from the core RA1 domain (blue, sticks) that are exposed upon loss of the α N helix. (f) Validation of the dimerization interface by systematic mutation of residues exposed by loss of the α N helix. BN-PAGE gels exhibit collapse of typical monomer-dimer fractions (as for wild-type, far left) to a single monomeric band if a mutation affects dimerization (arrows). Potential dimer interface residues in β 1, β 2, and α 2 (identified in e) were mutated to Asp or Ala. Mutation of distal residues E101 and R103 had no effect. Several mutations resulted in insoluble protein (marked). (g) Position of breakpoints in *AF6* derived from 62 patients with the *MLL-AF6* translocation (red). 60 breakpoints were within intron 1. 2 breakpoints upstream of exon 1 result in an identical fusion protein due to a splicing event (dashed).

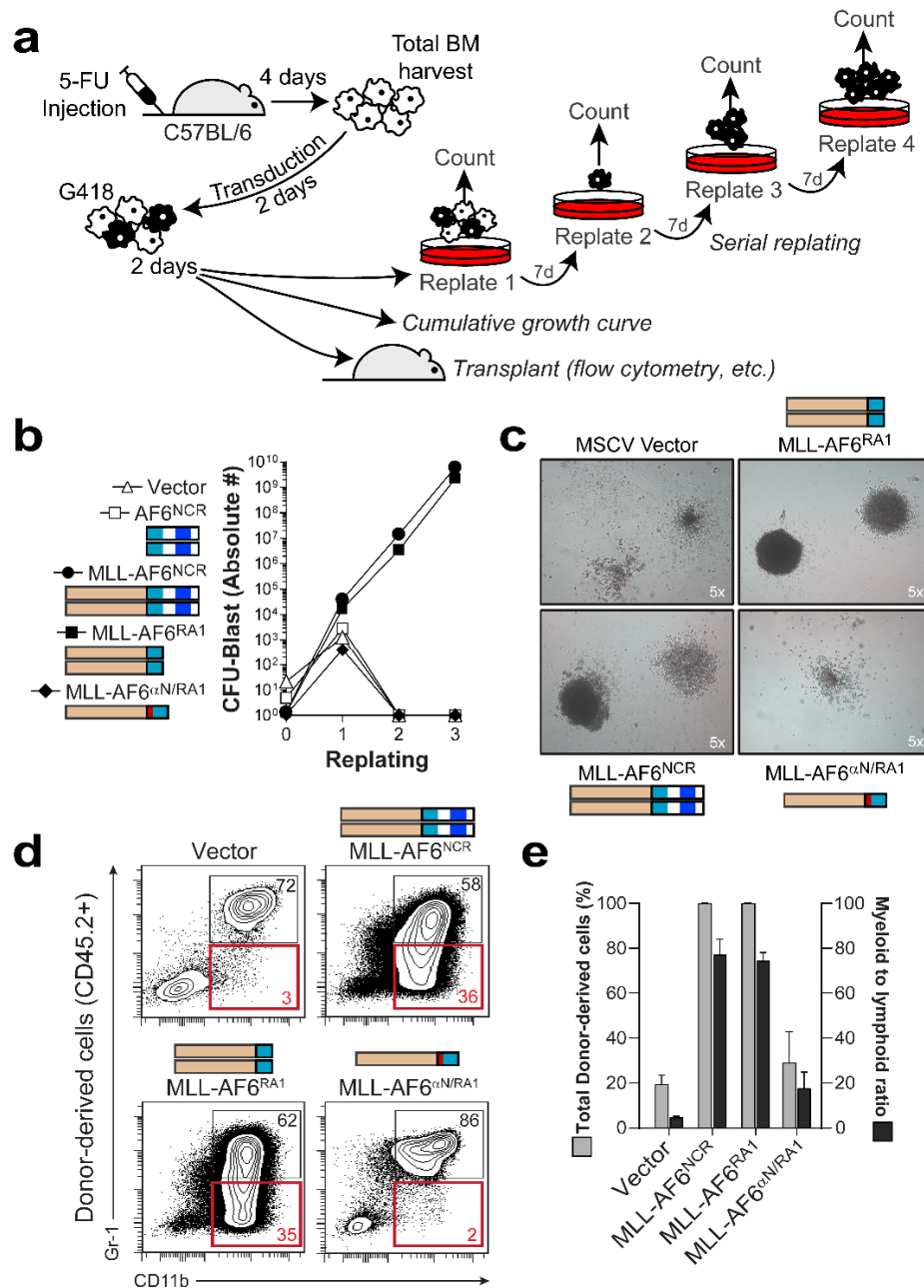


Fig. 4. Insertion of the α N helix between MLL and AF6 disrupts myeloid immortalization and blocks its leukemogenic potential in mice. **(a)** Schematic of experimental strategies to measure immortalization of hematopoietic progenitors and induction of leukemogenesis. **(b)** Serial replating immortalization assay for progenitor cells transduced with retroviral constructs. Bars represent mean \pm SD of the total colonies per 5×10^3 cells derived from 3 replicates. **(c)** Typical granulocyte and macrophage colonies from primary methylcellulose cultures of pMSCVneo or MLL-AF6 α N-RA1 and macroscopic blast colonies from MLL-AF6^{NCR} or MLL-AF6^{RA1} cultures. **(d)** Representative flow cytometry analysis of donor-derived myeloid cells in the bone marrow of transplanted mice. The red quadrants highlight the immature CD11b⁺GR1^{low/negative} myeloid subpopulation which was significantly expanded in MLL-AF6^{NCR} or MLL-AF6^{RA1} expressing

bone marrow cells in primary transplants compared to control cells (vector) and MLL-AF6^{αN-RA1} expressing bone marrow cells. All mice transplanted with MLL-AF6^{NCR} or MLL-AF6^{RA1} expressing cells were leukemic at 5 weeks (>20% blasts in the bone marrow and peripheral blood) while MLL-AF6^{αN-RA1} expressing cells did not induce leukemia up to 10 weeks after transplantation. (e) Donor derived engraftment in the bone marrow of mice transplanted with 10⁵ BM cells transduced with pMSCVneo, MLL-AF6^{NCR}, MLL-AF6^{RA1} or MLL-AF6^{αN-RA1}. BM cells were selected for 7 days in G418 prior to transplantation. Shown are the mean ± SD of donor cell engraftment (CD45.2⁺) and of the myeloid (CD11b⁺, Gr1⁺) to lymphoid (CD3⁺, B220⁺) ratio in donor-derived cells five weeks after transplantation (2x10⁵/mice, n= 5 or 7 mice).

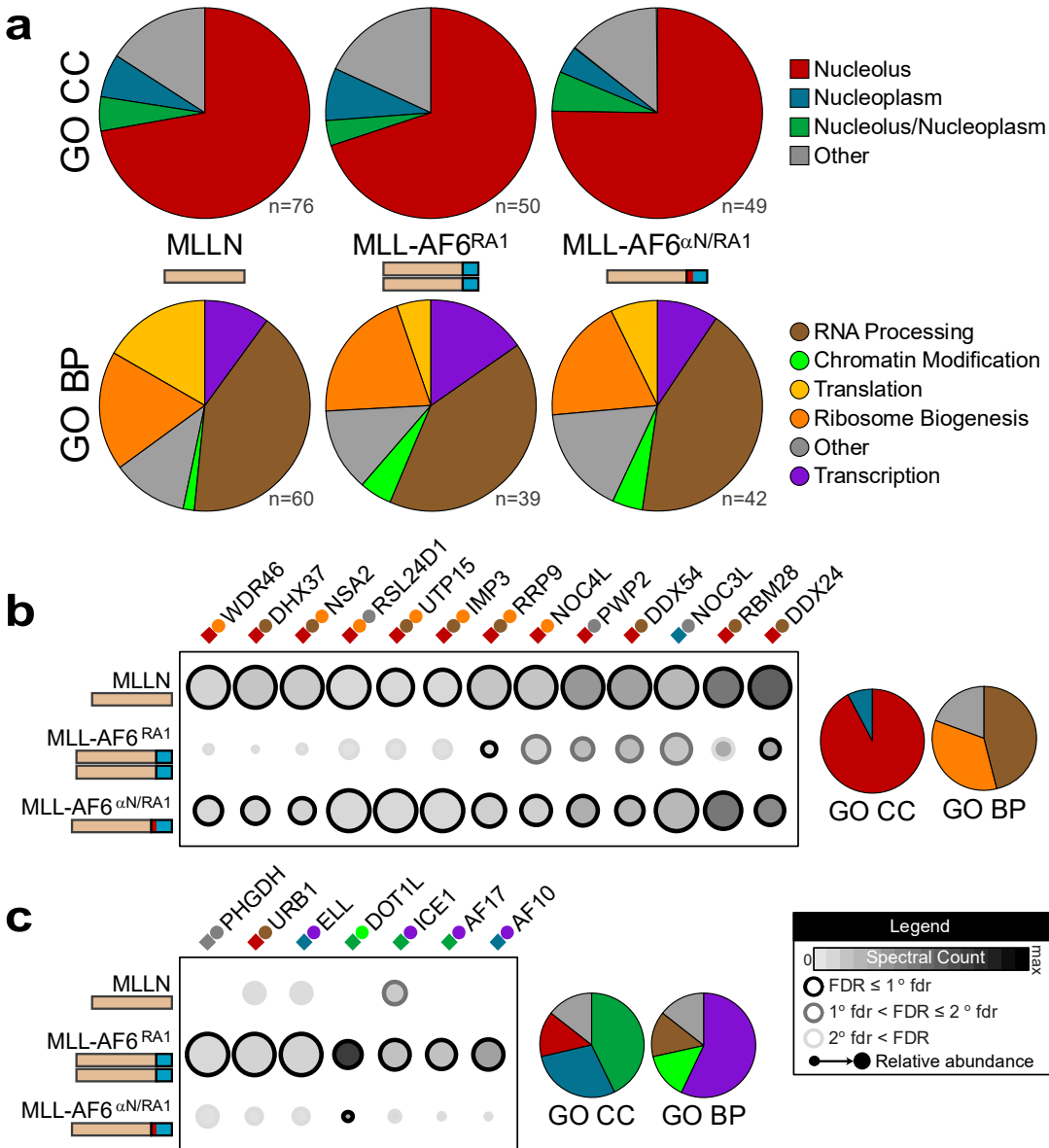


Fig. 5. BioID proteomics reveal protein partners specific to monomeric and dimeric MLL-AF6 fusions. **(a)** Distribution of Gene Ontology (GO) cellular components (CC) denoting localization (top), and biological processes (BP) denoting protein function (bottom) of proteins associating with MLLN alone, the MLL-AF6 dimer (RA1, 37-136), or the MLL-AF6 monomer (α N-RA1, 6-136). *n* indicates the total number of identified biotinylated proteins following SAINT analysis. The majority of associating proteins were nucleolar (red) for all baits, though MLL-AF6³⁷⁻¹³⁶ has a higher ratio of proteins localized to the nucleoplasm. **(b)** Proteins biotinylated specifically by MLLN and MLL-fused monomeric α N-RA1 domain. Annotation for GO CC (coloured squares) and GO BP (coloured circles) are from **a**. Chart summary of total CC and BP distributions are at right. **(c)** Proteins biotinylated specifically by the dimeric MLL-fused AF6 RA1 domain.

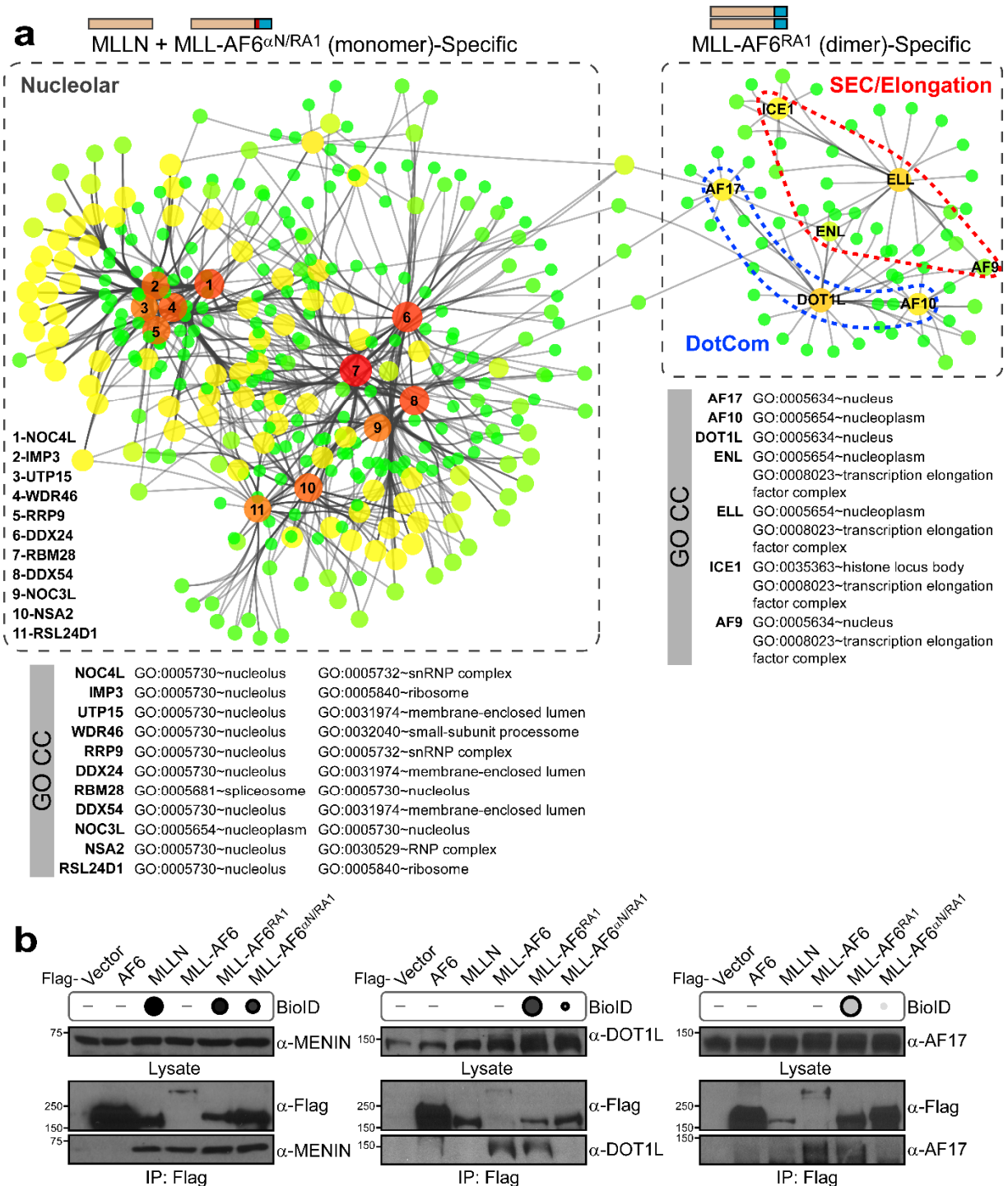


Fig. 6. Description of subcellular localizations and biological processes of specific partner proteins. **(a)** Interaction network for proteins associating only with MLLN and the monomeric fusion MLL-AF6^{αN/RA1}, or with the dimeric fusion MLL-AF6^{RA1}. Partners specific for dimer or monomer MLL proteins were enriched with data from iRefIndex (specifically IntAct, BioGRID, MINT, and DIP) and imported to Cytoscape. Two distinct clusters were observed (dashed outlines) that demonstrate separate subcellular localization and protein functions. Monomeric

MLL-specific interactors are nucleolar and are predominantly involved in ribosome biogenesis, while dimeric MLL-specific interactors are in the nucleoplasm and elicit transcriptional elongation. Two components of the MLL interactome are evident, the DotCom complex (blue) and the SEC complex (red). GO CC annotations for the key hub proteins at the core of these networks are listed at bottom. **(b)** Validation of BioID results by Western blot. HEK 293 cells were transfected with Flag-tagged MLLN, MLL-fused dimeric AF6 RA1, or MLL-fused monomeric AF6 α N-RA1. Flag-tagged wild-type AF6 and MLL-fused full length AF6 were added, along with vector alone. Dot representation of BioID results are at top. Flag immunoprecipitations were probed for endogenous MEN1 (left), DOT1L (middle) and AF17 (right).

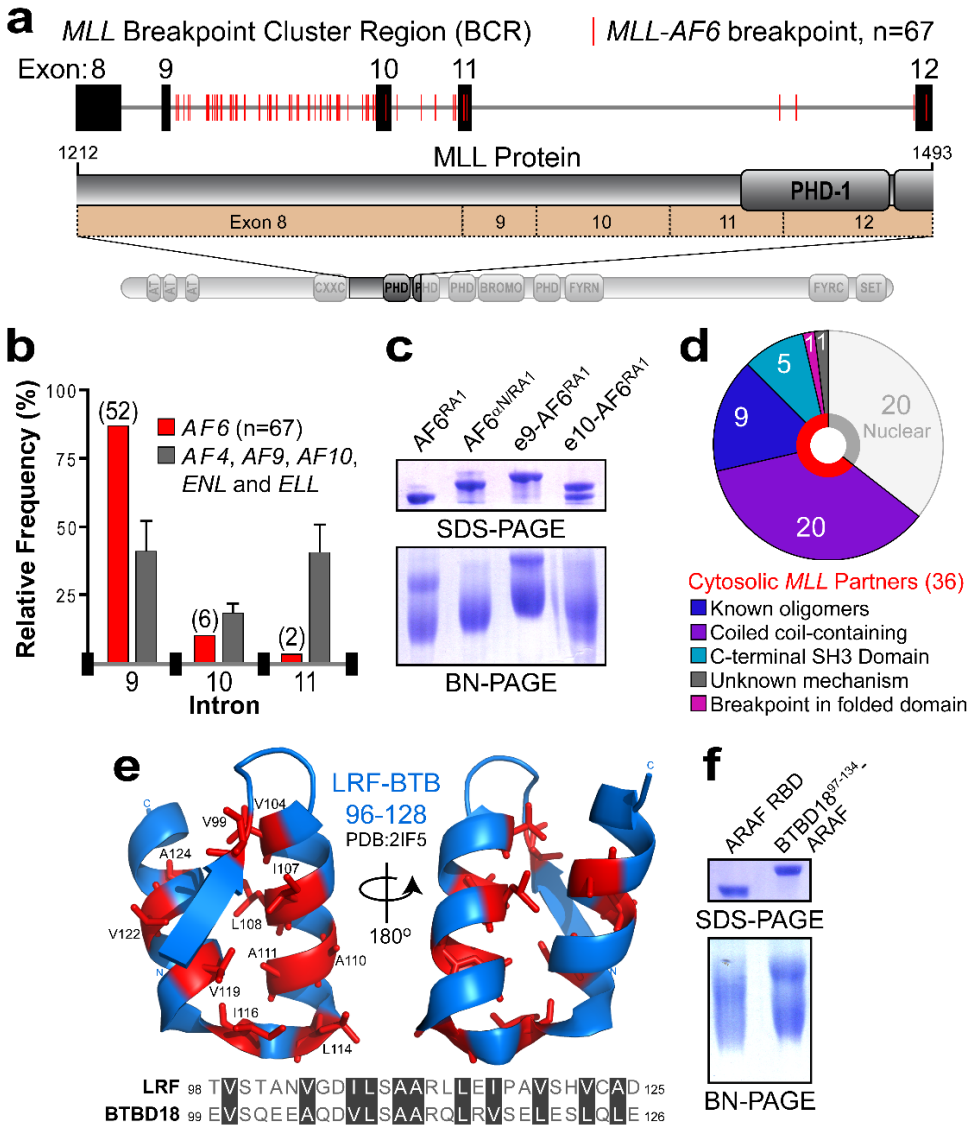
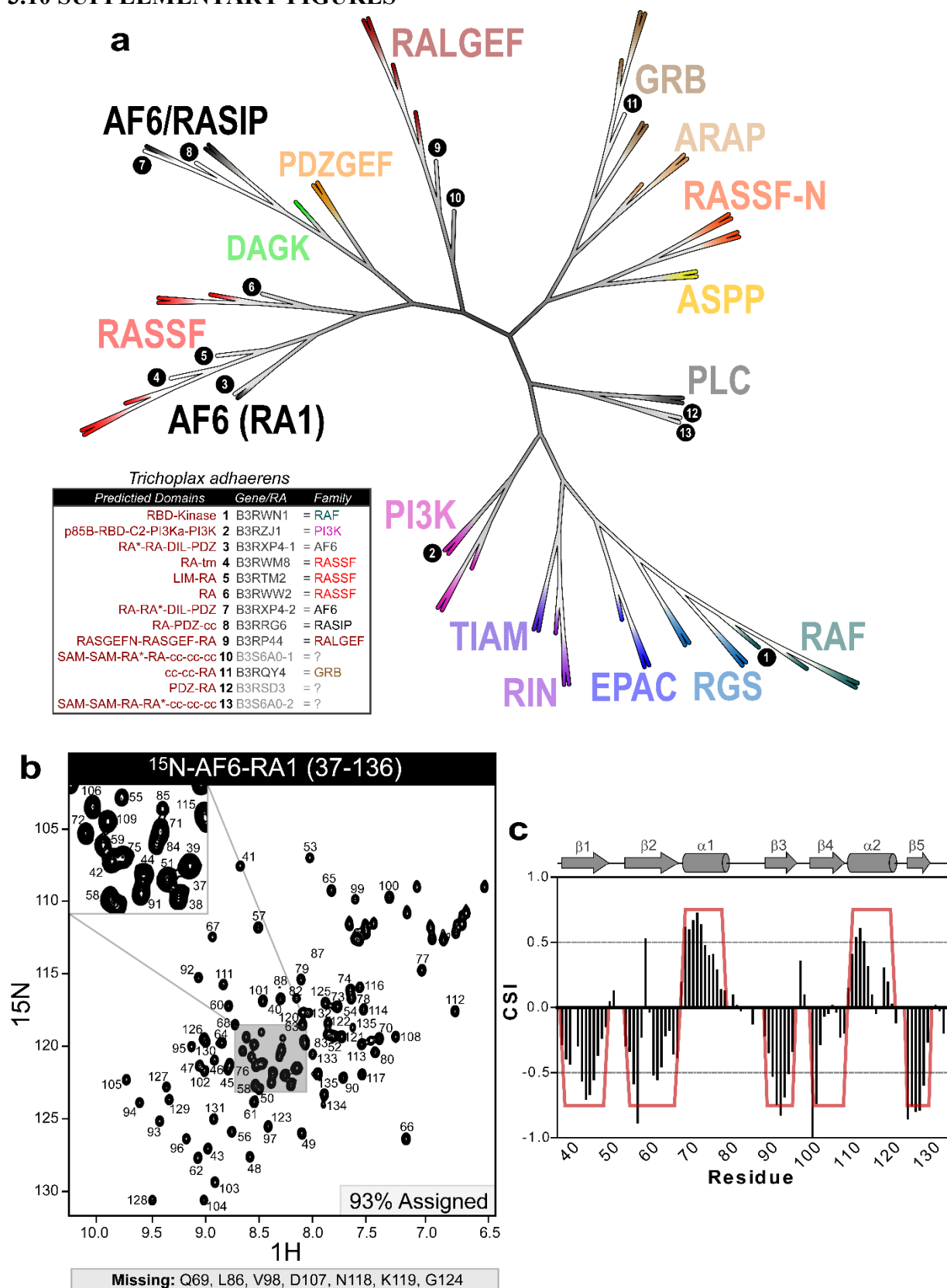


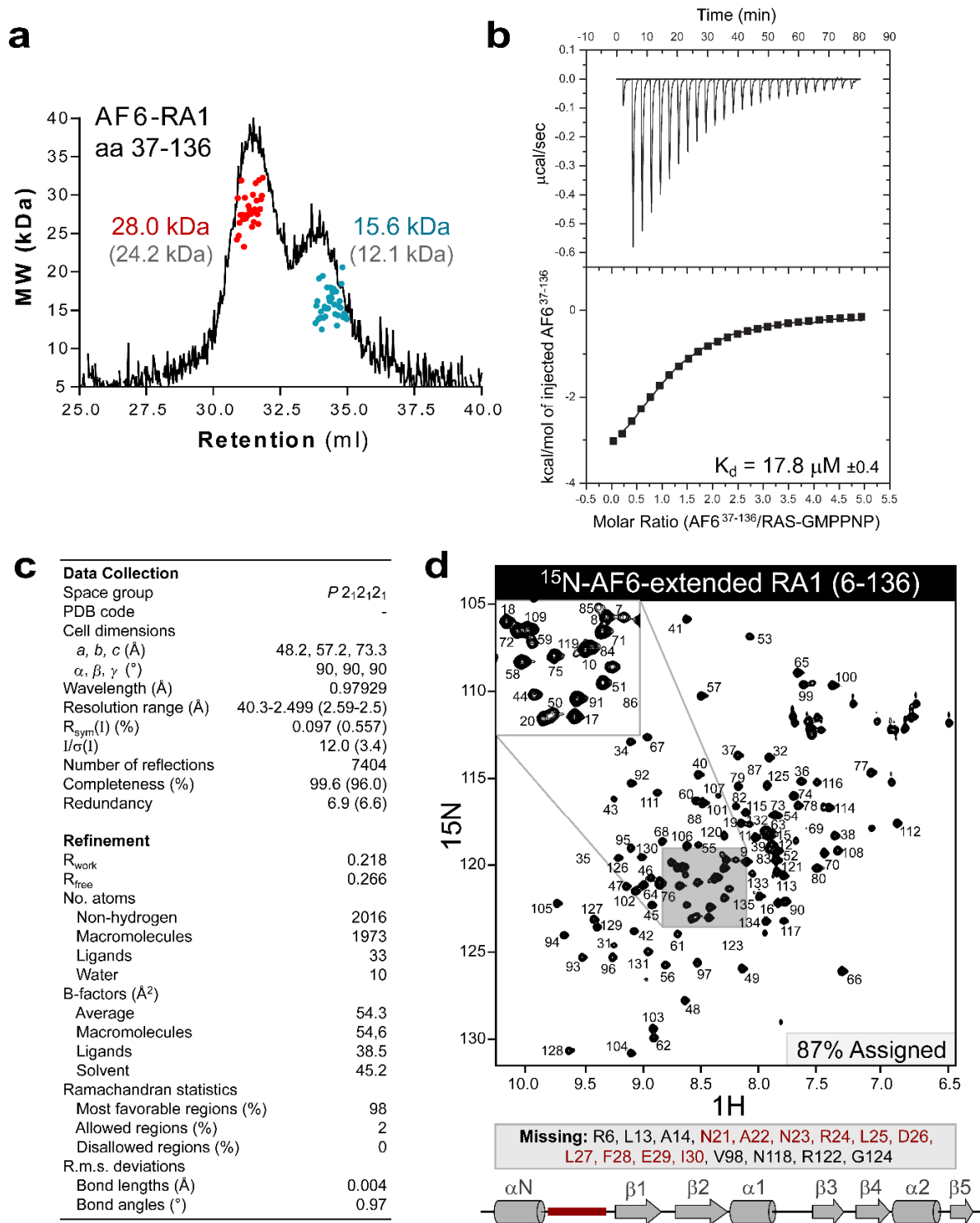
Fig. 7. Breakpoint positions in *MLL* gene translocations and the dimerization capacity of resultant fusion proteins. **(a)** Distribution of breakpoints across the *MLL* BCR resulting from *AF6* translocations. The BCR spans *MLL* exon 8 to exon 12, encoding the first PHD domain and 220 residues N-terminal (bottom). Breakpoints deciphered from 67 *MLL*-*AF6* patients (red lines) are highly concentrated to intron 9 of the *MLL* gene (top). **(b)** *MLL* breakpoint distribution stemming from *AF6* translocations versus 5 other common translocations. **(c)** BN-PAGE analysis of *AF6* RA1 domain with various N-terminal extensions. 6-136 incorporates the α N-helix from *AF6*, e9 the last 30 residues encoded by *MLL* exon 9, and e10 the last 30 residues encoded by *MLL* exon 10. **(d)** 34 of 36 cytoplasmic partners in the *MLL* recombinome are known to dimerize, are predicted to have coiled coils, or have potentially dimerizing C-terminal SH3 domains. In addition, 20 of the partners are nuclear, one has no appreciated dimerization capacity, and another truncates a dimerization domain. **(e)** A small BTB domain fragment remains at the junction with *MLL* following its fusion with *BTBD18*. Ribbons model of the fragment based on a BTB domain from the highly related *LRF* (PDB 2IF5; sequence similarity

at bottom). The resulting helix-turn-helix presents one completely hydrophobic interface (red).
(f) BN-PAGE oligomerization analysis following fusion of the MLL-generated helix-turn-helix from BTBD18 to the normally monomeric ARAF RBD domain.

3.10 SUPPLEMENTARY FIGURES

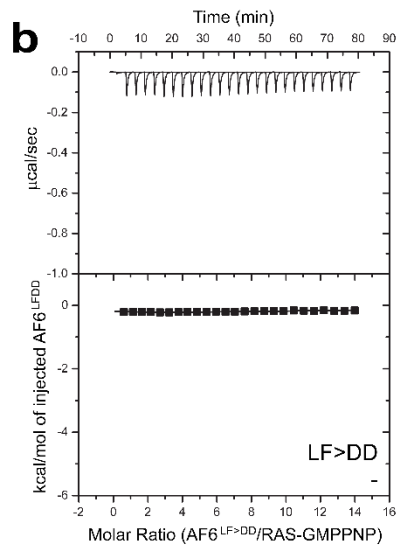
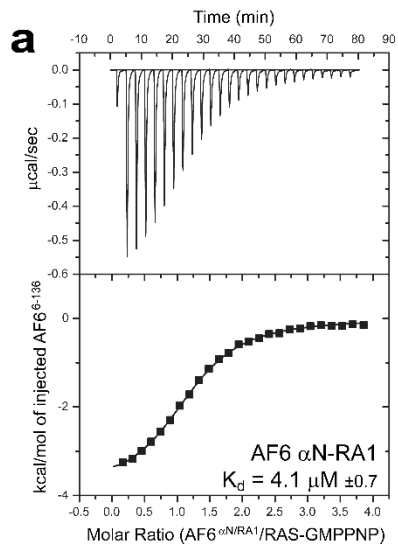


Supplementary Fig. 1. Proteins containing RAS binding domains in the basal metazoan *Trichoplax adhaerens* show correlating domain organizations and strong sequence similarity to their human orthologues. **(a)** To identify the most evolutionarily conserved RAS effectors, amino acid sequences from all 52 RBD domains we could identify in the human proteome were aligned together with 13 RBD domains in proteins encoded by 11 genes in *T. adhaerens*. Boxed; predicted domain organization for RAS effectors in *T. adhaerens* (red; SMART, PFAM), gene names, and their proposed human orthologues based on RBD domain sequence conservation and domain mapping. **(b)** 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of AF6 RA1 domain, residues 37-136. Backbone assignment was completed for 93% of residues using standard triple resonance experiments (HNCACB, CBCACONH) on $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein (7 residues missing listed at bottom). **(c)** CSI versus residue number for the RA1 domain of AF6. Four positive CSI values indicate α -helix; four negative values indicate β -strand. Resulting secondary structure arrangement depicted at top is prototypical of RBD domains.

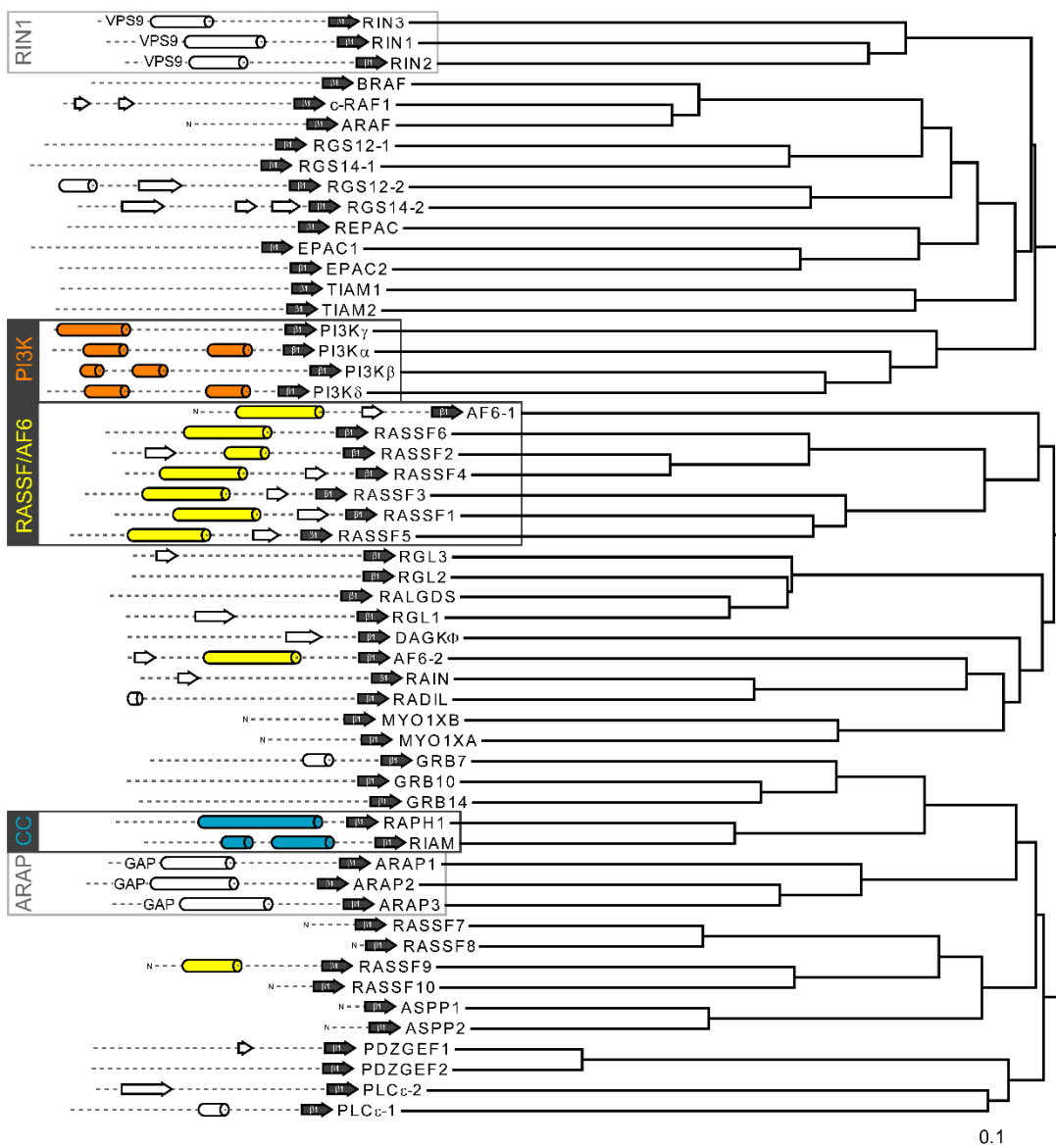


Supplementary Fig. 2. Biochemical properties of the core AF6 RA1 domain, backbone assignment for the N-terminally extended AF6 RA1 domain, and structure statistics for the X-Ray crystal structure of RA1 complexed with RAS-GMPPNP. (a) Size-exclusion chromatography in line with multi-angle light scattering (MALS) to determine the molecular

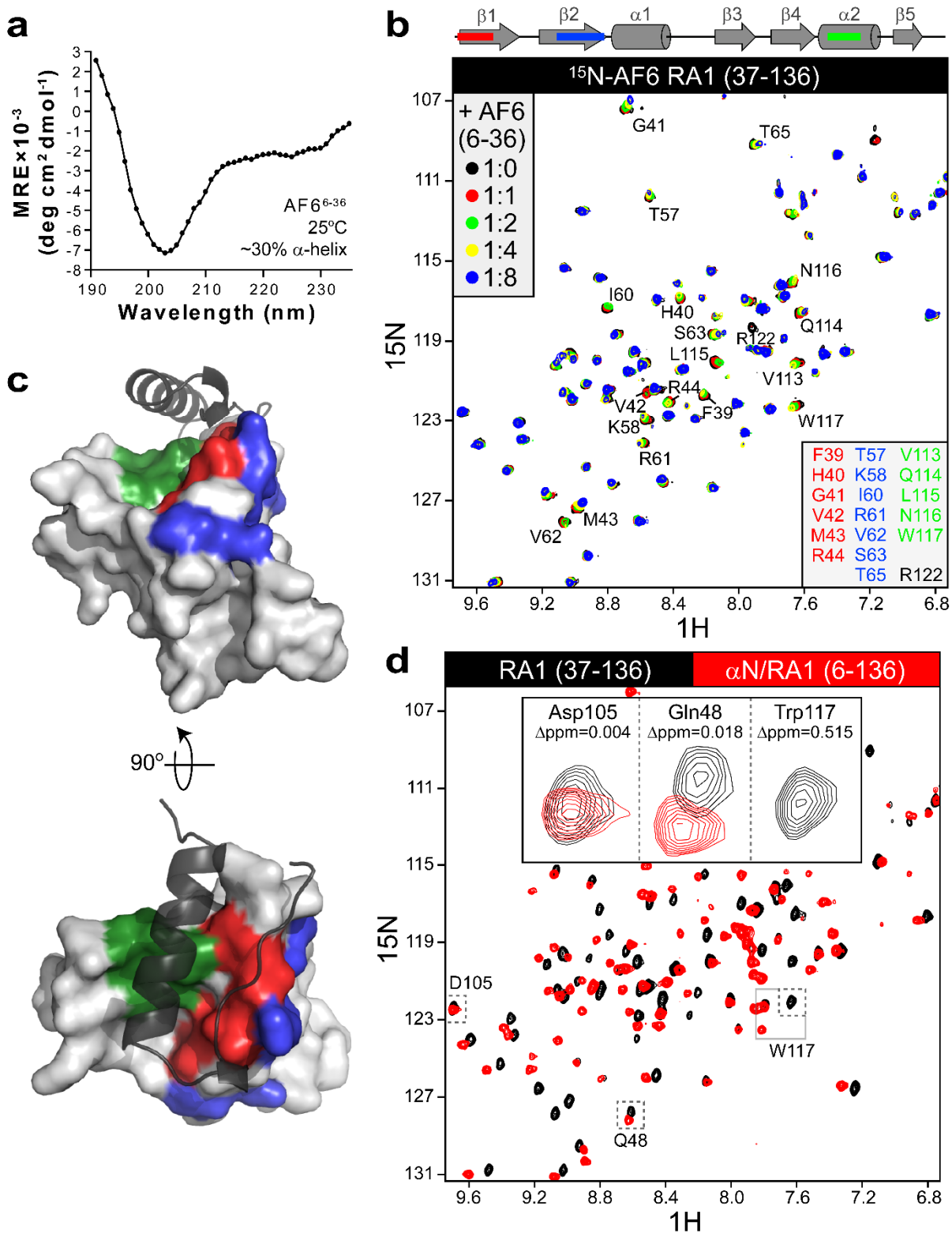
weight of purified AF6 RA1 domain at 4°C. MALS-determined molecular weights of the larger peak (red) were consistent with a dimer, while the smaller peak (blue) was consistent with a monomer. **(b)** ITC shows a weak association between the AF6 RA1 domain (residues 37-136) and RAS-GMPPNP. Purified RA1 domain was injected into purified RAS-GMPPNP with a resultant dissociation constant (K_d) of 17.8 μ M, an order of magnitude weaker than most RAS-effector interactions. **(c)** Data collection and refinement statistics for the co-crystal structure of AF6 RA1 domain and RAS-GMPPNP. Values within parentheses refer to the highest resolution shell. **(d)** 2D $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of an extended AF6 RA1 domain, residues 6-136. Backbone assignment was completed for 87% of residues using standard triple resonance experiments (HNCACB, CBCACONH) on $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein. The majority of unassigned residues (bottom) are in the loop region following the αN helix (red).



c

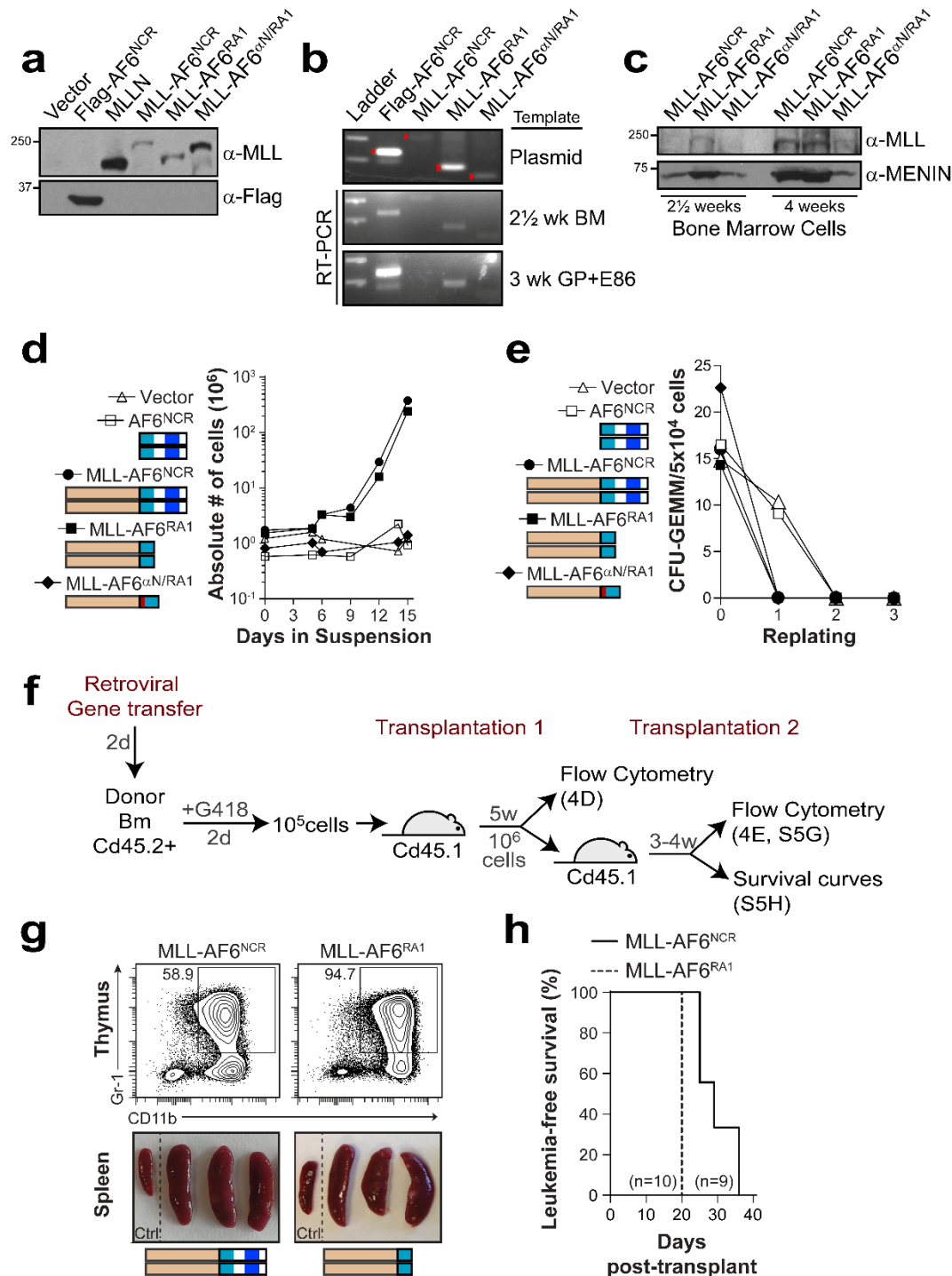


Supplementary Fig. 3. An RA1 domain with the extended helix demonstrates significantly tighter binding to RAS-GMPPNP and only a small subset of RAS binding domains interact with RAS in this manner. **(a)** ITC substantiates the contribution of the α N helix to the AF6 RA1 domain interaction with RAS. An extended RA1 domain (residues 6-136) was titrated into RAS-GMPPNP with a resultant dissociation constant (K_d) of 4.1 μ M, 4.5-fold higher than the core RA1 domain alone. **(b)** Mutation of the Leu-Phe motif completely disrupts AF6 binding to RAS, as measured by ITC. An L27D/F28D double mutant of the extended AF6 RA1 domain was titrated into RAS-GMPPNP, with no discernible heats of interaction. **(c)** RA domains from the effector proteins RASSF(1-6) and AF6 are the only RAS-interacting domains with the α N helix. Amino acid alignment was performed using core RBD domains from all RAS effectors in the human proteome (determined using secondary structure predictions for the common ubiquitin superfold structure $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$; JPRED) as well as 50 residues upstream of β 1 to account for presence of an α N helix. Alignment tree reveals families of conserved effectors, and secondary structure predictions of the 50 upstream residues are shown to the left. The RIN1 and ARAP effectors (white outline) have helices N-terminal to β 1, but these are components of the preceding domains (VPS9 and GAP, respectively). PI3K RBD domains are predicted to have short helices (orange), which are evident in the published PI3K-RAS structure (PDB 1HE8) but do not contact the RAS G domain. RAPH1 and RAIM have N-terminal helices (blue) that function as coiled-coils, analogous to the related Lamellipodin (PDB 4GMV). The only remaining RAS binding domains with predicted α N helices are the RA1 domain of AF6 and the RA domains of RASSF effectors 1-6 (yellow), which cluster together denoting a high level of sequence conservation.



Supplementary Fig. 4. Interface between the α N helix and core RA domain. **(a)** Far-UV CD spectroscopy demonstrates AF6 residues 6-36 have propensity to form an α helix in solution. At

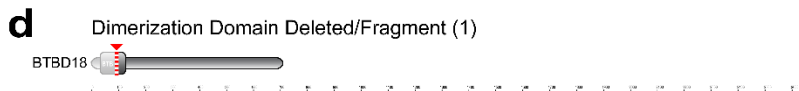
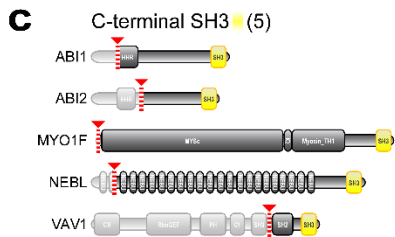
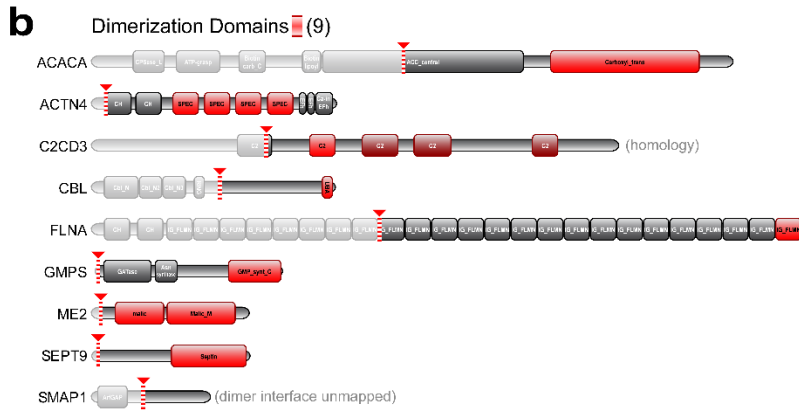
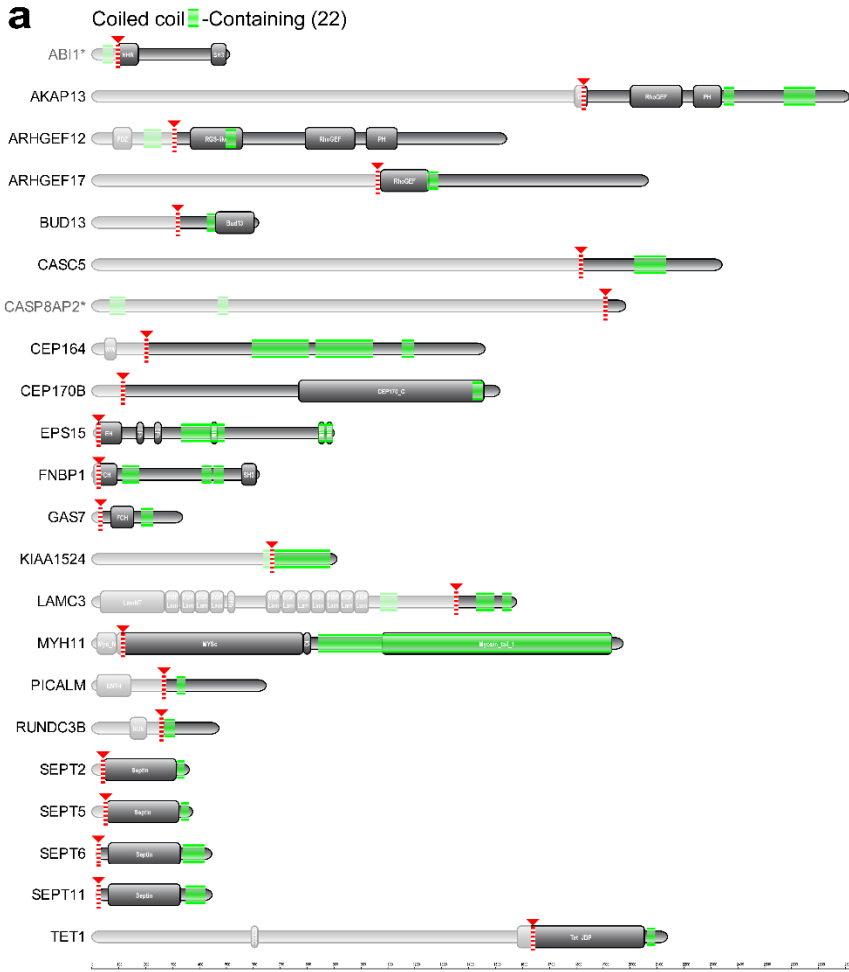
25°C, the purified 30 residue protein is estimated to be 30% α -helical. **(b)** $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra showing chemical shift broadening of AF6 RA1 domain upon titration of AF6 residues 6-36. Increasing molar ratios (top left) of the short helical segment were added to the RA domain alone (black), starting at 1:1 (red) and going up to 1:8 (blue). 19 resonances showed significant exchange broadening, listed at bottom right. The broadened residues are derived from 3 sequential amino acid sequences in the AF6 RA1 domain (coloured red, blue and green), overlaid in the domain diagram at top as positioned in β 1, β 2 and α 3. **(c)** Position of surface residues broadened by titration of AF6 amino acids 6-36 in the AF6 RA1 domain structure. Red, blue and green colours correspond to sequential broadened regions identified in **b**. The location of these residues is consistent with our model of the α N helix (black) based on structural alignment with the RASSF5-RAS structure (**Fig. 2b**). **(d)** Overlay of $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC spectra from AF6 core RA1 domain (37-136) and the extended RA1 domain incorporating the α N helix (6-136). Combined chemical shift perturbation (Δppm) of backbone ^{15}N and ^1H resonances was calculated using the equation: $\Delta\text{ppm} = \sqrt{\Delta^1\text{H} + 0.14\Delta^{15}\text{N}}$. Boxed, three resonances with calculated Δppm representative of negligible perturbations (Asp105 and Gln48) or significant perturbation (Trp117).



Supplementary Fig. 5. Insertion of the α N helix between MLL and the AF6 RA1 domain disrupts myeloid immortalization and blocks the oncogenic potential of MLL in mice. **(a)** Transient expression of MLL fusion proteins in HEK 293 cells. The N-terminal half of MLL (1-1395) was fused to AF6 residues 35-348 (MLL-AF6^{NCR}), 37-136 (RA1 domain) or 6-136 (α N-extended RA1) in pMSCVneo for retrovirus production. Flag-tagged AF6 residues 35-314 (AF6^{NCR} in the absence of MLL) was used as a negative control. **(b)** Confirming expression of

MLL fusion proteins by RT-PCR. Primers were designed to specifically detect *MLL* fusion to sequences encoding AF6^{NCR}, AF6^{RA1} or AF6 ^{α N-RA1}. RT-PCR was performed on cDNA from whole RNA extracts taken from mouse BM or GP+E86 cells, either 2½ or 3 weeks post-transduction, respectively. **(c)** Western blot to detect expression of MLL fusion proteins in transduced bone marrow cells maintained in primary culture. anti-MLL (top) reveals high levels of MLL-AF6^{NCR} and MLL-AF6^{RA1} 4 weeks post-transduction. Increased levels of the MLL binding partner MENIN are also observed (bottom). **(d)** Cumulative growth curve of transduced cells in primary cultures. Hematopoietic precursor cells (Lineage-negative) expressing MLL-AF6^{NCR} and MLL-AF6 RA1 domain (37-136) showed comparable exponential growth. MLL fused to α N-extended RA1 (6-136) was undistinguishable from negative controls (vector alone and Flag-AF6^{NCR}). **(e)** Growth of multipotent progenitors (CFU-GEMM) in serial replating assays. In contrast to blast colonies, CFU-GEMM decline in serial replating. **(f)** Strategy for serial transplantation of MLL fusion expressing cells into mice. **(g)** MLL-AF6^{NCR} (n=10) or MLL-AF6^{RA1} (n=9) expressing cells induce rapid and invasive myeloid leukemias that spread to the spleen and thymus in secondary (not shown) and tertiary transplantation. Illustrated are thymi and spleen from mice transplanted each with 2x10⁵ bone marrow cells from secondary recipients. **(h)** Survival curves for mice transplanted with the MLL-AF6^{NCR} or MLL-AF6^{RA1} retroviral transduced cells from secondary recipients (panel **g**).

Supplementary Fig. 6. The MLL interactome and the importance of breakpoint position in *MLL* gene translocations on the dimerization capacity of resultant fusion proteins. **(a)** Data from 13 available proteomic analyses were assembled to produce an MLL interactome, depicted here using Cytoscape. These published data sets were generated using MLL or truncated MLL proteins, several common leukemogenic MLL-fusion proteins, or direct MLL binding partners as bait (see Supplementary Table 1). Grey circled, 4 core complexes mediating MLL activity are apparent, including components of the super elongation complex (SEC), the polycomb repressive complex (PRC), the DotCom complex, and the WDR5 histone methylation complex. Besides AF6, the most frequent fusions to MLL are integral to this network of gene expression modulators (blue circled). **(b)** Amino acid sequences coded by *MLL* exons 9, 10, and 11 are highly distinctive at their C-terminus (green), which would be fused directly to the core RA1 domain in MLL-AF6. AF6 residues lost in the MLL fusion protein include the α N helix, and comprise several hydrophobic amino acids (black box, total in red) that contact the RA1 domain in wild-type AF6. The C-termini of MLL encoded by exons 10 and 11 are similarly hydrophobic, but that encoded by exon 9 contains very few hydrophobic residues. **(c)**, Fusion of the *BTBD18* gene to *MLL* results in an MLL-BTBD18 fusion protein with a truncated BTB domain at the interface. BTB domains typically form strong dimers; however, the BTB dimerization interface in MLL-BTBD18 is lost. A BTB domain dimer from LRF (PDB 2IF5) is shown to demonstrate the truncated fragment resulting from fusion with MLL. Surface representation shows two individual BTB domains that interact to form a dimer (red, blue). Just two small helices remain at the MLL fusion interface, corresponding to residues 96-128 in LRF (ribbons). **(d)** Left, size exclusion chromatography establishes the ARAF RBD domain as a monomer, in comparison with the AF6 RA1 domain which is a dimer in the absence of the α N helix (AF6³⁷⁻¹³⁶), but a monomer when it is included (AF6⁶⁻¹³⁶). Right, these data are corroborated by BN-PAGE analysis.



Supplementary Fig. 7. Position of coiled coil or dimerization domains in relation to *MLL* breakpoints in protein partners of cytoplasmic origin. **(a)** 22 fusion proteins predicted to encode coiled coils (green; LOGICOIL and MARCOIL, 90% confidence). Fusion points with *MLL* are marked in red (dashed, arrow). Only in *ABI1* and *CASP8AP2* does the predicted coiled coil segment precede the breakpoint (*). **(b)** 9 fusion proteins are not predicted to have coiled coils, but dimerize by alternative mechanisms (red). **(c)** 5 fusion proteins encode C-terminal SH3 domains (yellow), related to SH3 domains known to dimerize. **(d)** *MLL* fusion in the final cytoplasmic protein partner (*BTBD18*) occurs within a BTB domain, analogous to the breakpoint within the RA1 domain of *AF6*.

3.11 SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

3.11.1 Plasmid constructs and antibodies

Human cDNA encoding wild-type H-RAS (Gene ID: 3265, residues 1-171) was cloned into pET15b (Novagen/EMD Biosciences) for bacterial expression with an N-terminal His tag. Constructs expressing RAS association domains from *AF6* (Gene ID: 17356, residues 37-136 or 6-136) and *ARAF* (Gene ID: 369, residues 17-94) or the *AF6* α N-helix alone (6-36) with N-terminal glutathione S-transferase (GST) tags were sub-cloned into pGEX-4T2 (Amersham Pharmacia Biotech). To study dimerization by the *BTBD18* fragment, cDNA encoding human *BTBD18* (Gene ID: 643376, residues 97-134) was cloned in-frame, upstream of *ARAF* RBD domain and expressed as a fusion from pGEX-4T2. Similarly, sequences encoding the C-terminal regions of human *MLL* exons (Gene ID: 4297, residues 1333-1362 (exon 9), 1377-1406 (exon 10), and 1415-1444 (exon 11)) were cloned in-frame to *AF6* RA domain (37-136). For retroviral expression of *MLL* fusion proteins, *MLL*-*AF6*^{NCR} (*MLL* residues 1-1395 fused to *AF6* residues 35-348) and Flag-*AF6*^{NCR} (35-348) cloned into murine stem cell virus (MSCV) constructs were kindly provided by Michael Cleary [1]. *AF6*^{NCR} was replaced with sequence encoding either the core *AF6* RA domain (37-136) or the α N-extended RA domain (6-136). *MLLN* (residues 1-1395) was generated by excising *AF6*^{NCR}, blunt ending and ligation. For proteomic analysis of *MLL*-fused *AF6* fragments, we generated BirA/Flag-tagged mammalian expression constructs by Gateway cloning into BirA/Flag pcDNA5 FRT/TO. These included *MLLN* (residues 1-1395), *MLLN* fused to *AF6* RA domain (37-136), α N-RA domain (6-136), or full length *AF6* (for co-immunoprecipitation experiments). All point mutations were performed by PCR-directed mutagenesis. All constructs were verified by sequencing.

Monoclonal antibodies against Flag M2 were purchased from Sigma, anti-DOT1L from Santa Cruz, and anti-MLL from Millipore. Rabbit polyclonal anti-AF17 and anti-MENIN antibodies were from Bethyl Laboratories.

3.11.2 Purification of recombinant proteins

GST or His-tagged proteins were expressed in *E. coli* BL21 cells grown in minimal or LB media by induction with isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 15°C overnight. Generally, cells were lysed and sonicated in 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.4% NP-40, protease inhibitors (Roche), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 ng/mL DNase, and either 1 mM dithiothreitol or 10 mM β -mercaptoethanol. Lysate was cleared by centrifugation and incubated with glutathione (Amersham Pharmacia Biotech) or Ni-NTA (Qiagen) resin at 4°C for 2 hours. Bound proteins were eluted directly with thrombin cleavage or with 250 mM imidazole (Bioshop) followed by thrombin. Concentrated proteins were purified to homogeneity by size exclusion chromatography using either an S75 or S200 column (GE Healthcare). Recombinant wild-type RAS was purified from *E. coli* predominantly in the GDP-bound form, and was loaded with GMPPNP as described [2].

3.11.3 Cell cultures and immunoprecipitation

HEK 293T and HeLa cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 10% fetal calf serum. For recombinant protein expression, cells were transiently transfected with PEI [3]. Stable HeLa cell lines for BioID analysis were generated as Flp-In T-Rex cell pools (Invitrogen). For immunoprecipitation experiments, transfected cells were lysed in a modified RIPA buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 10% glycerol, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, nuclease and protease inhibitors). These lysates were cleared by centrifugation and incubated with pre-washed Protein G sepharose and anti-Flag antibody. Following two hour incubation, beads were washed 5 times with modified RIPA, separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane for Western blot analysis. Membranes were blocked in TBST containing 5% (w/v) skim milk. Primary antibodies were detected with anti-mouse Ig or anti-rabbit Ig antibodies conjugated to horseradish peroxidase followed by treatment with ECL (Pierce).

3.11.4 Methylcellulose colony-forming assays

Retrovirally infected bone marrow cells were plated in duplicates at two concentrations (5×10^4 or 2×10^5 cells/mL) in methylcellulose medium (IMDM (Gibco), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% methylcellulose (Fluka), 2% bovine serum albumin (BSA), 100 ng/mL stem cell factor (SCF), 50 mM α -monothioglycerol (Sigma), 200 μ g/mL plasma transferrin, 1 U/mL recombinant erythropoietin, and IL-3), with or without neomycin (G148; Gibco) 1 mg/mL for 7-10 days. Neomycin-resistant colonies were scored and classified [4]. For serial replating assays, colony cells were harvested, pooled and plated at 5×10^3 cells/mL under the same conditions but without further neomycin selection. Secondary colonies were scored and subjected to tertiary and quaternary replating assays. Colonies were scored using a Leitz Labovert inverted microscope (Leitz Wetzlar).

3.11.5 Flow cytometry analysis

Following selection with neomycin (G148) at 1 mg/mL for 72 hours, Kit⁺Sca⁺Lin⁻ (KSL) and progenitor population FACS analysis was performed as described [5] using BD Pharmigen and eBioscience antibodies for c-Kit (CD177; 2B8), Sca-1 (Ly-6A/E; D7), CD16/32 (93), CD34 (RAM34), IL7Ra (CD127; A7R34), and Lin⁺ cells were excluded by staining with biotinylated antibodies against B220 (CD45R; RA3-6B2), CD11b (M1/70), Gr-1 (Ly-6C/G; RB6-8C5), CD3e (145-2C11), Thy1.2 (CD90.2; 30-H12). Lineage-positive population FACS analysis was also performed using BD Pharmigen and eBioscience antibodies for B220 (CD45R; RA3-6B2), CD11b (M1/70), Gr-1 (Ly-6C/G; RB6-8C5), CD3e (145-2C11), Thy1.2 (CD90.2; 30-H12). Dead cells were excluded by propidium iodide staining. FACS analysis was performed on an LSRII cytometer.

3.11.6 Proteomics

BioID [6] was carried out as essentially as described [7]. In brief, HeLa Flp-In T-REx cells stably expressing BirA*/Flag-tagged MLL fusion proteins were grown in 2×150 cm² plates of sub-confluent cells (60%), and incubated 24 hours in complete media supplemented with 1 μ g/mL tetracycline (BioShop) and 50 μ M biotin (BioBasic). Cell pellets were resuspended by pipetting up and down and vortexing in 1.5 mL of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5,

150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, protease inhibitors (Sigma), and 0.5% sodium deoxycholate). 1 μ L of benzonase (250U) was added to each sample and the lysates sonicated on ice. Lysates were centrifuged for 20 min at 12,000 x g, and then incubated with streptavidin-sepharose beads (GE) pre-washed with RIPA buffer. Affinity purification was performed at 4°C on a nutator for 3 hours, beads were pelleted (400 x g, 1 min), the supernatant removed, and the beads washed 3X in 1 mL RIPA buffer followed by 3X in 1 mL 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 (ABC). Residual ABC was removed and beads were resuspended in 100 μ L of 50 mM ABC for protein digestion. 10 μ L of a 0.1 μ g/ μ L trypsin stock (resuspended in 20 mM Tris-HCl, pH 8) was added for a final concentration of 1 μ g of trypsin and incubated at 37°C overnight. The following day, an additional 1 μ g of trypsin was added (in 10 μ L of 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) and the samples incubated an additional 2-4 hours. Beads were pelleted (400 x g, 2 min) and the supernatant (peptides) transferred to a fresh 1.5 mL tube. Beads were rinsed 2X in 100 μ L HPLC water and pooled with the collected supernatant. Formic acid was added to a final concentration of 2% to end digestion (30 μ L of 50% stock). The pooled supernatant was then centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes and the supernatant collected and lyophilized. Peptides were resuspended in 5% formic acid and one quarter of the sample was analyzed per MS run. 5 μ L of each sample was directly loaded at 400 nL/min onto a 75 μ m x 12 cm emitter packed with 3 μ m ReproSil-Pur C₁₈-AQ (Dr. Maisch HPLC GmbH, Germany). The peptides were eluted from the column over a 90 min gradient generated by a NanoLC-Ultra 1D plus (Eksigent, Dublin CA) nano-pump and analyzed on a TripleTOF™ 5600 instrument (AB SCIEX, Concord, Ontario, Canada). The gradient was delivered at 200 nL/min starting from 2% acetonitrile with 0.1% formic acid to 35% acetonitrile with 0.1% formic acid over 90 minutes followed by a 15 min clean-up at 80% acetonitrile with 0.1% formic acid, and a 15 min equilibration period back to 2% acetonitrile with 0.1% formic acid for a total of 120 min. To minimize carryover between each sample, the analytical column was washed for 3 hours by running an alternating sawtooth gradient from 35% acetonitrile with 0.1% formic acid to 80% acetonitrile with 0.1% formic acid, holding each gradient concentration for 5 min. Analytical column and instrument performance were verified after each sample by loading 30 fmol BSA tryptic peptide standard (Michrom Bioresources Inc. Fremont, CA) with 60 fmol α -Casein tryptic digest and running a short 30 min gradient. TOF MS calibration was performed on BSA reference ions before running the next sample in order to adjust for mass drift and verify peak

intensity. The instrument method was set to a discovery or IDA mode which consisted of one 250 ms MS1 TOF survey scan from 400-1300 Da followed by twenty 100 ms MS2 candidate ion scans from 100-2000 Da in high sensitivity mode. Only ions with a charge of 2⁺ to 4⁺ which exceeded a threshold of 200 cps were selected for MS2, and former precursors were excluded for 10 secs after 1 occurrence.

MS data generated by TripleTOFTM 5600 were stored, searched and analyzed using the ProHits laboratory information management system (LIMS) platform [8]. Within ProHits, the resulting WIFF files were first converted to an MGF format using WIFF2MGF converter and to an mzML format using ProteoWizard [9] (v3.0.4468) and the AB SCIEX MS Data Converter (V1.3 beta) and then searched using Mascot (v2.3.02) and Comet (v2012.02 rev.0). The spectra were searched with the human and adenovirus complements of the RefSeq database (version 57) from NCBI supplemented with “common contaminants” from the Max Planck Institute (<http://141.61.102.106:8080/share.cgi?ssid=0f2gfuB>) and the Global Proteome Machine (GPM; <http://www.thegpm.org/crap/index.html>). Parameters included: fully tryptic cleavages, allowing up to 2 missed cleavage sites per peptide. The mass tolerance was 40 ppm for precursors with charges of 1+ to 3+ and a tolerance of +/- 0.15 amu for fragment ions. Variable modifications were deamidated asparagine and glutamine and oxidized methionine. The results from each search engine were analyzed through TPP (the Trans-Proteomic Pipeline [10], v4.6 OCCUPY rev 3) via the iProphet pipeline [11]. SAINTexpress version 3.3 [12] was used as a statistical tool to calculate the probability value of each potential protein-protein interaction from background contaminants using default parameters. Two unique peptides ions and a minimum iProphet probability of 0.95 were required for protein identification prior to SAINTexpress analysis. Eight control runs were used for comparative purposes; 4 runs of a BioID analysis conducted on cells expressing the BirA*/Flag tag only, and 4 runs from a BioID analysis conducted on an unrelated bait protein (GFP). The 8 controls were collapsed to the highest four spectral counts for each hit. Only proteins passing a statistical threshold of FDR≤0.02 were deemed high quality interactions and are reported in Supplementary Table 2. For subsequent analysis of preys specific to monomeric MLLN and MLL-αN/RA1, or to dimeric MLL-RA1, we used only preys passing a statistical threshold of FDR≤0.01 (**Fig. 5**, **Fig. 6** and **Supplementary Tables 3-4**).

3.12 SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Liedtke, M., P.M. Ayton, T.C. Somervaille, K.S. Smith, and M.L. Cleary (2010). Self-association mediated by the Ras association 1 domain of AF6 activates the oncogenic potential of MLL-AF6. *Blood*. **116**(1): p. 63-70.
2. Smith, M.J., B.G. Neel, and M. Ikura (2013). NMR-based functional profiling of RASopathies and oncogenic RAS mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**(12): p. 4574-9.
3. Werth, S., B. Urban-Klein, L. Dai, S. Hobel, M. Grzelinski, U. Bakowsky, F. Czubayko, and A. Aigner (2006). A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes. *J Control Release*. **112**(2): p. 257-70.
4. Lacombe, J., G. Krosl, M. Tremblay, B. Gerby, R. Martin, P.D. Aplan, S. Lemieux, and T. Hoang (2013). Genetic interaction between Kit and Scl. *Blood*. **122**(7): p. 1150-61.
5. Lacombe, J., S. Herblot, S. Rojas-Sutterlin, A. Haman, S. Barakat, N.N. Iscove, G. Sauvageau, and T. Hoang (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood*. **115**(4): p. 792-803.
6. Roux, K.J., D.I. Kim, M. Raida, and B. Burke (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*. **196**(6): p. 801-10.
7. Couzens, A.L., J.D. Knight, M.J. Kean, G. Teo, A. Weiss, W.H. Dunham, Z.Y. Lin, R.D. Bagshaw, F. Sicheri, T. Pawson, J.L. Wrana, H. Choi, and A.C. Gingras (2013). Protein interaction network of the mammalian Hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Sci Signal*. **6**(302): p. rs15.
8. Liu, G., J. Zhang, B. Larsen, C. Stark, A. Breitkreutz, Z.Y. Lin, B.J. Breitkreutz, Y. Ding, K. Colwill, A. Pasculescu, T. Pawson, J.L. Wrana, A.I. Nesvizhskii, B. Raught, M. Tyers, and A.C. Gingras (2010). ProHits: integrated software for mass spectrometry-based interaction proteomics. *Nat Biotechnol*. **28**(10): p. 1015-7.
9. Kessner, D., M. Chambers, R. Burke, D. Agus, and P. Mallick (2008). ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics*. **24**(21): p. 2534-6.
10. Pedrioli, P.G. (2010). Trans-proteomic pipeline: a pipeline for proteomic analysis. *Methods Mol Biol*. **604**: p. 213-38.
11. Shteynberg, D., E.W. Deutsch, H. Lam, J.K. Eng, Z. Sun, N. Tasman, L. Mendoza, R.L. Moritz, R. Aebersold, and A.I. Nesvizhskii (2011). iProphet: multi-level integrative analysis of shotgun proteomic data improves peptide and protein identification rates and error estimates. *Mol Cell Proteomics*. **10**(12): p. M111 007690.
12. Teo, G., G. Liu, J. Zhang, A.I. Nesvizhskii, A.C. Gingras, and H. Choi (2014). SAINTexpress: improvements and additional features in Significance Analysis of INTeractome software. *J Proteomics*. **100**: p. 37-43.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

4.1 LA REPROGRAMMATION ONCOGÉNIQUE PAR SCL ET LMO1

4.1.1 La mise à jour de nos connaissances et la problématique actuelle

Nos travaux antérieurs sur les oncogènes SCL et LMO1 nous ont permis de déterminer que le processus de leucémogénèse de la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T) survient en deux étapes majeures. Premièrement, il y a l'étape d'initiation, où les oncogènes SCL et LMO1 reprogramment une sous-population de thymocytes en cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC) [1], suivi de l'étape de progression qui est menée par l'acquisition de mutations activatrices de *NOTCH1* promouvant l'expansion des pré-LSCs en cellules propagatrices de leucémie (LPC) [2]. Jusqu'à présent, nous avons pu établir que l'auto-renouvellement joue un rôle majeur dans la reprogrammation oncogénique par les oncogènes SCL et LMO1. En effet, les progéniteurs thymiques acquièrent une capacité d'auto-renouvellement aberrante grâce à l'instauration d'une signature génique « souche » qui est médiée par l'activité transcriptionnelle de SCL et LMO1 [1]. Cette même signature est retrouvée à la fois chez les cellules souches embryonnaires (ESC) et hématopoïétiques (HSC) [3], et chez d'autres pré-LSCs identifiées dans les leucémies aiguë myéloïde (LAM) et LAL-T induites par les oncogènes MLL-AF9 [4] et LMO2 [5], respectivement. Malgré cette importante découverte, les mécanismes moléculaires par lesquels ces oncogènes gouvernent l'activité des pré-LSCs demeurent toujours peu connus. Notamment, cette information pourrait grandement contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblées contre les pré-LSCs car celles-ci représentent un réservoir important de cellules résistantes à la chimiothérapie actuelle [6] et responsables pour la majorité des cas de rechutes [7]. L'objectif de cette première partie du projet de recherche de maîtrise (Chapitre 2) était donc de tenter d'identifier de nouveaux mécanismes contribuant à la reprogrammation oncogénique par SCL et LMO1.

4.1.2 Le rôle de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique : HSCs

Pour cette étude, nous nous sommes d'abord penchés sur la biologie des cellules souches hématopoïétiques normales. En effet, une compréhension des mécanismes contrôlant l'auto-

renouvellement des HSCs pourrait révéler des propriétés similaires dans les pré-LSCs [4, 8]. De façon intéressante, nous avons démontré que SCL est essentiel pour le maintien des fonctions « souches » des HSCs [9] alors que parallèlement, il a été établi que les HSCs sont hautement dépendantes d'un taux de synthèse protéique tempéré [10]. Plus récemment, il a été constaté que l'équilibre entre les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches germinales (GSC) est régulé par le niveau de biogénèse des ribosomes et de synthèse protéique [11]. Ensemble, ces résultats ont commencé à souligner l'importance de la régulation ribosomale et traductionnelle dans les HSCs, et nous ont mené à investiguer la possibilité que SCL ait également un rôle dans ce nouvel aspect de régulation des fonctions souches.

Nous avons donc effectué des études fonctionnelles *in vivo* avec des souris de type sauvage (WT) et *Scl* hétérozygotes (*Scl*^{+/-}) ayant subi une aplasie médullaire par l'administration de 5-fluorouracile (5-FU), un agent chimiotoxique induisant un stress prolifératif auprès des cellules hématopoïétiques [12]. En accord avec notre hypothèse, nos résultats démontrent que seule la perte d'un allèle de *Scl* est suffisante pour perturber la taille cellulaire, la synthèse protéique et le niveau d'expression des protéines ribosomales (*Rpl* et *Rps*) au sein des HSCs. Ceci a également engendré une perte de leurs propriétés d'auto-renouvellement, de quiescence et de reconstitution à long terme (résultats non-publiés). Par conséquent, nos observations révèlent pour la toute première fois le rôle du facteur de transcription SCL dans la régulation de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique des HSCs normales en réponse à un stress prolifératif. Remarquablement, cette régulation semble s'étendre au-delà de seulement la diminution de l'expression des protéines ribosomales car nous avons également détecté la présence de SCL aux promoteurs de gènes impliqués dans les phases d'initiation et d'élongation de la traduction (*Eif2b1*, *Eif2b4* et *Eif4e*), dans la formation des polysomes (*Srp14*), et dans la synthèse et maturation des ARN ribosomiaux (ARNr; *Rn45s* et *Ncl*). Ceci suggère que le ribosome peut être régulé de manière tissu-spécifique et ouvre la possibilité à ce que sa dérégulation puisse entraîner un état pathologique, voire cancéreux [13].

4.1.3 Le rôle de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique : pré-LSCs

De telles évidences de dérégulation ribosomale et traductionnelle ont été observées dans le cas de syndromes myélodysplasiques (MDS) et de LAL-T, où plusieurs mutations récurrentes

surviennent au sein des gènes *RPS14* et *RPS19* [14], *RPL5* et *RPL10* [15], *RPL11* [16] et *RPL22* [17]. D'autre part, il a récemment été démontré que la diminution de la biogénèse des ribosomes confère aux HSCs et ses progéniteurs une résistance accrue au stress endogène et génotoxique [18], pouvant entraîner l'émergence de cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC) dans le cas de leucémies aiguës. Sachant maintenant que SCL possède cette exacte fonction, nous avons donc cherché à savoir s'il peut également diminuer la biogénèse des ribosomes et la synthèse protéique au sein des pré-LSCs SCL-LMO1.

Pour ce faire, nous avons analysé la taille cellulaire, la synthèse protéique, l'expression des protéines ribosomales et la prolifération cellulaire des pré-LSCs par rapport aux thymocytes de type sauvage (WT). De façon intéressante, la surexpression de SCL ou de LMO1 seuls n'exerce pas d'effet sur la taille des thymocytes. Cependant lorsqu'ils sont tous les deux surexprimés dans le contexte des pré-LSCs, nous observons une coopérativité génétique menant à une diminution quasi-globale de la taille des thymocytes, qui est notamment plus prononcée dans les populations de thymocytes double-négatifs DN1, DN3 et DN4. Ce phénotype était également associé à une diminution de la synthèse protéique à l'exception des thymocytes DN1 SCL-LMO1 qui possèdent presque 5 fois plus de synthèse protéique malgré leur petite taille. Ces premiers résultats inattendus nous ont poussés à revisiter les fonctions connues de SCL et LMO1 pour mieux les expliquer. Entre autre, la coopérativité génétique répressive entre les deux oncogènes a déjà été démontrée dans le cas de l'inhibition des protéines E2A/HEB et du pré-Ta chez les thymocytes SCL-LMO1 au stade pré-leucémique, ce qui est également associé à un blocage partiel de différenciation au stade DN3-DN4 [19]. De plus, la surexpression de LMO2 augmente le nombre absolu de thymocytes DN1 tout en augmentant la proportion de DN1 en phase S, grâce à sa capacité de promouvoir la réplication de l'ADN [20]. Il semblerait alors que la progression du cycle cellulaire, la taille cellulaire et la synthèse protéique soient dérégulées les unes des autres dans les thymocytes DN1, possiblement par une perturbation des points de contrôles de la phase G1 [21]. Ceci entraînerait une diminution de la taille malgré l'augmentation de la traduction et de la prolifération. Inversement, une diminution coordonnée de la taille et de la synthèse protéique dans les thymocytes DN3 et DN4 pourrait indiquer un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 [22] ou même une sortie du cycle cellulaire vers la quiescence [23]. En effet, nous avons remarqué que les thymocytes SCL-LMO1 DN3 prolifèrent

significativement moins que les DN3 WT. Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer les phases du cycle cellulaire où se retrouvent les différentes populations de thymocytes SCL-LMO1 et de corrélérer cette information avec leurs tailles cellulaires et taux de synthèse protéique.

D'autre part, il a été établi que la diminution de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique corrèle avec la capacité d'auto-renouvellement dans les cellules souches germinales (GSC) [11]. Tel que mentionné précédemment, nous avons trouvé que les thymocytes DN3 et DN4 ont tous les deux une petite taille cellulaire très similaire et un taux de synthèse protéique diminué. Or, nos études antérieures ont révélé que seuls les DN3 peuvent être reprogrammés par les oncogènes SCL et LMO1 en pré-LSCs capables de s'auto-renouveler [1]. Nous proposons alors que la diminution de la synthèse protéique par les oncogènes SCL et LMO1 pourrait établir un état cellulaire propice à la reprogrammation oncogénique et par conséquent, propice à l'auto-renouvellement. Toutefois, cette reprogrammation ne serait possible qu'avec la contribution du signal physiologique élevé de NOTCH1 au stade DN3, comme nous l'avons démontré précédemment [1]. Ainsi, ceci pourrait expliquer pourquoi seuls les thymocytes DN3 peuvent acquérir une capacité d'auto-renouvellement aberrante alors que les DN4 leurs sont quasi-identiques d'un point de vu de synthèse protéique. Pour valider cette hypothèse, nous envisageons d'altérer, soit à la hausse ou à la baisse et ce par modulation pharmacologique ou génétique, le niveau de synthèse protéique dans les différentes populations de thymocytes SCL-LMO1 pré-leucémiques afin d'évaluer leurs potentiels de reconstitution thymique et d'auto-renouvellement au sein de souris receveuses. En effet, la délétion de *Pten* ou de *Rpl24* augmente ou diminue, respectivement, la synthèse protéique et dans les deux cas, perturbe les fonctions des HSCs [10], ce qui appuie cette approche expérimentale. De plus, nous avons démontré que les thymocytes pré-leucémiques SCL-LMO1 sont sensibles à l'inhibition de la biogénèse des ribosomes et de la traduction par le traitement au 2-ME2 et au PI-103. En effet, cette inhibition a provoqué une diminution de la taille cellulaire et de la synthèse protéique encore plus marquée que chez les thymocytes WT et ce, en affectant uniquement la viabilité des thymocytes SCL-LMO1. Malgré le fait que des expériences additionnelles seront nécessaires pour valider cette hypothèse, nous proposons que les thymocytes possèdent un seuil intrinsèque de tolérance envers des perturbations de la biogénèse des ribosomes et la synthèse protéique et que tout changement excédant ce seuil est délétère envers la fonction et la viabilité cellulaire.

Parallèlement, l'inhibition de la traduction cap-dépendante des ARN messagers (ARNm) pourrait également diminuer l'expression des oncogènes SCL et LMO1 et perturber l'activité oncogénique des pré-LSCs [24], tel que démontré pour l'oncogène MYC [25] qui contribue également à la reprogrammation oncogénique par SCL et LMO1 [1, 6].

4.1.4 Le rôle de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique : LPCs

La découverte que les oncogènes SCL et LMO1 diminuent la taille cellulaire, la synthèse protéique, l'expression des protéines ribosomales et la prolifération cellulaire des thymocytes pré-leucémiques, nous a ensuite poussé à nous questionner sur les propriétés des cellules propagatrices de leucémie (LPC). Tel que mentionné précédemment, 10% des cas de leucémie lymphoblastique que type T (LAL-T) pédiatrique sont caractérisés par des mutations récurrentes au sein des gènes des protéines ribosomales *RPL5* et *RPL10* [15] alors qu'un autre 10% présentent des mutations de *RPL22* [17], et que des mutations rares de *RPL11* ont été trouvées dans certains cas de rechute [16]. D'autre part, il est maintenant largement accepté que l'hyperprolifération des cellules cancéreuses nécessite simultanément une augmentation du nombre de ribosomes et une augmentation globale de la synthèse protéique [13]. Par conséquent, ces propriétés définissent le potentiel tumorigénique des cellules cancéreuses via le contrôle de la taille et de la prolifération cellulaire.

À la lueur de ces données, il n'est donc pas surprenant que nous avons trouvé que les thymocytes SCL-LMO1 leucémiques possèdent une plus grande taille cellulaire couplée à une augmentation de la synthèse protéique et de l'expression des protéines ribosomales, ce qui résulte en une augmentation de la prolifération cellulaire. De façon plus intéressante, nous avons remarqué que l'augmentation de la synthèse protéique corrèle avec une abolition du blocage partiel de différenciation qui survient au stade DN3 dans les thymocytes pré-leucémiques. Ainsi, les thymocytes leucémiques peuvent dorénavant se différencier jusqu'au stade ISP8 et nous proposons que l'augmentation de la synthèse protéique favorise cette différenciation, tel que démontré pour les cellules souches germinales (GSC) [11]. Par ailleurs, compte tenu de la fréquence de mutations activatrices de *NOTCH1* dans les LAL-T [26], il est fort probable que cet oncogène soit impliqué directement ou indirectement dans la régulation positive de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique [27] observée dans les thymocytes

SCL-LMO1 leucémiques. En effet, NOTCH1 active directement des programmes transcriptionnels qui favorisent la croissance cellulaire et la prolifération tumorigénique [28] en augmentant l'expression de nombreux gènes impliqués dans des processus anaboliques tels que la biogénèse des ribosomes, la synthèse protéique, et le métabolisme des nucléotides et des acides aminés [29]. De façon plus intéressante, l'inactivation de NOTCH1 par l'usage d'inhibiteurs de la gamma-sécrétase (GSI) provoque une diminution de la croissance cellulaire qui corrèle avec une diminution de la taille cellulaire et un arrêt de cycle cellulaire en phase G1 [29, 30]. Plus récemment, il a également été démontré que la combinaison de GSIs et d'inhibiteurs de la synthèse protéique exerce un effet synergique anti-leucémique très important pour le traitement de la LAL-T induite par NOTCH1 [31]. Parallèlement, il est également connu que NOTCH1 active MYC [30] et la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR [32], qui ont tous les deux été impliqués dans la biogénèse des ribosomes [33, 34] et l'homéostasie des HSCs [35, 36]. D'après l'ensemble de ces données, NOTCH1 possède donc un rôle important dans l'établissement et le maintien de l'état leucémique franc, et ce dernier serait dépendant du niveau d'expression de NOTCH1 en plus du taux de synthèse protéique. Par conséquent, il serait intéressant d'effectuer les expériences de taille cellulaire et de synthèse protéique sur des thymocytes provenant de souris transgénique sur-exprimant NOTCH1 seul [37] et de souris triple-transgéniques pour SCL-LMO1-NOTCH1 qui développent des LAL-T très précocement [2]. Ceci nous permettrait de déterminer la contribution de NOTCH1 à la régulation ribosomale et traductionnelle au stade pré-leucémique et leucémique, respectivement.

4.1.5 Le modèle de régulation ribosomale et traductionnelle par SCL

Grâce à ces nouveaux résultats et nos travaux antérieurs, nous proposons alors un modèle de régulation ribosomale et traductionnelle médiée par SCL dans les cellules souches hématopoïétiques (HSC) normales et pré-leucémiques (pré-LSC) (**Figure A1**). Ainsi, lorsqu'exprimé normalement dans la moelle osseuse, SCL diminue la taille cellulaire, la synthèse protéique et l'expression des protéines ribosomales des HSCs afin de maintenir leurs fonctions d'auto-renouvellement et de quiescence. Or, l'expression ectopique de SCL et LMO1 provoque la reprogrammation oncogénique des thymocytes DN3 en pré-LSCs, une étape qui est caractérisée par la diminution de la taille cellulaire, de la synthèse protéique et de l'expression

des protéines ribosomales. Ceci crée un état cellulaire favorable à l'auto-renouvellement et la faible prolifération, promeut la sélection clonale des pré-LSCs et initie la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T). Finalement, l'acquisition de mutations activatrices de *NOTCH1* résulte en l'augmentation de la taille cellulaire, de la synthèse protéique et de l'expression des protéines ribosomales, et transforme les pré-LSCs en cellules propagatrices de leucémique (LPC) ISP8. Les LPCs acquièrent alors un potentiel prolifératif quasi-illimité, ce qui promeut leur expansion et mène à la progression de la LAL-T.

4.1.6 Le mécanisme de répression ribosomale et traductionnelle par SCL

Nos travaux nous ont permis d'établir que SCL diminue l'expression des protéines ribosomales dans les cellules souches hématopoïétiques primaires en se liant aux promoteurs de ces gènes. De plus, nous avons trouvé que SCL est présent aux promoteurs d'autres gènes impliqués dans l'initiation et l'élongation de la traduction, la formation de polysomes, et la synthèse et maturation des ARN ribosomaux. De façon intéressante, nous avons remarqué que SCL se liait 10 fois moins sur tous les promoteurs impliqués dans la biogénèse des ribosomes et la traduction lorsque comparés à ceux de gènes régulés positivement par SCL [1, 9, 38]. Ceci suggère que cette répression transcriptionnelle pourrait être médiée par un mécanisme de régulation différent de celui que nous avons identifié auparavant [39]. Afin d'établir si SCL peut médier la répression transcriptionnelle de ces gènes sans son partenaire nucléaire habituel, LMO1/2, nous envisageons effectuer les expériences de taille cellulaire et de synthèse protéique sur des thymocytes provenant de souris co-exprimant le mutant SCL-M13 et LMO1 [40]. Plus précisément, ce mutant est incapable d'interagir avec LMO1/2 malgré le fait qu'il peut tout de même inhiber les protéines E2A/HEB, et de façon plus importante, diminue la capacité d'auto-renouvellement et de reconstitution thymique des thymocytes pré-leucémiques [1].

D'autre part, il se peut également que SCL se lie à l'ADN dans un contexte autre que par des boîtes E (CANNTG). En effet, lors de l'analyse des données de ChIP-Seq effectués dans les cellules HPC7, nous avons remarqué une forte fréquence de co-occupation des promoteurs des gènes *Rpl* et *Rps* par SCL, FLI1 et ERG (données non-présentées). D'autre part, nous avons observé une interaction entre ces protéines lors d'une d'un criblage double-hybride en levure effectué antérieurement [20]. FLI1 et ERG appartiennent à la famille de facteurs de transcription

ETS (*Erythroblast transformation-specific*) impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation et la transformation cellulaire [41]. Plus récemment, ils ont été caractérisés en tant qu'oncogènes dans la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T) [42, 43], et de façon plus intéressante, FLI1 a été impliqué dans la régulation de la biogénèse des ribosomes [44]. Nous envisageons donc de valider les données de CHIP-seq pour FLI1 et ERG dans les HPC7, comme nous l'avons fait pour SCL, et de caractériser leurs effets individuels ou combinés sur le niveau d'expression des gènes de protéines ribosomales grâce à des expériences transcriptionnelles avec un gène rapporteur luciférase. Selon la littérature, FLI1 [44], et potentiellement ERG, agissent en tant que régulateurs positifs de l'expression des protéines ribosomales tandis que nos données ont caractérisé SCL comme étant un régulateur négatif de celle-ci. Ainsi, nous proposons un mécanisme de régulation transcriptionnelle où le recrutement de SCL aux promoteurs de ces gènes vient tempérer l'expression basale des protéines ribosomales.

Parallèlement, certains facteurs épigénétiques, incluant JHDM1B [45], DNMT3b [46] et le complexe de remodelage nucléolaire NoRC [47], ont déjà été impliqués dans la régulation négative de la biogénèse des ribosomes. Par conséquent, nous évaluerons par CHIP la présence de marques épigénétiques répressives, incluant la méthylation de l'ADN et/ou des histones (ex. H3K27me3 et H3K9me2), ou la diminution de marques activatrices, telles que H3K4me3, H3Kac et H4Kac, aux régions promotrices des gènes ribosomaux. Ainsi, l'identification de ces marques épigénétiques pourrait révéler que la diminution de leur expression est médiée par le recrutement de co-répresseurs par SCL. Jusqu'à présent, il n'a pas été démontré que SCL peut interagir avec les facteurs nommés ci-dessus mais il serait envisageable d'effectuer des expériences de co-immunoprécipitation protéique (Co-IP) et de purification d'affinité en tandem (TAP-tag) afin d'évaluer l'existence de ces interactions. Toutefois, il est connu que SCL peut interagir avec plusieurs autres facteurs épigénétiques co-répresseurs tels que ETO2 [48], LSD1 [49], HDAC1/2 et mSin3A [50], SUV39H1 [51] et BRG1 [52]. De façon intéressante, plusieurs d'entre eux interagissent ensemble et se retrouvent au sein de certains complexes répresseurs multi-protéiques, dont les complexes NuRD, CoREST et N-CoR [53, 54]. Il serait donc intéressant de déterminer si SCL et ses partenaires co-répresseurs connus sont impliqués de façon similaire dans la régulation épigénétique négative de la biogénèse des ribosomes.

4.2 LA REPROGRAMMATION ONCOGÉNIQUE PAR MLL-AF6

4.2.1 La mise à jour de nos connaissances et la problématique actuelle

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) associées à l'oncogène MLL sont causées par divers réarrangements chromosomiques impliquant une panoplie de protéines nucléaires et cytoplasmiques [55]. En effet, plus de 70 partenaires protéiques de MLL ont été identifiés au cours des dernières années [56]. Or, la majorité de ces réarrangements chromosomiques surviennent dans la région BCR (*Breakpoint cluster region*) de MLL et ce, indépendamment du type de gène impliqué dans le réarrangement [55]. De plus, alors que de nombreux mécanismes moléculaires basés sur la régulation transcriptionnelle ont été proposés pour expliquer la leucémogénèse induite par les partenaires nucléaires de MLL, il est fort improbable que des protéines cytoplasmiques puissent également avoir de telles fonctions [57]. D'ailleurs, il existe même deux modèles d'études contradictoires dans le contexte de la LAM induite par l'oncogène MLL-AF6, qui résulte d'un réarrangement entre MLL et la protéine cytoplasmique AF6. En effet, le premier modèle postule que la séquestration de AF6 au noyau provoque l'activation constitutive de RAS et promeut la transformation cellulaire en augmentant la croissance et la prolifération cellulaire [58]. Tandis que le second modèle propose que la dimérisation de la protéine de fusion MLL-AF6 active son potentiel oncogénique et induit l'immortalisation des progéniteurs myéloïdes *in vitro* et la leucémogénèse *in vivo* [59]. À la lueur de ces données, la deuxième partie de ce projet de recherche de maîtrise (Chapitre 3), qui fût mené en collaboration avec le Dr Matthew J. Smith, avait alors pour but de réconcilier les discordances entre les mécanismes oncogéniques de MLL-AF6 découverts jusqu'à présent.

4.2.2 Le rôle de la dimérisation de MLL-AF6

L'étude de la capacité de dimérisation de certaines protéines de fusion MLL est relativement répandue dans le domaine de la recherche sur les LAM [60]. Toutefois, les mécanismes moléculaires par lesquels la dimérisation induit la transformation des progéniteurs myéloïdes demeurent toujours méconnus. Par conséquent, les travaux initiaux du Dr Smith ont été concentrés sur la caractérisation des bases structurelles et biochimiques associées à la protéine de fusion MLL-AF6. Ceci nous a permis de découvrir que AF6 se lie efficacement à RAS grâce

à une hélice alpha très conservée et située dans la région N-terminale du premier domaine d'association à RAS (RA1). De façon surprenante, tous les réarrangements chromosomiques de MLL-AF6 provoquent la délétion de l'exon 1 de AF6, qui code pour cette hélice alpha. Ainsi, ces premiers résultats réfutent immédiatement le modèle d'hyperactivation de RAS par MLL-AF6 [58]. Par la suite, nous avons établi que seule la perte de l'hélice alpha est suffisante pour induire la dimérisation de la protéine de fusion MLL-AF6 car elle résulte en l'exposition de résidus hydrophobes qui créent une surface dimérisable [61]. Remarquablement, la réinsertion de cette hélice alpha empêche la dimérisation de MLL-AF6. Ces travaux nous ont alors permis d'identifier le mécanisme structurel contribuant à la dimérisation de l'oncogène MLL-AF6, ce qui nous a ensuite mené à étudier son rôle dans la reprogrammation oncogénique et la leucémogénèse [59].

Pour ce faire, nous avons effectué des essais fonctionnels et quantitatifs de formation de colonies en méthylcellulose et de transplantations sériées en employant des cellules hématopoïétiques primaires transformées par infection rétrovirale. Celles-ci exprimaient soit le vecteur vide, la région N-terminale de AF6 seule (AF6^{NCR}; monomère), la forme sauvage de la protéine de fusion MLL-AF6 (MLL-AF6^{NCR}; dimère), le dimère de AF6 fusionné à MLL (MLL-AF6^{RA1}) ou le monomère de AF6 contenant l'hélice alpha fusionné à MLL (MLL-AF6 ^{α N/RA1}). Grâce à ces essais, nous avons pu établir que seuls les dimères de MLL-AF6 peuvent conférer une capacité d'auto-renouvellement aberrante aux progéniteurs hématopoïétiques. En effet, les cellules exprimant le monomère ont été épuisées lors de la seconde culture sériée, tel le cas des cellules contrôles non-transformées. De façon plus importante, la réinsertion de l'hélice alpha au sein de MLL-AF6 a complètement abrogé la leucémogénèse chez des souris receveuses alors que la dimérisation de MLL-AF6 a rapidement induit une leucémie myéloïde très agressive et invasive. Par conséquent, ces résultats démontrent clairement que la dimérisation est essentielle pour l'activation du potentiel oncogénique de la protéine de fusion MLL-AF6.

D'un point de vue mécanistique, il est connu que MLL possède une capacité de dimérisation intrinsèque qui est médiée par ses domaines PHD [62]. Or, ces derniers sont exclus des protéines de fusion MLL. Ainsi, nous avons proposé que la dimérisation de MLL-AF6, provoquée par la perte de l'hélice alpha N-terminale, puisse rétablir ce potentiel de dimérisation et permettre

l'activation du réseau transcriptionnel oncogénique de MLL [63]. En accord avec cette hypothèse, nos données de protéomique ont révélé que seule la forme dimérique de MLL-AF6 est capable de recruter des complexes protéiques similaires à ceux associés aux protéines de fusion impliquant des facteurs de transcription nucléaires [64]. Par conséquent, la dimérisation confère aux protéines de fusion impliquant des partenaires cytoplasmiques les mêmes propriétés de transformation par régulation génique. De façon intéressante, nous avons trouvé, par des analyses bio-informatiques, que la majorité des partenaires cytoplasmiques de MLL possèdent des domaines pouvant permettre leur dimérisation ou oligomérisation. Ceci infère qu'il pourrait alors s'agir d'un mécanisme moléculaire quasi-universel parmi les réarrangements chromosomiques entre MLL et des protéines cytoplasmiques. Il serait donc intéressant de valider ces observations par les mêmes analyses structurales, biochimiques et fonctionnelles que nous avons effectuées pour MLL-AF6.

Globalement, ces découvertes ouvrent la possibilité de développer de nouvelles approches thérapeutiques pouvant inhiber la dimérisation des protéines de fusion MLL car, comme nous l'avons démontré, cette inhibition abroge complètement la reprogrammation oncogénique et la leucémogénèse. Nous pouvons alors imaginer l'usage de petites molécules pharmacologiques [65] ou même de peptides hélicoïdaux (*Stapled-helices*) [66] qui pourraient interférer avec la surface de dimérisation et donc inhiber l'activité oncogénique de MLL. Alternativement, il serait également possible de cibler spécifiquement une des composantes du réseau transcriptionnel des protéines de fusion MLL qui est essentielle pour son activité oncogénique, telle que DOT1L [67-69].

4.3 LES MÉCANISMES COMMUNS DE REPROGRAMMATION ONCOGÉNIQUE

4.3.1 L'auto-renouvellement

L'importance de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques normales a été soulignée à maintes reprises durant les dernières années. Malgré le fait que les HSCs représentent une population de cellules de la moelle osseuse très rare [70], l'auto-renouvellement contribue significativement à leur capacité de maintenir l'entièreté du système hématopoïétique durant toute la vie d'un individu [71]. D'autre part, elle est exploitée en

clinique dans le contexte de transplantations autologues ou allogéniques de cellules souches hématopoïétiques [72], notamment pour le traitement des leucémies aiguës. Cependant, la propriété d'auto-renouvellement peut s'avérer hautement oncogénique si elle est dérégulée dans les HSCs et, de façon plus importante, si elle est conférée aux progéniteurs hématopoïétiques normalement incapables de s'auto-renouveler [73]. En effet, ce processus de reprogrammation oncogénique entraîne l'émergence de cellules souches pré-leucémiques et leucémiques pouvant, respectivement, initier et soutenir la leucémogénèse. L'objectif premier de ce projet de recherche de maîtrise était alors d'élucider davantage les mécanismes moléculaires contribuant à l'acquisition des propriétés d'auto-renouvellement induite par les oncogènes SCL et LMO1 et MLL-AF6 impliqués dans deux types de leucémies aiguës.

Nos travaux présentés dans les Chapitres 2 et 3 ont souligné l'importante contribution de l'auto-renouvellement lors du processus de reprogrammation oncogénique. Ainsi, nous avons identifié deux nouveaux mécanismes moléculaires exploités par les oncogènes SCL et LMO1 dans la leucémie aiguë lymphoblastique de type T, et par la protéine de fusion MLL-AF6 dans la leucémie aiguë myéloïde. Dans un premier temps, SCL et LMO1 diminue la biogénèse des ribosomes et la synthèse protéique dans les thymocytes pré-leucémiques, ce qui favorise un état cellulaire propice à la reprogrammation oncogénique et à l'acquisition de propriétés d'auto-renouvellement et de quasi-quiescence. Alors que MLL-AF6 reprogramme les progéniteurs myéloïdes en activant un programme transcriptionnel oncogénique grâce à sa capacité de dimériser, qui est médiée par la délétion d'une hélice alpha N-terminale lors du réarrangement chromosomique entre MLL et AF6. Remarquablement, ces deux modèles, malgré leurs différences apparentes, convergent vers une dépendance sur l'auto-renouvellement afin d'induire la leucémogénèse. Ceci pourrait alors suggérer l'existence de mécanismes moléculaires communs parmi les nombreux oncogènes des leucémies aiguës.

4.3.2 La biogénèse des ribosomes et la synthèse protéique ?

Depuis quelques années, le ribosome et la traduction sont de moins en moins considérés comme une machinerie et un processus régulé de façon constitutive et imperturbable au sein de la cellule [74]. En effet, il a été démontré que différents oncogènes et suppresseurs de tumeurs peuvent réguler directement la biogénèse des ribosomes et/ou la synthèse protéique dans le contexte du

cancer [13]. Précédemment, chez certaines leucémies, NPM1 [75], RUNX1 [18] et PHF6 [76] ont tous été identifiés comme régulateurs positifs (NPM1 et RUNX1) ou négatifs (PHF6) de ces processus et maintenant, nos travaux ont ajouté les oncogènes SCL et LMO1 à cette liste en tant que régulateurs négatifs. Par conséquent, nous avons voulu déterminer si les autres oncogènes que nous étudions ont cette même capacité de réguler la biogénèse des ribosomes et la synthèse protéique.

Un de ces oncogènes est la protéine de fusion NUP98-PHF23 qui résulte d'un réarrangement chromosomique [77] et qui est associée à la fois à des cas de LAL-T et de LAM [78]. Précédemment, d'autres groupes ont démontré que l'expression de NUP98-PHF23 inhibe la différenciation cellulaire en activant divers gènes *HOX* par un mécanisme de remodelage de la chromatine via le domaine PHD de PHF23 [78-80]. Plus récemment, nous avons trouvé que l'oncogène NUP98-PHF23 reprogramme la population de thymocytes DN2 en cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC) possédant des capacités d'auto-renouvellement aberrantes (Gerby et al. 2017; en préparation) et pouvant initier la leucémogénèse. De façon intéressante, cette reprogrammation oncogénique est médiée par un mécanisme moléculaire similaire à celui que nous avons caractérisé pour SCL et LMO1, soit par l'activation transcriptionnelle d'une signature génique « souche ». Compte tenu de nos nouvelles découvertes pour SCL et LMO1, nous avons donc évalué la taille cellulaire et la synthèse protéique dans les thymocytes NUP98-PHF23 pré-leucémiques. Remarquablement, nous avons observé une diminution globale de la taille des thymocytes totaux provenant de souris NUP98-PHF23 pré-leucémiques (pré-LK) (**Figure A2A**). Ceci s'est traduit par une diminution modeste (6-12%) mais significative de la taille des thymocytes DN2, DN4 et ISP8 lorsque comparés aux thymocytes de type sauvage (WT) (**Figure A2B**). D'autre part, des résultats préliminaires indiquent que la diminution de la taille cellulaire est accompagnée par une diminution globale du taux d'incorporation d'OP-Puromycine (OP-Puro) *in vitro* dans les thymocytes pré-LK (**Figure A2C**), et que cette dernière est également marquée de façon significative dans les populations DN2, DN4 et ISP8 (**Figure A2D**). Ainsi, nos résultats démontrent que, malgré le fait que les oncogènes SCL et LMO1 et NUP98-PHF23 reprogramment des populations de thymocytes différentes, les pré-LSCs résultantes ont généralement une taille cellulaire et une synthèse protéique diminuée (**Figure A2E**).

Parallèlement, nous avons démontré qu'au stade leucémique (LK), les thymocytes SCL-LMO1 ont une taille cellulaire augmentée par rapport aux thymocytes WT et que celle-ci est notamment marquée dans la population ISP8, où se retrouvent les cellules propagatrices de leucémie (LPC) (**Figure A2F**). De façon intéressante, nous avons remarqué que les progéniteurs myéloïdes transformés en LPCs par l'oncogène MLL-AF6 ont également une augmentation de leur taille cellulaire (**Figure A2G**; résultats préliminaires). De plus, comme nous l'avons présenté au Chapitre 3, MLL-AF6 s'associe principalement à des protéines nucléolaires impliquées dans la biogénèse des ribosomes et la synthèse et maturation des ARN.

Globalement, ces données suggèrent que la régulation de la synthèse protéique, et possiblement de la biogénèse des ribosomes, pourrait être un mécanisme moléculaire de reprogrammation oncogénique commun et exploité par divers oncogènes des leucémies aiguës.

4.4 CONCLUSION

Malgré que le processus de leucémogénèse puisse différer parmi les différents sous-types de leucémies aiguës, la reprogrammation oncogénique demeure essentielle pour l'initiation de la leucémie. En effet, plusieurs oncogènes reprogramment des progéniteurs hématopoïétiques en leur conférant des capacités d'auto-renouvellement aberrantes. Ainsi, ces cellules reprogrammées peuvent persister d'avantage *in vivo* et acquérir des mutations secondaires menant au développement de la leucémie ou même à la rechute. L'objectif de ce projet de recherche de maîtrise était alors d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires contribuant à l'auto-renouvellement et la reprogrammation oncogénique.

Dans le contexte de la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T), nous avons démontré précédemment que les oncogènes SCL et LMO1 activent un programme transcriptionnel d'auto-renouvellement au sein des progéniteurs thymiques, ce qui mène à la reprogrammation et au développement de la leucémie. Maintenant, nous avons identifié un nouveau mécanisme complémentaire qui implique une répression transcriptionnelle de l'expression des protéines ribosomales dans les thymocytes pré-leucémiques et qui résulte en une diminution de la taille cellulaire et de la synthèse protéique. Ceci est associé à un faible taux de prolifération et une capacité d'auto-renouvellement aberrante, ce qui contribue globalement à la reprogrammation

oncogénique par SCL et LMO1, à l'émergence et à la sélection clonale des cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC). D'autre part, nous avons trouvé que suivant l'acquisition de mutations activatrices de *NOTCH1*, les thymocytes pré-leucémiques subissent une augmentation de la taille cellulaire, de la synthèse protéique et de l'expression des protéines ribosomales. Ceci suggère qu'une transition de faible à haut taux de synthèse protéique est essentielle pour la prolifération et l'expansion des cellules propagatrices de leucémie (LPC), ce qui contribue à la progression de la leucémie.

Dans le contexte de la leucémie aiguë myéloïde (LAM), nous avons découvert que les réarrangements chromosomiques de MLL-AF6 provoquent la perte d'une hélice alpha normalement conservée dans la région N-terminale du premier domaine d'association à RAS (RA1) de la protéine AF6. Des études structurales et biochimiques ont révélé que ceci induit la dimérisation de MLL-AF6, et des études fonctionnelles ont ensuite démontré que cette dimérisation est essentielle pour la reprogrammation oncogénique et l'auto-renouvellement des progéniteurs myéloïdes. Remarquablement, seule la réinsertion de l'hélice alpha est suffisante pour empêcher la dimérisation de MLL-AF6, ce qui abroge complètement l'auto-renouvellement et la leucémogénèse.

Globalement, ces résultats démontrent que l'auto-renouvellement est un facteur déterminant de la reprogrammation oncogénique dans les leucémies aiguës. L'identification de deux nouveaux mécanismes moléculaires contribuant à cette reprogrammation pourrait s'avérer prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses.

4.5 RÉFÉRENCES

1. Gerby, B., C.S. Tremblay, M. Tremblay, S. Rojas-Sutterlin, S. Herblot, J. Hebert, G. Sauvageau, S. Lemieux, E. Lecuyer, D.F. Veiga, and T. Hoang (2014). SCL, LMO1 and Notch1 Reprogram Thymocytes into Self-Renewing Cells. *PLoS Genet.* **10**(12): p. e1004768.
2. Tremblay, M., C.S. Tremblay, S. Herblot, P.D. Aplan, J. Hebert, C. Perreault, and T. Hoang (2010). Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes Dev.* **24**(11): p. 1093-105.
3. Ramalho-Santos, M., S. Yoon, Y. Matsuzaki, R.C. Mulligan, and D.A. Melton (2002). "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science.* **298**(5593): p. 597-600.

4. Krivtsov, A.V., D. Twomey, Z. Feng, M.C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J.E. Levine, J. Wang, W.C. Hahn, D.G. Gilliland, T.R. Golub, and S.A. Armstrong (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. **442**(7104): p. 818-22.
5. McCormack, M.P., L.F. Young, S. Vasudevan, C.A. de Graaf, R. Codrington, T.H. Rabbitts, S.M. Jane, and D.J. Curtis (2010). The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science*. **327**(5967): p. 879-83.
6. Gerby, B., D.F. Veiga, J. Kros, S. Nourredine, J. Ouellette, A. Haman, G. Lavoie, I. Fares, M. Tremblay, V. Litalien, E. Ottoni, M. Kosic, D. Geoffrion, J. Ryan, P.S. Maddox, J. Chagraoui, A. Marinier, J. Hebert, G. Sauvageau, B.H. Kwok, P.P. Roux, and T. Hoang (2016). High-throughput screening in niche-based assay identifies compounds to target preleukemic stem cells. *J Clin Invest*. **126**(12): p. 4569-4584.
7. Corces-Zimmerman, M.R. and R. Majeti (2014). Pre-leukemic evolution of hematopoietic stem cells: the importance of early mutations in leukemogenesis. *Leukemia*. **28**(12): p. 2276-82.
8. O'Brien, C.A., A. Kreso, and C.H. Jamieson (2010). Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res*. **16**(12): p. 3113-20.
9. Lacombe, J., S. Herblot, S. Rojas-Sutterlin, A. Haman, S. Barakat, N.N. Iscove, G. Sauvageau, and T. Hoang (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood*. **115**(4): p. 792-803.
10. Signer, R.A., J.A. Magee, A. Salic, and S.J. Morrison (2014). Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature*. **509**(7498): p. 49-54.
11. Sanchez, C.G., F.K. Teixeira, B. Czech, J.B. Preall, A.L. Zamparini, J.R. Seifert, C.D. Malone, G.J. Hannon, and R. Lehmann (2016). Regulation of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis Controls Germline Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell*. **18**(2): p. 276-90.
12. Van Zant, G. (1984). Studies of hematopoietic stem cells spared by 5-fluorouracil. *J Exp Med*. **159**(3): p. 679-90.
13. Silvera, D., S.C. Formenti, and R.J. Schneider (2010). Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer*. **10**(4): p. 254-66.
14. Narla, A. and B.L. Ebert (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*. **115**(16): p. 3196-205.
15. De Keersmaecker, K., Z.K. Atak, N. Li, C. Vicente, S. Patchett, T. Girardi, V. Gianfelici, E. Geerdens, E. Clappier, M. Porcu, I. Lahortiga, R. Luca, J. Yan, G. Hulselmans, H. Vranckx, R. Vandepoel, B. Sweron, K. Jacobs, N. Mentens, I. Wlodarska, B. Cauwelier, J. Cloos, J. Soulier, A. Uyttebroeck, C. Bagni, B.A. Hassan, P. Vandenberghe, A.W. Johnson, S. Aerts, and J. Cools (2013). Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. **45**(2): p. 186-90.
16. Tzoneva, G., A. Perez-Garcia, Z. Carpenter, H. Khiabani, V. Tosello, M. Allegretta, E. Paietta, J. Racevskis, J.M. Rowe, M.S. Tallman, M. Paganin, G. Basso, J. Hof, R. Kirschner-Schwabe, T. Palomero, R. Rabadan, and A. Ferrando (2013). Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med*. **19**(3): p. 368-71.
17. Rao, S., S.Y. Lee, A. Gutierrez, J. Perrigoue, R.J. Thapa, Z. Tu, J.R. Jeffers, M. Rhodes, S. Anderson, T. Oravec, S.P. Hunger, R.A. Timakhov, R. Zhang, S.

- Balachandran, G.P. Zambetti, J.R. Testa, A.T. Look, and D.L. Wiest (2012). Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. *Blood*. **120**(18): p. 3764-73.
18. Cai, X., L. Gao, L. Teng, J. Ge, Z.M. Oo, A.R. Kumar, D.G. Gilliland, P.J. Mason, K. Tan, and N.A. Speck (2015). Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell*. **17**(2): p. 165-77.
 19. Herblot, S., A.M. Steff, P. Hugo, P.D. Aplan, and T. Hoang (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol*. **1**(2): p. 138-44.
 20. Sincennes, M.C., M. Humbert, B. Grondin, V. Lisi, D.F. Veiga, A. Haman, C. Cazaux, N. Mashtalir, B. Affar el, A. Verreault, and T. Hoang (2016). The LMO2 oncogene regulates DNA replication in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **113**(5): p. 1393-8.
 21. Barnum, K.J. and M.J. O'Connell (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol*. **1170**: p. 29-40.
 22. Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. **246**(4930): p. 603-8.
 23. Valcourt, J.R., J.M. Lemons, E.M. Haley, M. Kojima, O.O. Demuren, and H.A. Collier (2012). Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle*. **11**(9): p. 1680-96.
 24. Girardi, T. and K. De Keersmaecker (2015). T-ALL: ALL a matter of Translation? *Haematologica*. **100**(3): p. 293-5.
 25. Wolfe, A.L., K. Singh, Y. Zhong, P. Drewe, V.K. Rajasekhar, V.R. Sanghvi, K.J. Mavrikakis, M. Jiang, J.E. Roderick, J. Van der Meulen, J.H. Schatz, C.M. Rodrigo, C. Zhao, P. Rondou, E. de Stanchina, J. Teruya-Feldstein, M.A. Kelliher, F. Speleman, J.A. Porco, Jr., J. Pelletier, G. Ratsch, and H.G. Wendel (2014). RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer. *Nature*. **513**(7516): p. 65-70.
 26. Weng, A.P., A.A. Ferrando, W. Lee, J.P.t. Morris, L.B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S.C. Blacklow, A.T. Look, and J.C. Aster (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. **306**(5694): p. 269-71.
 27. Tzoneva, G. and A.A. Ferrando (2012). Recent advances on NOTCH signaling in T-ALL. *Curr Top Microbiol Immunol*. **360**: p. 163-82.
 28. Sanchez-Martin, M. and A. Ferrando (2017). The NOTCH1-MYC highway toward T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **129**(9): p. 1124-1133.
 29. Palomero, T., W.K. Lim, D.T. Odom, M.L. Sulis, P.J. Real, A. Margolin, K.C. Barnes, J. O'Neil, D. Neuberg, A.P. Weng, J.C. Aster, F. Sigaux, J. Soulier, A.T. Look, R.A. Young, A. Califano, and A.A. Ferrando (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(48): p. 18261-6.
 30. Weng, A.P., J.M. Millholland, Y. Yashiro-Ohtani, M.L. Arcangeli, A. Lau, C. Wai, C. Del Bianco, C.G. Rodriguez, H. Sai, J. Tobias, Y. Li, M.S. Wolfe, C. Shachaf, D. Felsher, S.C. Blacklow, W.S. Pear, and J.C. Aster (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev*. **20**(15): p. 2096-109.

31. Sanchez-Martin, M., A. Ambesi-Impiombato, Y. Qin, D. Herranz, M. Bansal, T. Girardi, E. Paietta, M.S. Tallman, J.M. Rowe, K. De Keersmaecker, A. Califano, and A.A. Ferrando (2017). Synergistic antileukemic therapies in NOTCH1-induced T-ALL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114**(8): p. 2006-2011.
32. Chan, S.M., A.P. Weng, R. Tibshirani, J.C. Aster, and P.J. Utz (2007). Notch signals positively regulate activity of the mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* **110**(1): p. 278-86.
33. van Riggelen, J., A. Yetil, and D.W. Felsher (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer.* **10**(4): p. 301-9.
34. Mayer, C. and I. Grummt (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene.* **25**(48): p. 6384-91.
35. Wilson, A., M.J. Murphy, T. Oskarsson, K. Kaloulis, M.D. Bettess, G.M. Oser, A.C. Pasche, C. Knabenhans, H.R. Macdonald, and A. Trumpp (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* **18**(22): p. 2747-63.
36. Gan, B., E. Sahin, S. Jiang, A. Sanchez-Aguilera, K.L. Scott, L. Chin, D.A. Williams, D.J. Kwiatkowski, and R.A. DePinho (2008). mTORC1-dependent and -independent regulation of stem cell renewal, differentiation, and mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(49): p. 19384-9.
37. Fowlkes, B.J. and E.A. Robey (2002). A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development. *J Immunol.* **169**(4): p. 1817-21.
38. Lacombe, J., G. Krosl, M. Tremblay, B. Gerby, R. Martin, P.D. Aplan, S. Lemieux, and T. Hoang (2013). Genetic interaction between Kit and Scl. *Blood.* **122**(7): p. 1150-61.
39. Lahlil, R., E. Lecuyer, S. Herblot, and T. Hoang (2004). SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol Cell Biol.* **24**(4): p. 1439-52.
40. Lecuyer, E., S. Lariviere, M.C. Sincennes, A. Haman, R. Lahlil, M. Todorova, M. Tremblay, B.C. Wilkes, and T. Hoang (2007). Protein stability and transcription factor complex assembly determined by the SCL-LMO2 interaction. *J Biol Chem.* **282**(46): p. 33649-58.
41. Sementchenko, V.I. and D.K. Watson (2000). Ets target genes: past, present and future. *Oncogene.* **19**(55): p. 6533-48.
42. Smeets, M.F., A.C. Chan, S. Dagger, C.K. Bradley, A. Wei, and D.J. Izon (2013). Fli-1 overexpression in hematopoietic progenitors deregulates T cell development and induces pre-T cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma. *PLoS One.* **8**(5): p. e62346.
43. Thoms, J.A., Y. Birger, S. Foster, K. Knezevic, Y. Kirschenbaum, V. Chandrakanthan, G. Jonquieres, D. Spensberger, J.W. Wong, S.H. Oram, S.J. Kinston, Y. Groner, R. Lock, K.L. MacKenzie, B. Gottgens, S. Izraeli, and J.E. Pimanda (2011). ERG promotes T-acute lymphoblastic leukemia and is transcriptionally regulated in leukemic cells by a stem cell enhancer. *Blood.* **117**(26): p. 7079-89.
44. Juban, G., G. Giraud, B. Guyot, S. Belin, J.J. Diaz, J. Starck, C. Guillouf, F. Moreau-Gachelin, and F. Morle (2009). Spi-1 and Fli-1 directly activate common target genes involved in ribosome biogenesis in Friend erythroleukemic cells. *Mol Cell Biol.* **29**(10): p. 2852-64.

45. Frescas, D., D. Guardavaccaro, F. Bassermann, R. Koyama-Nasu, and M. Pagano (2007). JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature*. **450**(7167): p. 309-13.
46. Schmitz, K.M., C. Mayer, A. Postepska, and I. Grummt (2010). Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes Dev*. **24**(20): p. 2264-9.
47. Santoro, R., J. Li, and I. Grummt (2002). The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet*. **32**(3): p. 393-6.
48. Goardon, N., J.A. Lambert, P. Rodriguez, P. Nissaire, S. Herblot, P. Thibault, D. Dumenil, J. Strouboulis, P.H. Romeo, and T. Hoang (2006). ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J*. **25**(2): p. 357-66.
49. Hu, X., X. Li, K. Valverde, X. Fu, C. Noguchi, Y. Qiu, and S. Huang (2009). LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**(25): p. 10141-6.
50. Huang, S. and S.J. Brandt (2000). mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Mol Cell Biol*. **20**(6): p. 2248-59.
51. Wen, J., S. Huang, S.D. Pack, X. Yu, S.J. Brandt, and C.T. Noguchi (2005). Tall/SCL binding to pericentromeric DNA represses transcription. *J Biol Chem*. **280**(13): p. 12956-66.
52. Xu, Z., X. Meng, Y. Cai, M.J. Koury, and S.J. Brandt (2006). Recruitment of the SWI/SNF protein Brg1 by a multiprotein complex effects transcriptional repression in murine erythroid progenitors. *Biochem J*. **399**(2): p. 297-304.
53. Amente, S., L. Lania, and B. Majello (2013). The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs. *Biochim Biophys Acta*. **1829**(10): p. 981-6.
54. Wang, J., T. Hoshino, R.L. Redner, S. Kajigaya, and J.M. Liu (1998). ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(18): p. 10860-5.
55. Aplan, P.D. (2006). Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms. *DNA Repair (Amst)*. **5**(9-10): p. 1265-72.
56. Krivtsov, A.V. and S.A. Armstrong (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. **7**(11): p. 823-33.
57. Dimartino, J.F. and M.L. Cleary (1999). Mll rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br J Haematol*. **106**(3): p. 614-26.
58. Manara, E., E. Baron, C. Tregnago, S. Aveic, V. Bisio, S. Bresolin, R. Masetti, F. Locatelli, G. Basso, and M. Pigazzi (2014). MLL-AF6 fusion oncogene sequesters AF6 into the nucleus to trigger RAS activation in myeloid leukemia. *Blood*. **124**(2): p. 263-72.
59. Liedtke, M., P.M. Ayton, T.C. Somerville, K.S. Smith, and M.L. Cleary (2010). Self-association mediated by the Ras association 1 domain of AF6 activates the oncogenic potential of MLL-AF6. *Blood*. **116**(1): p. 63-70.

60. Yokoyama, A. (2015). Molecular mechanisms of MLL-associated leukemia. *Int J Hematol.* **101**(4): p. 352-61.
61. Larsen, T.A., A.J. Olson, and D.S. Goodsell (1998). Morphology of protein-protein interfaces. *Structure.* **6**(4): p. 421-7.
62. Fair, K., M. Anderson, E. Bulanova, H. Mi, M. Tropschug, and M.O. Diaz (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol.* **21**(10): p. 3589-97.
63. Armstrong, S.A., J.E. Staunton, L.B. Silverman, R. Pieters, M.L. den Boer, M.D. Minden, S.E. Sallan, E.S. Lander, T.R. Golub, and S.J. Korsmeyer (2002). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* **30**(1): p. 41-7.
64. Monroe, S.C., S.Y. Jo, D.S. Sanders, V. Basrur, K.S. Elenitoba-Johnson, R.K. Slany, and J.L. Hess (2011). MLL-AF9 and MLL-ENL alter the dynamic association of transcriptional regulators with genes critical for leukemia. *Exp Hematol.* **39**(1): p. 77-86 e1-5.
65. Arkin, M.R., Y. Tang, and J.A. Wells (2014). Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. *Chem Biol.* **21**(9): p. 1102-14.
66. Kritzer, J.A. (2016). Stapled peptides: How to be quick on the uptake. *Nat Chem Biol.* **12**(10): p. 764-5.
67. Okada, Y., Q. Feng, Y. Lin, Q. Jiang, Y. Li, V.M. Coffield, L. Su, G. Xu, and Y. Zhang (2005). hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell.* **121**(2): p. 167-78.
68. Deshpande, A.J., L. Chen, M. Fazio, A.U. Sinha, K.M. Bernt, D. Banka, S. Dias, J. Chang, E.J. Olhava, S.R. Daigle, V.M. Richon, R.M. Pollock, and S.A. Armstrong (2013). Leukemic transformation by the MLL-AF6 fusion oncogene requires the H3K79 methyltransferase Dot1l. *Blood.* **121**(13): p. 2533-41.
69. Daigle, S.R., E.J. Olhava, C.A. Therkelsen, A. Basavapathruni, L. Jin, P.A. Boriack-Sjodin, C.J. Allain, C.R. Klaus, A. Raimondi, M.P. Scott, N.J. Waters, R. Chesworth, M.P. Moyer, R.A. Copeland, V.M. Richon, and R.M. Pollock (2013). Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood.* **122**(6): p. 1017-25.
70. Ng, Y.Y., M.R. Baert, E.F. de Haas, K. Pike-Overzet, and F.J. Staal (2009). Isolation of human and mouse hematopoietic stem cells. *Methods Mol Biol.* **506**: p. 13-21.
71. Orkin, S.H. (1995). Hematopoiesis: how does it happen? *Curr Opin Cell Biol.* **7**(6): p. 870-7.
72. Lennard, A.L. and G.H. Jackson (2000). Stem cell transplantation. *BMJ.* **321**(7258): p. 433-7.
73. Reya, T., S.J. Morrison, M.F. Clarke, and I.L. Weissman (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* **414**(6859): p. 105-11.
74. Ruggero, D. and P.P. Pandolfi (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer.* **3**(3): p. 179-92.
75. Lindstrom, M.S. (2011). NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochem Res Int.* **2011**: p. 195209.
76. Wang, J., J.W. Leung, Z. Gong, L. Feng, X. Shi, and J. Chen (2013). PHF6 regulates cell cycle progression by suppressing ribosomal RNA synthesis. *J Biol Chem.* **288**(5): p. 3174-83.

77. Reader, J.C., J.S. Meekins, I. Gojo, and Y. Ning (2007). A novel NUP98-PHF23 fusion resulting from a cryptic translocation t(11;17)(p15;p13) in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. **21**(4): p. 842-4.
78. Gough, S.M., F. Lee, F. Yang, R.L. Walker, Y.J. Zhu, M. Pineda, M. Onozawa, Y.J. Chung, S. Bilke, E.K. Wagner, J.M. Denu, Y. Ning, B. Xu, G.G. Wang, P.S. Meltzer, and P.D. Aplan (2014). NUP98-PHF23 is a chromatin-modifying oncoprotein that causes a wide array of leukemias sensitive to inhibition of PHD histone reader function. *Cancer Discov.* **4**(5): p. 564-77.
79. Wang, G.G., J. Song, Z. Wang, H.L. Dormann, F. Casadio, H. Li, J.L. Luo, D.J. Patel, and C.D. Allis (2009). Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature*. **459**(7248): p. 847-51.
80. Reader, J.C., Q. Leng, F.V. Rassool, and Y. Ning (2010). Regulation of differentiation by a PHD domain in the NUP98-PHF23 fusion protein. *Leuk Res.* **34**(8): p. 1094-7.

ANNEXE : FIGURES COMPLÉMENTAIRES

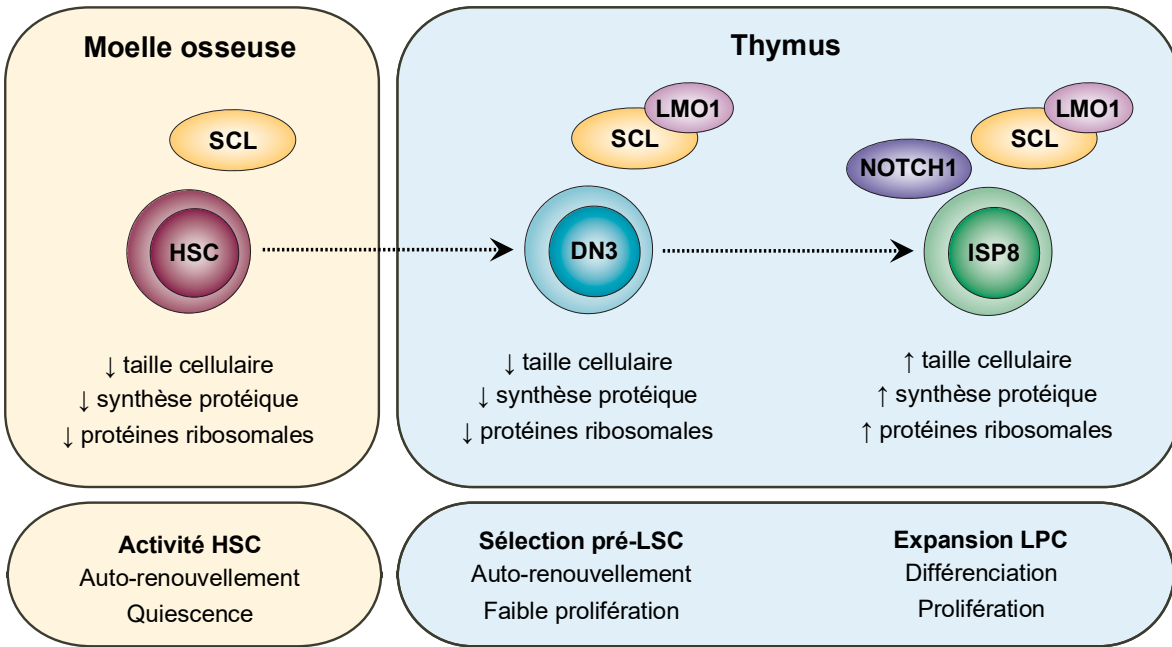


Figure A1. Le modèle de régulation ribosomale et traductionnelle par SCL dans les cellules souches hématopoïétiques normales et pré-leucémiques. SCL diminue l'expression des protéines ribosomales et la synthèse protéique dans les cellules souches hématopoïétiques normales (HSC) afin de maintenir leurs fonctions d'auto-renouvellement et de quiescence. Or, les oncogènes SCL et LMO1 diminuent également ces deux processus dans les thymocytes DN3 reprogrammés en cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC) afin de favoriser l'auto-renouvellement et un faible taux de prolifération, entraînant leur sélection clonale et l'initiation de la leucémie aiguë lymphoblastique de type T (LAL-T). Finalement, l'acquisition de mutations activatrices de *NOTCH1* augmente ces deux processus et transforme les pré-LSCs en cellules propagatrices de leucémie (LPC) pouvant proliférer et s'accumuler, ce qui résulte en la progression de la LAL-T.

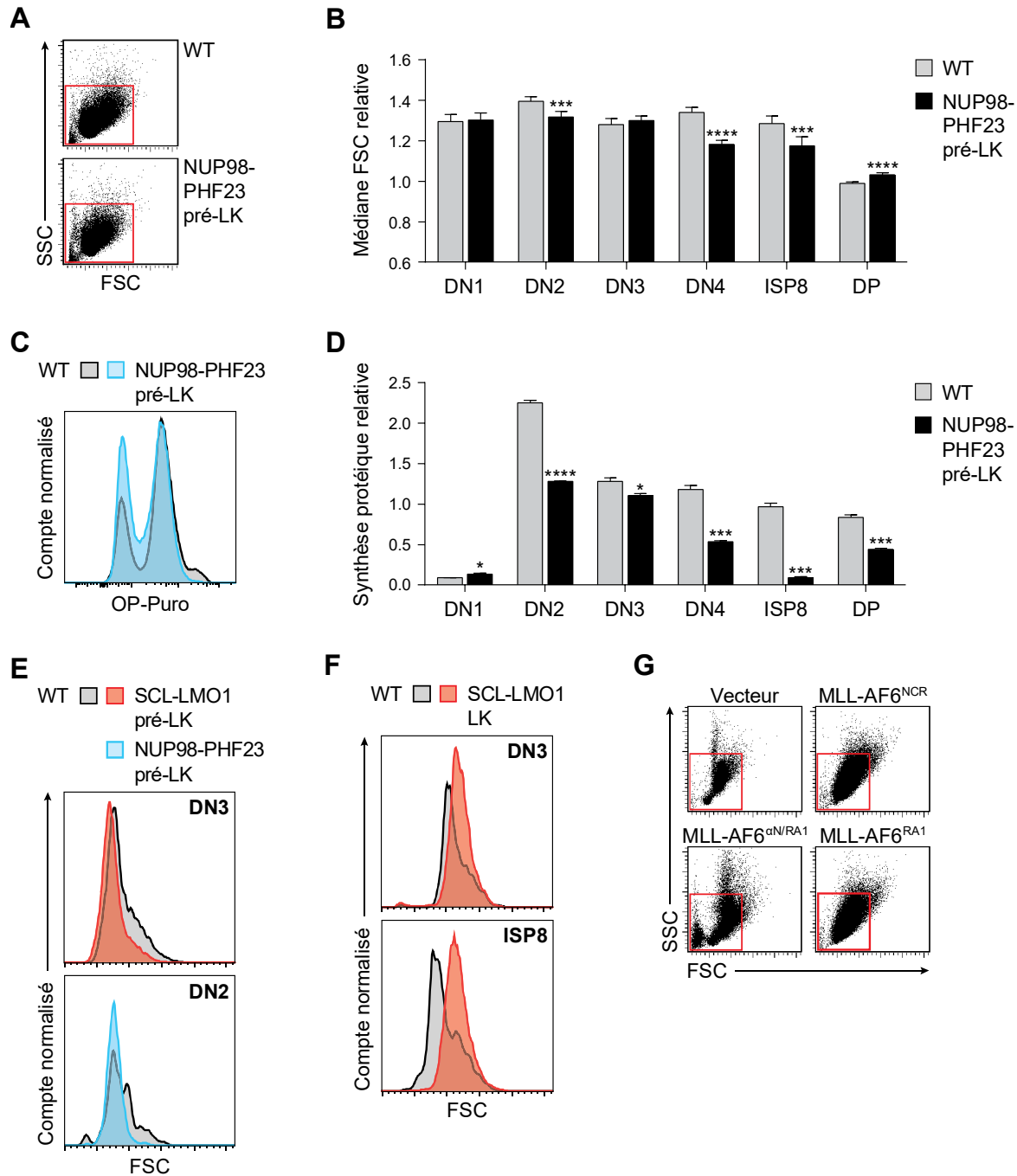


Figure A2. La régulation de la biogénèse des ribosomes et de la synthèse protéique pourrait être une fonction commune aux oncogènes des leucémies aiguës. (A) Les profils FSC-SSC de thymocytes totaux provenant de souris de type sauvage (WT) et NUP98-PHF23 pré-leucémiques (pré-LK) démontrent une diminution globale du signal FSC dans les thymocytes pré-LK (représentatif de n=5 souris par génotype). Les boîtes rouges délimitent arbitrairement les distributions FSC et SSC des thymocytes WT. (B) Les tailles FSC relatives des populations individuelles de thymocytes WT et NUP98-PHF23 pré-LK révèlent une diminution de la taille cellulaire dans les thymocytes pré-LK (n=5 souris par génotype). L'axe des « y » est rogné en

dessous de 0.4 pour mieux illustrer les différences de taille cellulaire subtiles mais significatives. (C) Résultats préliminaires : L'incorporation *in vitro* d'OP-Puromycine (OP-Puro) dans les thymocytes totaux NUP98-PHF23 pré-LK (bleu) est moindre que celle des thymocytes WT (gris). Ce résultat est représentatif d'une expérience effectuée avec une combinaison de thymocytes provenant de 9 souris WT et 3 souris NUP98-PHF23 pré-LK. (D) Résultats préliminaires : La synthèse protéique relative, calculée à partir des taux d'incorporation *in vitro* d'OP-Puro dans les populations individuelles de thymocytes provenant de souris WT et NUP98-PHF23 pré-LK, révèle que les thymocytes pré-LK ont une synthèse protéique diminuée. Ces données proviennent d'une expérience effectuée avec une combinaison de thymocytes provenant de 9 souris WT et 3 souris NUP98-PHF23 pré-LK. Les données représentent la moyenne \pm ÉT. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$; **** $p \leq 0.001$. DN1-4: double-négatif (CD4⁻CD8⁻) stade 1 (CD25⁻CD44⁺), 2 (CD25⁺CD44⁺), 3 (CD25⁺CD44⁻) et 4 (CD25⁻CD44⁻); ISP8: immature simple-positif CD8⁺ (CD4⁻CD8^{Faible}); DP: double-positif (CD4⁺CD8⁺). (E) La diminution de la taille cellulaire survient dans les populations de thymocytes contenant les cellules souches pré-leucémiques (pré-LSC) reprogrammées par les oncogènes SCL-LMO1 (DN3; rouge) et NUP98-PHF23 (DN2; bleu). (F) L'augmentation de la taille cellulaire survient dans les populations de thymocytes ayant acquis des mutations activatrices de NOTCH1 (DN3) et contenant les cellules propagatrices de leucémie (LPC; ISP8) dans le modèle SCL-LMO1. (G) Résultats préliminaires : Les profils FSC-SSC de cellules leucémiques de moelle osseuse exprimant MLL-AF6^{NCR} (contrôle positif) et MLL-AF6^{RA1} (dimère) révèlent que ces cellules ont une plus grande taille cellulaire que les cellules non-leucémiques exprimant le vecteur vide (contrôle négatif) et MLL-AF6 ^{α N/RA1} (monomère) (représentatif de n=3 souris par groupe). Les boîtes rouges délimitent arbitrairement les distributions FSC et SSC des cellules non-leucémiques (Vecteur).