



Université de Montréal

**Étude de la fusion humaine NUP98-HOXA9 chez la**  
***Drosophile***

par  
Gwenaëlle Gavory

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor  
en biologie moléculaire  
option biologie des systèmes

Décembre, 2018

© Gwenaëlle Gavory, 2018

## Résumé

La leucémie myéloïde aigüe ou LMA est une hémopathie maligne très hétérogène sur le plan biologique. Elle est caractérisée par l'accumulation de progéniteurs myéloïdes immatures ou myéloblastes dans la moelle osseuse et le sang périphérique. Plusieurs anomalies génétiques peuvent conduire au développement de la LMA. L'une d'entre elles est la translocation chromosomique *NUP98-HOXA9* (*NA9*) qui fusionnent les séquences encodant la partie N-terminale de NUP98 à celles encodant le domaine de liaison à l'ADN de HOXA9. Bien qu'elle soit rare, elle est associée à un pronostic très défavorable et sert de prototype dans la compréhension moléculaire des fusions oncogéniques impliquant à la fois la nucléoporine NUP98 et les protéines HOX. En dépit de nombreuses études, les mécanismes moléculaires responsables de l'activité leucémogénique de NA9 restent encore flous. Ainsi, les travaux de recherche présentés dans cet ouvrage visent à approfondir notre compréhension des mécanismes d'action de NA9 en utilisant la mouche à fruits, *Drosophila melanogaster*, comme organisme modèle.

Le premier chapitre de cet ouvrage, dans un premier temps, fait état de l'hématopoïèse de façon générale puis des connaissances actuelles entourant la translocation *NA9*. Dans une seconde partie, il aborde les processus hématopoïétiques chez la *Drosophile* puis le développement de l'œil composé et son utilisation à des fins de criblage génétique. Les deux chapitres suivants sont consacrés aux résultats des travaux de recherche.

Dans un premier article, nous présentons la caractérisation du phénotype induit par l'expression de la fusion humaine NA9 dans le système hématopoïétique larvaire de la *Drosophile*. NA9 induit une hyperplasie des tissus hématopoïétiques en réponse à une différenciation précoce des cellules progénitrices suivie de leur capacité proliférative accrue sans altérer la spécification des cellules sanguines. Comme chez les mammifères, NA9 collabore fortement avec l'homologue de MEIS1, Hth. De plus, la caractérisation génétique du phénotype induit par NA9 suggère une interférence avec la voie de signalisation Pvr (l'homologue des récepteurs à activité tyrosine kinase Flt1-4), similaire à l'interaction observée chez les mammifères entre Flt3 et les fusions NUP98-HOX dans la LMA. Finalement, nous montrons que l'expression de NA9 induit des effets non-cellule autonome,

soulevant ainsi la possibilité que l'activité leucémogénique de NA9 repose en partie sur cette capacité.

Dans le deuxième manuscrit, nous y présentons la spécificité du phénotype induit par l'expression de NA9 au cours du développement de l'œil composé chez la mouche puis la stratégie de criblage génétique visant à identifier de nouveaux partenaires d'interaction de NA9. Ce crible a permis d'isoler 29 loci parmi lesquels les gènes correspondant à 16 d'entre eux ont été identifiés dont 3 facteurs connus pour collaborer avec NA9 (*Rae1*, *emb*, *hth*) et un nouveau facteur chromatinien E(Pc) sur lequel nous nous attardons.

Ces travaux de recherche ont permis l'identification de nouvelles fonctions qui pourraient participer à l'activité oncogénique de NA9. De plus, ils montrent que les modèles développés chez la *Drosophila* pourraient contribuer à la compréhension plus approfondie de la pathogenèse des LMA au niveau moléculaire et permettre, à plus long terme, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées afin d'améliorer la survie des patients.

**Mots-clés :** Fusion NUP98-HOXA9, leucémie myéloïde aigüe (LMA), *Drosophila melanogaster*, hématopoïèse, crible modificateur, œil composé, Pvr, *Rae1*, *emb*, *hth*, E(Pc)

## Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogenous hematopoietic disorder characterized by the accumulation of immature myeloid progenitors or myeloblasts in the blood and bone marrow. Several genetic abnormalities can lead to the disease. One of these corresponds to the *NUP98-HOXA9* (*NA9*) translocation that fuses sequences encoding the N-terminal portion of NUP98 to those encoding the DNA-binding domain of HOXA9. It is a rare translocation associated with poor prognosis, but represents a prototypical case used to study NUP98-HOX chromosomal rearrangements. Despite numerous studies, the molecular mechanisms underlying NA9 leukemogenic activity remain unclear. This thesis seeks to shed light on NA9's mechanism of action using the fruit fly *Drosophila melanogaster* as a model organism.

The first chapter introduces, in a first section, hematopoiesis and provides actual knowledge on NA9 translocation. In a second section, *Drosophila* hematopoiesis as well as compound eye development and its use for genetic screening strategy are addressed. Next chapters are devoted to our research results.

A first article shows phenotype characterization induced by expression of the human NA9 oncoprotein in the *Drosophila* larval hematopoietic system. NA9 markedly enhanced cell proliferation and tissue growth, but did not alter cell fate specification. Reminiscent to NA9 activity in mammals, NA9 strongly collaborates with the MEIS homolog Hth. Moreover, genetic characterization of NA9-induced phenotype suggested interference with Pvr (Flt1-4 RTK homolog) signalling, which is similar to functional interaction observed in mammals between Flt3 and NUP98-HOX fusions in leukemia. Finally, NA9 expression was also found to induce non-cell autonomous affects, raising the possibility that its leukemogenic activity relies on this property.

A second manuscript demonstrates the specificity of a NA9-induced phenotype in fly eye and reports a genetic screen to identify novel NA9 functional partners. A total of 29 loci have been isolated and of which, 16 have now been linked to a specific gene. Three of these had previously been shown to contribute to NA9 activity (*Rae1*, *emb*, *hth*). Finally, we focused on the chromatin remodelling factor E(Pc).

Using *Drosophila*, this study has uncovered several novel functional aspects linked to NA9 activity. In the long term, upon demonstrating their relevance to NA9-mediated AML onset, some of the new players identified here could pave the way to develop targeted therapeutic strategies to improve overall patient survival.

**Keywords** : NUP98-HOXA9 fusion, acute myeloid leukemia (AML), *Drosophila melanogaster*, hematopoiesis, modifier screen, compound eye, Pvr, Rael, emb, hth, E(Pc)

# Table des matières

Résumé.....	i
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des sigles.....	xv
Remerciements.....	xxii
Avant-propos.....	1
Chapitre 1	
1 Introduction.....	2
1.1 L'hématopoïèse et les hémopathies malignes.....	2
1.1.1 L'hématopoïèse normale.....	2
1.1.2 La leucémie myéloïde aigüe ou LMA : description.....	6
1.1.2.1 Les gènes <i>HOX</i> .....	11
1.1.2.1.1 La régulation des gènes <i>HOX</i> .....	13
1.1.2.1.1.1 L'initiation de l'expression des gènes <i>HOX</i> .....	13
1.1.2.1.1.2 Le maintien de l'expression des gènes <i>HOX</i> .....	15
1.1.2.1.1.3 Les cofacteurs des gènes <i>HOX</i> .....	17
1.1.2.1.2 Le rôle des gènes <i>HOX</i> au cours du développement.....	18
1.1.2.1.2.1 Le rôle des gènes <i>HOX</i> dans l'hématopoïèse normale.....	19
1.1.2.1.2.2 Le rôle des gènes <i>HOX</i> dans les LMA.....	20
1.1.2.2 Les fusions impliquant la nucléoporeine NUP98.....	21
1.1.3 La translocation chromosomique t(7;11)(p15;p15).....	24
1.1.3.1 Description de la translocation t(7;11)(p15;p15).....	25
1.1.3.2 Les facteurs interagissant avec la protéine de fusion NUP98-HOXA9.....	27
1.1.3.2.1 Les facteurs de transcription de la famille des TALE.....	27
1.1.3.2.1.1 Le facteur de transcription PBX.....	27
1.1.3.2.1.2 Le facteur de transcription MEIS1.....	28
1.1.3.2.2 L'acétyltransférase CBP/p300.....	30

1.1.3.2.3	L’histone déacétylase HDAC1 .....	31
1.1.3.2.4	La méthyltransférase MLL1 .....	32
1.1.3.2.5	Les facteurs d’export nucléaire.....	33
1.1.3.2.5.1	Le facteur RAE1 .....	33
1.1.3.2.5.2	Le facteur TAP.....	34
1.1.3.2.5.3	Le facteur Exportin1 (XPO1).....	35
1.1.3.3	Les modèles d’étude <i>in vivo</i> de la fusion NUP98-HOXA9 .....	36
1.1.3.3.1	Chez la souris.....	37
1.1.3.3.2	Chez le poisson-zèbre ou <i>zebrafish</i> .....	38
1.2	La drosophile, <i>Drosophila melanogaster</i> , un organisme modèle puissant.....	39
1.2.1	Les avantages de la <i>Drosophile</i> .....	39
1.2.2	L’hématopoïèse chez la drosophile.....	40
1.2.2.1	Les cellules sanguines chez la mouche : description et fonctions .....	41
1.2.2.1.1	Les plasmatocytes .....	42
1.2.2.1.2	Les cellules à cristaux .....	43
1.2.2.1.3	Les lamellocytes.....	43
1.2.2.2	L’hématopoïèse embryonnaire.....	44
1.2.2.3	L’hématopoïèse larvaire.....	46
1.2.2.3.1	Les hémocytes circulants et sessiles .....	46
1.2.2.3.2	La glande lymphatique : l’organe hématopoïétique larvaire .....	48
1.2.2.4	L’hématopoïèse chez l’adulte .....	51
1.2.3	Régulation génétique de l’hématopoïèse .....	53
1.2.3.1	Régulation génétique de l’hématopoïèse embryonnaire .....	54
1.2.3.2	Régulation génétique de l’hématopoïèse larvaire au niveau de la glande lymphatique.....	56
1.2.3.2.1	Contrôle moléculaire du maintien du caractère indifférencié des prohémo- cytes de la zone médullaire .....	57
1.2.3.2.1.1	Régulation autonome de la zone médullaire.....	57
1.2.3.2.1.2	Signaux émanant du PSC.....	59
1.2.3.2.1.3	Signaux provenant des cellules différenciées de la zone corticale .....	60
1.2.3.2.1.4	Les facteurs environnementaux .....	60



1.2.3.2.1.5	La communication entre les organes.....	61
1.2.3.2.2	Contrôle moléculaire de la spécification des plasmatocytes.....	62
1.2.3.2.3	Contrôle moléculaire de la spécification des cellules à cristaux.....	63
1.2.3.2.4	Contrôle moléculaire de la spécification des lamellocytes.....	65
1.2.4	L'œil composé de la mouche.....	67
1.2.4.1	Description et formation de l'œil composé.....	68
1.2.4.2	Mécanismes moléculaires régulant le développement de l'œil.....	70
1.2.4.3	Outil pour réaliser des cribles génétiques.....	73
1.2.4.3.1	Crible génétique classique ou « forward genetics ».....	74
1.2.4.3.1.1	Crible traditionnel.....	74
1.2.4.3.1.2	Crible modificateur dominant.....	75
1.2.4.3.1.3	Crible de clones mitotiques ( <i>clonal screen</i> ).....	75
1.2.4.3.2	Crible génétique inverse ou « reverse genetics ».....	77
1.2.4.3.2.1	Crible génétique par ARN interférant.....	77
1.2.4.3.2.2	Crible génétique par édition du génome (« genome editing »).....	78
1.2.5	Le modèle AML1-ETO chez la drosophile.....	80
1.3	Objectifs de la thèse.....	82
1.3.1	Problématique.....	82
1.3.2	Hypothèses.....	82
1.3.3	Objectif général.....	82
1.3.4	Objectifs spécifiques.....	83
Chapitre 2		
2	Human NUP98-HOXA9 promotes hyperplastic growth of hematopoietic tissues in <i>Drosophila</i> .....	84
2.1	Abstract.....	86
2.2	Introduction.....	86
2.3	Results.....	89
2.3.1	NUP98-HOXA9 expression induces lymph gland hyperplasia.....	89
2.3.2	NUP98-HOXA9 induces hemocyte proliferation and affects the balance between progenitors and differentiated hemocytes.....	91

2.3.3	NUP98-HOXA9 promotes PSC expansion in a non-cell autonomous manner ....	95
2.3.4	NUP98-HOXA9 activity in the lymph gland depends on the same functional elements as in mammals .....	101
2.3.5	HTH collaborates with NUP98-HOXA9 to promote lymph gland overgrowth.	103
2.3.6	NUP98-HOXA9 impairs PVR signaling in the lymph gland .....	106
2.4	Discussion .....	109
2.5	Materials and methods .....	112
2.5.1	Fly stocks .....	112
2.5.2	Cloning and transgenic flies.....	112
2.5.3	Immunohistochemistry and microscopy .....	113
2.5.4	Hemocyte staining and counting.....	114
2.5.5	qPCR and transcriptome analysis .....	114
2.5.6	FACS analysis.....	115
2.5.7	Phagocytic assay .....	115
2.6	Acknowledgements.....	116
2.7	References.....	116
Chapitre 3		
3	A screen for modifiers of human NUP98-HOXA9 in <i>Drosophila</i> reveals its impact on epigenetic regulation.....	123
3.1	Abstract.....	125
3.2	Introduction.....	125
3.3	Results.....	129
3.3.1	Expression of NA9 disrupts eye development in an <i>exd</i> and <i>hth</i> dependent manner .....	129
3.3.2	Hippo signaling modulates the NA9-HTH collaboration .....	134
3.3.3	Identification of dominant modifiers of NA9 activity .....	136
3.3.4	NA9 expression induces eye-to-wing transdetermination .....	147
3.3.5	E(Pc) modulates the hyperplastic activity of NA9 in the lymph gland .....	151
3.4	Discussion .....	153
3.5	Materials and methods .....	157

3.5.1	Fly stocks .....	157
3.5.2	Cloning and transgenic flies.....	157
3.5.3	Drosophila maintenance.....	158
3.5.4	Drosophila maintenance and mutagenesis for the screen .....	158
3.5.5	Complementation tests, mapping and sequencing .....	158
3.5.6	Quantification of modifier effect on NA9 phenotype.....	159
3.5.7	Assay on eyeless/Heat shock promoter expression .....	159
3.5.8	Dosage sensitivity .....	159
3.5.9	Western blot.....	160
3.5.10	Drug assay.....	160
3.5.11	Immunohistochemistry and microscopy imaging.....	160
3.5.12	FACS analysis.....	161
3.5.13	RT-qPCR analysis.....	162
3.6	Acknowledgements.....	162
3.7	References.....	163
3.8	Annexes.....	169
Chapitre 4		
4	Discussion.....	190
4.1	L'activité de NA9 dans le système hématopoïétique de la mouche .....	190
4.1.1	La voie de signalisation Pvr.....	191
4.1.2	L'activité non-cellule autonome de NA9.....	193
4.1.2.1	Comment l'expression de NA9 dans la ZC et les hémocytes circulants affecte la taille du PSC?.....	194
4.2	L'activité de NA9 dans l'œil de la mouche .....	196
4.2.1	Les résultats du crible génétique.....	196
4.2.1.1	Le facteur de transcription Hth .....	197
4.2.1.2	Les facteurs de transport nucléo-cytoplasmique Rae1 et Emb .....	197
4.2.1.3	Des facteurs épigénétiques qui influencent l'activité transcriptionnelle .....	198
4.2.1.3.1	Le rôle d'Enhancer of Polycomb, E(Pc).....	199
4.2.1.3.2	Comment E(Pc) contribue à l'activité oncogénique de NA9?.....	200

4.2.1.4	Nouvelles fonctions de NA9 indépendantes de son activité transcriptionnelle	203
4.2.1.4.1	La traduction	203
4.2.1.4.2	La polarité cellulaire	204
4.2.2	NA9 et les morphogènes Wingless (Wg) et Decapentaplegic (Dpp)	204
4.2.2.1	Comment NA9 affecte les niveaux de Wg ou Dpp?	209
4.2.2.1.1	La régulation de Wg	210
4.2.2.1.2	La régulation de Dpp	211
4.2.2.1.3	NA9 et la transdétermination	212
4.2.2.2	Un lien entre Wg et les gènes identifiés dans le crible?	213
4.2.2.2.1	La voie non canonique Wnt/Wg	213
4.2.2.2.2	La voie Wnt/Wg et les facteurs de remodelage de la chromatine	214
4.2.2.2.3	La voie Wnt/Wg et les facteurs impliqués dans la traduction	216
4.2.2.2.4	La voie Wnt/Wg et le cytosquelette	218
4.3	Les voies Wnt/Wg et Pvr/PDGF-VEGF	220
4.4	Les modifications épigénétiques et la reprogrammation du destin cellulaire dans les LMA	222
4.5	Les limites de notre modèle	224
	Conclusion	225
	Bibliographie	226

## Liste des tableaux

Tableau 1.I. Réarrangements chromosomiques impliquant la nucléoporine NUP98 dans les hémopathies malignes.....	24
Table 3.I. Groups of dominant modifiers of NA9 phenotype on the second and third chromosomes. ....	141

## Liste des figures

Figure 1.1.	Hiéarchie simplifiée des différents lignages hématopoïétiques .....	5
Figure 1.2.	Distribution des différentes anomalies cytogénétiques et moléculaires présentes chez des patients âgés de 16 à 60 ans atteints de LMA.....	9
Figure 1.3.	Les 8 classes de gènes fréquemment mutés dans les LMA.....	10
Figure 1.4.	La disposition des gènes <i>HOX</i> chez la drosophile et l'homme .....	12
Figure 1.5.	La localisation de NUP98 au niveau du pore nucléaire .....	22
Figure 1.6.	Les différents partenaires de fusion de NUP98.....	23
Figure 1.7.	Structure schématique des protéines NUP98, HOXA9 et de la fusion NUP98-HOXA9 avec ses différents partenaires d'interaction .....	26
Figure 1.8.	Le cycle de vie de la <i>Drosophila melanogaster</i> .....	40
Figure 1.9.	Les différentes populations d'hémocytes .....	42
Figure 1.10.	Représentation schématique de l'hématopoïèse embryonnaire chez la drosophile .....	45
Figure 1.11.	Les hémocytes circulants et sessiles du stade larvaire .....	48
Figure 1.12.	L'organe hématopoïétique larvaire : la glande lymphatique.....	50
Figure 1.13.	L'hématopoïèse chez la mouche adulte.....	52
Figure 1.14.	L'hématopoïèse en bref, au cours du développement chez la drosophile .....	53
Figure 1.15.	Les différents facteurs impliqués dans la différenciation des hémocytes matures au stade embryonnaire.....	55
Figure 1.16.	L'homéostasie de la GL est contrôlée par de nombreux signaux intrinsèques et extrinsèques. ....	63
Figure 1.17.	La structure de l'œil composé de la drosophile.....	69
Figure 1.18.	Représentation schématique du disque imaginal œil-antenne au stade larvaire L2 (A) et L3 (B).....	72
Figure 2.1.	NA9 expression induces lymph gland overgrowth. ....	90
Figure 2.S1.	NA9 expression increases the number of circulating hemocytes.....	91
Figure 2.2.	NA9 increases lymph gland mitotic index. ....	92

Figure 2.3. NA9 perturbs the balance between progenitors and differentiated cells in the lymph gland. ....	93
Figure 2.S3. Higher NA9 expression promotes lamellocyte differentiation. ....	94
Figure 2.S4. Phagocytic activity of circulating hemocytes is not affected by NA9 expression. ....	95
Figure 2.4. NA9 promotes PSC expansion in a non-cell autonomous manner.....	96
Figure 2.S5. NA9 expression in the CZ and circulating hemocytes promotes PSC cell proliferation. ....	97
Figure 2.S6. E-Cadherin expression in PSC cells alters PSC morphology. ....	98
Figure 2.S7. Peroxidasin-Gal4 driven NA9 expression affects PSC size and morphology. ...	98
Figure 2.S8. Expression of NA9 using collier-Gal4 promotes PSC overgrowth.....	99
Figure 2.S9. PSC cells do not express <i>HmlA-Gal4</i> as revealed by G-TRACE analysis.....	100
Figure 2.S10. RAS <sup>V12</sup> expression in the CZ does not affect the size or the morphology of the PSC.....	101
Figure 2.5. NA9 structure-function analysis in the Drosophila hematopoietic system. ....	102
Figure 2.S11. NA9-induced lymph gland expansion is not suppressed by depletion of endogenous HTH and/or EXD. ....	104
Figure 2.6. HTH collaborates with NA9 in the lymph gland.....	105
Figure 2.7. PVR signalling modifies NA9-dependent phenotypes in the lymph gland.....	107
Figure 2.S12. PVR overexpression does not impede NA9 expression.....	108
Figure 2.S13. NA9 expression in the CZ and circulating hemocytes has no impact on Adgf-A transcript levels.....	109
Figure 3.1. NUP98-HOXA9 disrupts eye development in an <i>exd</i> and <i>hth</i> dependent manner. ....	130
Figure 3.S1. NA9 variants are globally equally expressed in whole larval cell extracts.....	131
Figure 3.2. NUP98-HOXA9 collaborates with HTH during eye development. ....	133
Figure 3.S2. The NA9-HTH collaboration phenotype depends on the Hippo signalling pathway. ....	135
Figure 3.S3. The strength of the NA9 eye phenotype is dosage sensitive.....	136
Figure 3.3. Representative examples of alleles identified in the NA9-dependent screen.....	137
Figure 3.S4. No modifier group consistently alters the NA9 transgene expression.....	139

Figure 3.4. Point mutations identified in eight candidate genes are illustrated. Low doses treatment with the XPO1 inhibitor Selinexor enhance the NA9 phenotype. ....	143
Figure 3.5. Depletion of nine candidate genes modulates the NA9 phenotype consistently with the alleles effect. The NuA4/Tip60 complex contributes to the NA9 phenotype. ....	144
Figure 3.S5. Depletion of candidate genes and NuA4/Tip60 complex subunits does not induce major phenotype in the eye.....	145
Figure 3.S6. Immunofluorescence and qPCR assays to assess RNAi specificity. ....	146
Figure 3.6. NA9 induces ectopic expression of ANTP and the wing selector factor VG consistently with the eye-to-wing transdetermination phenotype observed.....	149
Figure 3.S7. The <i>ey-Gal4</i> driver and NA9 are expressed across the eye field in the eye-antennal disc at some point during the development as revealed by lineage tracing analysis. ....	150
Figure 3.7. E(Pc) alleles collaborate with NA9 in the hematopoietic system. ....	152
Figure 4.1. Représentation schématique de la procédure de transplantation.....	200
Figure 4.2. Courbe de survie post-transplantation.....	201
Figure 4.3. Le complexe NuA4/Tip60 est requis pour l'activité d'E(Pc) dans la GL. ....	203
Figure 4.4. NA9 atténue l'expression de <i>dpp</i> dans la partie dorsale du disque imaginal de l'œil. ....	206
Figure 4.5. NA9 induit l'expression de Wg de façon dose-dépendante. ....	207
Figure 4.6. NA9 induit l'activation de la voie Wg et l'expression de Vestigial.....	208
Figure 4.7. Patrons d'expression des morphogènes Wg et Dpp dans le disque imaginal œil-antenne au début du deuxième stade larvaire. ....	210
Figure 4.8. Modèle schématique représentant l'impact de l'expression de NA9 au cours du développement de l'œil. ....	219



## Liste des sigles

*abd-A* : abdominal A

*Abd-B* : Abdominal B

ADGF-A : « Adenosine Deaminase-related Growth Factor A »

ADN : acide désoxyribonucléique

AGM : Aorte-gonades-mésonephros

Antp : Antennapedia

APC/C : « Anaphase Promoting Complex / Cyclosome »

ARN : acide ribonucléique

ARNdb : ARN double brin

ARNi : ARN interférent

ARNm : ARN messenger

ARNnc : ARN non codant

ASH1 : « Absent, Small or Homeotic-like 1 »

bx<sub>d</sub> : bithoraxoid

CBP : « CREB binding protein »

CDX : « Caudal-related homeobox »

CEBP $\alpha$  : « CCAAT/enhancer-binding protein alpha »

COMPASS : « complex proteins associated with Set1 »

Col : Collier

CREB : « c-AMP response element-binding protein »

CRISPR : « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »

CRM1 : « chromosomal maintenance 1 »

CSH : cellule souche hématopoïétique

*dac* : dachshund

*Dfd* : Deformed

DILP : « Drosophila Insulin-Like Peptide »

DI : Delta

DNMT3 : « DNA methyltransferase 3 »

Dome : Domeless  
Dpp : Decapentaplegic  
EBF : « Early B-cell Facotr »  
EGFR : « Epidermal Growth Factor Receptor »  
EMS : méthane sulfonate d'éthyl  
Exd : Extradenticle  
*ey* : *eyeless*  
*eya* : *eyes absent*  
*eyg* : *eyegone*  
FG : phénylalanine-glycine  
FGF : « fibroblast growth factor »  
FRT : « Flp recognition target »  
Flp : Flipase  
FLT3 : « Fms-related tyrosine kinase 3 »  
fng : fringe  
FOG : « Friend Of GATA »  
Fz : Frizzled  
GABA : « Gamma-AminoButyric Acid »  
GCM : « Glial Cell Missing »  
GL : glande lymphatique  
GLEBS : « Gle2p-binding sequence »  
GLFG : glycine-leucine-phénylalanine-glycine  
HAT : « Histone Acethyl-transferase »  
HDAC : histone déacéthylase  
Hem : Hemipterous  
Hh : Hedgehog  
Hop : Hopscotch  
HOTAIR : « HOX transcript antisense RNA »  
HOTTIP : « HOXA transcript at the distal tip »  
HOX : homeobox  
Hth : Homothorax

IDH1/2 : isocytate dehydrogenase  
InR/TOR : « Insulin Receptor / Target Of Rapamycin »  
IPC : « DILP-producing cells »  
IRO-C : Iroquois-Complex  
JAK/STAT : « Janus Kinase / signal transducer of activation »  
JNK : « c-Jun N-terminal Kinase »  
L : Lobe  
*lab* : *labial*  
LMA : Leucémie myéloïde aigüe  
Lz : Lozengue  
MAPK : « mitogen activated protein kinase »  
MEIS1 : « Myeloïd ecotropic viral integration site 1 »  
MLL : « mixed lineage leukemia »  
miR : micro ARN  
mTOR : « mammalian target of rapamycin »  
MYST3 : « MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3 »  
NA9 : NUP98-HOXA9  
NMP1 : nucleophosmin 1  
NUP98 : Nucléoporine 98  
Odd : Odd-skipped  
Pc : Polycomb  
*pb* : *proboscipedia*  
PBX : « Pre-B-cell leukemia homeobox »  
PCP : « Planar Cell Polarity »  
PhoRC : « Pleiohomeotic Repressive Complex »  
Pnr : Pannier  
PRC 1/2 : « Polycomb Repressive Complex 1/2 »  
PRE : « Polycomb Response Element »  
PSC : « Posterior Signaling Center »  
Pvf-1 : « PDGF/VEGF-related factor 1 »

Pvr : « Platelet Derived Growth Factor (PDGF)/Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-receptor related »

RAE1 : « RNA export factor 1 »

RAR : « Retinoic Acid Receptor »

RARE : « Retinoic Acid Response Element »

ROS : « Reactive Oxygen Species »

RTK : « Receptor Tyrosine Kinase »

RUNX1 : « Runt-related transcription factor 1 »

RXR : « Retinoid X Receptor »

SAC : « Spindle Assembly Checkpoint »

SCF : « Stem Cell Factor »

*Scr* : *Sex Combs Reduced*

Sd : Scalloped

Ser : Serrate

*so* : *sine oculis*

Slp : Sloppy paired

Srp : Serpent

STAT92E : « Signal-Transducer and Activator of Transcription protein at 92E »

SWI/SNF : « SWItch mutants / Sucrose Non-Fermenting »

TAC1 : TACHykinin precursor 1

TALE : « Three Amino acid Loop Extension »

TALEN : « Transcription activator-like effector nuclease »

TAP : « Tip Associated Protein »

TGF- $\beta$  : « Transforming Growth Factor  $\beta$  »

NF- $\kappa$ B : « Nuclear Factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells »

*toy* : *toyleless*

TPO : thrombopoïétine

TRE : « Trithorax Response Element »

Trol : « Terribly Reduced Optic Lobe »

Trx : Trithorax

UAS : « Upstream Activation Sequence »

*Ubx* : *Ultrabithorax*

Upd : Unpaired

Ush : U-shaped

VP16 : « Viral protein 16 »

WDR5 : « WD repeat-containing protein 5 »

Wg : Wingless

XPO1 : Exportin 1

ZC : zone corticale

ZM : zone médullaire

ZNF : « Zinc-finger nuclease »

## Liste des abréviations

aa. : acides aminés

*C. elegans* : *Caenorhabditis elegans*

Cf. : Confer

*D. melanogaster* : *Drosophila melanogaster*

kDa : kilodalton

*A ma famille et mes amis,*

## Remerciements

L'achèvement d'une thèse est le fruit d'un travail de longue haleine et marque assurément la fin d'une étape dans la vie. J'aimerais saisir cette occasion pour remercier tout ceux qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce projet.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du jury : Brian Wilhelm, Tarik Möröy, Patrick Laprise et enfin Richard Bertrand pour avoir accepté de juger ce travail.

Je suis extrêmement reconnaissante envers mon directeur de thèse, Marc Therrien, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, il y a déjà plusieurs années maintenant et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche. Il aura contribué par son ardeur au travail, ses commentaires, ses conseils et son souci du détail à améliorer les écrits qui se trouvent dans cette thèse.

J'aimerais exprimer ma gratitude envers tous les membres du laboratoire ceux d'hier et d'aujourd'hui, et tout particulièrement ceux qui ont contribué aux bases de ce projet. Un immense merci aux « drosophilistes » avec qui j'ai partagé une grande partie de mes journées, dont Caro B mon bras droit dans ce projet, sans qui, ce travail n'aurait pu être mené à bon port! Merci pour tes encouragements et ton soutien. Et Hélène, merci pour ta bonne humeur et ta motivation à toute épreuve. Tu apportais beaucoup de vie dans le labo! Un immense merci à Martin, Hugo, Sara, Malha, Fanny, Samuel, Jessica et Jean-René pour votre soutien, vos encouragements et précieux conseils mais également pour nos pauses déjeuner des beaux jours dans le cimetière du Mont-Royal. Rien de mieux pour se ressourcer! Enfin, Caro L, je te remercie pour nos partages d'expérience, discussions de paillasse et pauses déjeuner régulières. En passant, Martin, tu vas bientôt pouvoir officiellement m'appeler Dr Gavory!

Je tiens également à remercier Jalila et Nadine du laboratoire de Guy pour le partage de leur expertise en manipulation de souris, ainsi que Christian Charbonneau pour son soutien technique à la plateforme de bio-imagerie et Gaël Dulude et Danièle Gagné pour leur soutien technique à la plateforme de cytométrie en flux. N'oublions pas de souligner le rôle des organismes subventionnaires qui ont contribué financièrement aux travaux de recherche, soit



les Fonds de recherche en santé du Québec, les programmes de biologie moléculaire et la Faculté des études supérieures.

Bien évidemment, un grand merci à mes petites drosos!! Bien qu'elles n'aient pas toujours été très coopératives, sans elles, ce travail n'aurait pu être possible.

Je désire exprimer ma reconnaissance envers mes parents qui m'ont soutenu et encouragé à faire ce que je souhaitais, même si cela incluait de s'expatrier à des milliers de kilomètres. Je remercie également ma famille et mes amis pour leur soutien au cours de ces nombreuses années.

J'aimerais exprimer mes profonds remerciements à mon conjoint. Toi, qui a subi les hauts et les bas des journées de labo, les affres de la réussite et de l'échec, les incertitudes perpétuelles, la boucle infernale des remises en question, tu m'as toujours soutenu et encouragé à ne pas baisser les bras. Je te remercie de m'avoir épauler pendant toutes ces années. Pour finir, merci à notre petit garçon qui nous apporte beaucoup de joie et nous encourage à se surpasser.

Enfin, aujourd'hui, après un parcours de longue haleine avec cette étrange impression d'avoir fait un interminable voyage sur des montagnes russes, j'aperçois enfin le bout du tunnel et je peux répondre à cette sempiternelle question :

- « Quand est-ce que tu la finis cette thèse? ».
- C'est presque fait! La ligne d'arrivée n'aura jamais été aussi proche!

Une petite parenthèse pour Sara et Jess, tenez bon les filles, ne baissez pas les bras! ☺

Je vous souhaite une bonne lecture!

## Avant-propos

Le terme hématopoïèse provient du grec ancien αἷμα, *haïma* (« sang ») et ποίησις, *poiësis* (« création, production ») qui signifie littéralement « production du sang ». En effet, l'hématopoïèse désigne l'ensemble des processus physiologiques par lesquels l'organisme assure la production et le renouvellement des multiples lignées cellulaires qui composent le sang. Étant donné que les cellules sanguines ont une durée de vie limitée, l'hématopoïèse s'effectue en continu pour assurer un approvisionnement constant de nouvelles cellules sanguines que ce soit dans l'embryon en développement ou chez l'adulte où environ  $10^{12}$  cellules sanguines sont produites quotidiennement. Au niveau moléculaire, l'hématopoïèse est finement régulée par de nombreux facteurs et voies de signalisation dont la perturbation de l'activité peut affecter la différenciation et la prolifération des cellules sanguines et ainsi conduire à l'apparition de diverses hémopathies dont les leucémies. La leucémie est un cancer de la moelle osseuse et du sang. Ce sont des médecins européens qui ont observé pour la première fois, au 19<sup>ème</sup> siècle, des taux anormalement élevés de leucocytes ou globules blancs chez certains patients, d'où le terme « leucémie » pour désigner la maladie, dont les racines grecques leukós (« blanc ») et *haïma* (« sang ») signifient littéralement « sang blanc ».

Aux États-Unis, les leucémies représentent 3,5 % des cancers avec une incidence ajustée à l'âge de 13,8 cas par 100 000 habitants par an sur la période de 2011 à 2015 (Statistiques du National Cancer Institute, 2018). Comme nous l'aborderons par la suite, il existe différents types de leucémies dont la leucémie myéloïde aigüe ou LMA.

Mon projet de thèse consistait à étudier la protéine de fusion NUP98-HOXA9 impliquée dans le développement de LMA en utilisant la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* comme organisme modèle. Ainsi, la première partie de cette introduction abordera l'hématopoïèse de façon générale puis traitera principalement de la LMA induite par la translocation chromosomique *NUP98-HOXA9*. La seconde partie sera axée sur la *Drosophile* en tant qu'organisme modèle dans l'étude des processus hématopoïétiques et l'utilisation de son œil composé à des fins de criblage génétique.

# 1 Introduction

## 1.1 L'hématopoïèse et les hémopathies malignes

### 1.1.1 L'hématopoïèse normale

Avant d'entrer plus en détails dans le vif du sujet de ce présent ouvrage, une petite parenthèse sur les processus hématopoïétiques en condition normale s'avère nécessaire. Comme mentionné plus tôt, le terme hématopoïèse désigne l'ensemble des mécanismes responsables de la production et du renouvellement continus des cellules sanguines. Il est admis aujourd'hui que toutes les cellules hématopoïétiques dérivent d'un précurseur commun, les cellules souches hématopoïétiques (CSH). La notion de cellule souche a été introduite, il y a plus d'un siècle, par le pathologiste allemand Ernst Neumann (1834-1918). En effet, à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, il fut le premier à postuler que les cellules sanguines étaient produites dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche commune à toutes les lignées sanguines. La théorie fondatrice de Neumann sur l'existence d'une cellule souche hématopoïétique a depuis été validée. Au début des années 1960, ce sont deux chercheurs canadiens Till et McCulloch qui, alors qu'ils étudiaient l'effet de la radiation sur la moelle osseuse de souris, ont démontré l'existence de cellules souches hématopoïétiques qu'ils ont caractérisées par la suite (Becker et al., 1963; McCulloch and Till, 1960; Till and Mc, 1961). Les CSH sont des cellules dites pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de s'auto-renouveler, ce qui permet de maintenir leur nombre constant, et elles possèdent également la capacité de se différencier en toutes les lignées cellulaires sanguines. Ainsi, ce sont les CSH qui sont à l'origine de la production continue et contrôlée de toutes les cellules sanguines au cours de la vie. Bien que les CSH soient localisées au niveau de la moelle osseuse chez l'adulte, elles ne sont pas originaires de ce tissu. Elles apparaissent au cours du développement embryonnaire, stade au cours duquel elles vont transiter entre différents organes hématopoïétiques avant de finalement coloniser la moelle osseuse. En effet, les organes hématopoïétiques comme le foie, la rate, le thymus et la moelle osseuse ne produisent pas leurs propres précurseurs hématopoïétiques mais ils sont colonisés par des progéniteurs sanguins extrinsèques (Le Douarin et al., 1984; Moore and Owen, 1967).

L'hématopoïèse est divisée en deux phases: une première, appelée hématopoïèse primitive ou phase extraembryonnaire et la deuxième, appelée hématopoïèse définitive ou phase intraembryonnaire. Les premières cellules hématopoïétiques commencent à apparaître peu après la gastrulation, au niveau du mésoderme extraembryonnaire de la vésicule vitelline. Les petits agrégats de cellules forment progressivement des structures appelées « îlots sanguins » qui sont constitués d'érythrocytes nucléés entourés d'une couche de cellules endothéliales (Cumano and Godin, 2007; Palis and Yoder, 2001). En effet, les cellules hématopoïétiques et endothéliales ont un précurseur commun appelé hémangioblaste (Loges et al., 2004). Cette phase transitoire a pour principale fonction de produire à partir de progéniteurs érythro-myéloïdes, des érythrocytes et mégacaryocytes permettant de supporter la croissance rapide de l'embryon (Palis and Yoder, 2001). Ce n'est que plus tard au cours du développement embryonnaire, que l'hématopoïèse définitive prend place dans la splanchnopleure para-aortique (P-Sp), puis la région aorte-gonades-mésonephros (AGM) et produit des CSH (Cumano and Godin, 2007). Par la suite, les CSH émigrent et colonisent essentiellement le placenta, le foie fœtal et la rate avant de s'établir de façon définitive dans la moelle osseuse et le thymus en fin de gestation. L'hématopoïèse définitive est responsable de la production et du renouvellement des cellules sanguines chez l'adulte au niveau des organes hématopoïétiques qui sont la moelle osseuse et le tissu lymphoïde (le thymus, les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales, plaques de Peyer intestinales).

Les CSH peuvent se différencier en tous les types de précurseurs des lignées lymphoïdes et myéloïdes (**Cf. figure 1.1**). De nombreux facteurs et voies de signalisation sont impliqués dans le maintien, l'auto-renouvellement ainsi que la différenciation des CSH.

Les cytokines sont les principaux facteurs extrinsèques impliqués dans la régulation des CSH. Ce sont des glycoprotéines synthétisées par différents types de cellules, qui une fois fixée sur leurs récepteurs spécifiques vont activer différentes voies de signalisation puis les facteurs de transcription hématopoïétiques. Ces facteurs de transcription coordonnent la différenciation spécifique des CSH en activant ou en réprimant la transcription de gènes clés capables d'influencer le choix de lignages cellulaires. Ainsi, ils induisent un programme d'expression génique qui est spécifique à chaque lignée cellulaire. Par exemple, les facteurs antagonistes GATA-1 et PU.1 sont les principaux régulateurs de la différenciation des lignées érythro-mégacaryocytaire et granulo-monocytaire respectivement (Laslo et al., 2008). Le

choix de lignage implique également d'autres facteurs transcriptionnels et épigénétiques tels que Bmi-1, p53, Ikaros et C/EBP $\alpha$  (He et al., 2009; Laslo et al., 2008).

La survie, le maintien en quiescence et l'expansion des CSH sont contrôlés par plusieurs voies de signalisation, telles que Notch, Wnt, BMP (« bone morphogenetic protein »), mTOR (« mammalian target of rapamycin ») et Hedgehog, qui sont régulées à la fois de façon intrinsèque et extrinsèque (Lin et al., 2015; Mirantes et al., 2014; Zon, 2008). Les CSH résident dans la niche hématopoïétique, un microenvironnement essentiel à leur survie. Elle est organisée en deux compartiments, soit la niche vasculaire et la niche endostéale (Mendelson and Frenette, 2014). Elle est donc constituée de nombreux types cellulaires : des ostéoblastes, des cellules endothéliales et nerveuses qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des CSH, notamment en sécrétant des facteurs extrinsèques tels que les ligands de la voie Notch (JAGGED-1/2), le facteur de croissance TGF- $\beta$  (« transforming growth factor  $\beta$  »), les cytokines TPO (thrombopoïétine), SCF (« stem cell factor ») et CXCL12 qui vont activer les différentes voies de signalisation et induire l'expression de gènes clés pour le maintien des CSH ou au contraire leur différenciation (Lin et al., 2015; Mirantes et al., 2014).

Ainsi, le destin des CSH est finement régulé par un réseau complexe d'interaction entre différents facteurs internes et externes à la cellule.

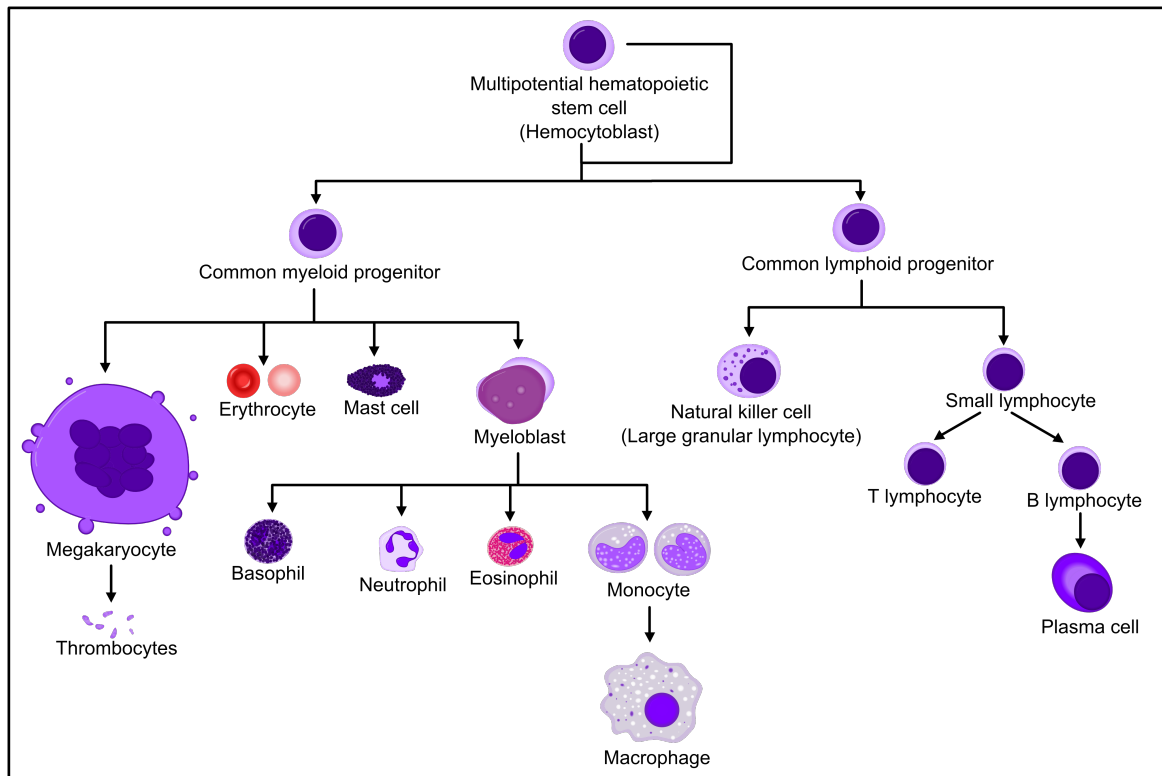


Illustration par A. Rad en 2006

### Figure 1.1. Hiérarchie simplifiée des différents lignages hématopoïétiques

Chez les mammifères, la formation des cellules sanguines suit un modèle pyramidal ou hiérarchique. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se trouvent au sommet de la pyramide et vont générer l'ensemble des cellules hématopoïétiques. Ces cellules subissent des étapes successives de différenciation. Dans un premier temps, les CSH génèrent deux types de progéniteurs distincts : les progéniteurs myéloïdes (« CMP ») et les progéniteurs lymphoïdes (« CLP »), qui vont à leur tour, être à l'origine de l'ensemble des cellules matures des lignages myéloïde et lymphoïde respectivement.

Les CSH au sommet de la hiérarchie hématopoïétique ont la capacité de générer plusieurs types de cellules sanguines spécialisées, communément regroupés en trois catégories selon leur fonction et leur caractéristiques histologiques: les érythrocytes ou hématies ou encore globules rouges, les leucocytes ou globules blancs et enfin les thrombocytes ou plaquettes sanguines (Orkin, 2000). Les leucocytes sont subdivisés en trois autres catégories : les granulocytes, les lymphocytes et les monocytes (Cf. **figure 1.1**). Chacune de ces cellules assure une fonction fondamentale bien spécifique :

(i) les hématies assurent le transport des gaz respiratoires entre les poumons et les différents tissus de l'organisme. Cette fonction est essentielle à l'oxygénation des tissus et à l'élimination du gaz carbonique, principal déchet produit lors de la respiration.

(ii) les leucocytes assurent la réponse immunitaire. Les granulocytes sont impliqués dans la défense contre les infections bactériennes, parasitaires et allergiques. Les monocytes sont responsables de la phagocytose de corps étrangers. Les lymphocytes quant à eux assurent la production d'anticorps et contribuent à la réponse immunitaire dite adaptative.

(iii) les plaquettes, générées par les mégacaryocytes, jouent un rôle primordial dans le processus de coagulation sanguine et donc de cicatrisation. Elles permettent de colmater les lésions endothéliales en formant des agrégats appelés thrombus ou caillot.

### **1.1.2 La leucémie myéloïde aigüe ou LMA : description**

Maintenant que nous avons abordé l'hématopoïèse en condition normale, nous pouvons aborder les hémopathies plus particulièrement la leucémie, qui est un cancer de la moelle osseuse et du sang périphérique. Dans cette section, nous nous intéresserons plus particulièrement à un type de leucémie, la leucémie myéloïde (ou myéloblastique) aigüe (LMA) qui est la leucémie aigüe la plus commune chez les adultes avec 80 % des cas parmi les leucémies aigües (Yamamoto and Goodman, 2008). En effet, on distingue différents types de leucémies selon leur agressivité aigüe ou chronique ainsi que leur aspect cytologique, qui est directement en lien avec le lignage cellulaire affecté, qu'il soit myéloïde ou lymphoïde. On distingue ainsi quatre principaux types de leucémies : la leucémie myéloïde aigüe (LMA), la leucémie myéloïde chronique (LMC), la leucémie lymphoblastique aigüe (LLA) et la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Les leucémies aigües sont caractérisées par une évolution clinique rapide contrairement aux leucémies chroniques qui progressent plus lentement.

La LMA est une maladie clonale des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes, qui perdent leur capacité normale de différenciation ce qui mène à leur blocage à un stade précoce de différenciation et acquièrent des capacités anormales de prolifération et de survie. Ces progéniteurs immatures, appelés « blastes », vont envahir la moelle osseuse et le sang périphérique, aux dépens des cellules hématopoïétiques normales, ce qui conduit à un défaut des éléments figurés normaux du sang (hématies, plaquettes et leucocytes).

D'après la classification des tumeurs du système hématopoïétique publiée en 2008 par l'organisation mondiale de la santé (Pabst et al.), le diagnostic de LMA est posé, sauf exception, lorsque la proportion de myéloblastes est supérieure à 20% des cellules nucléées

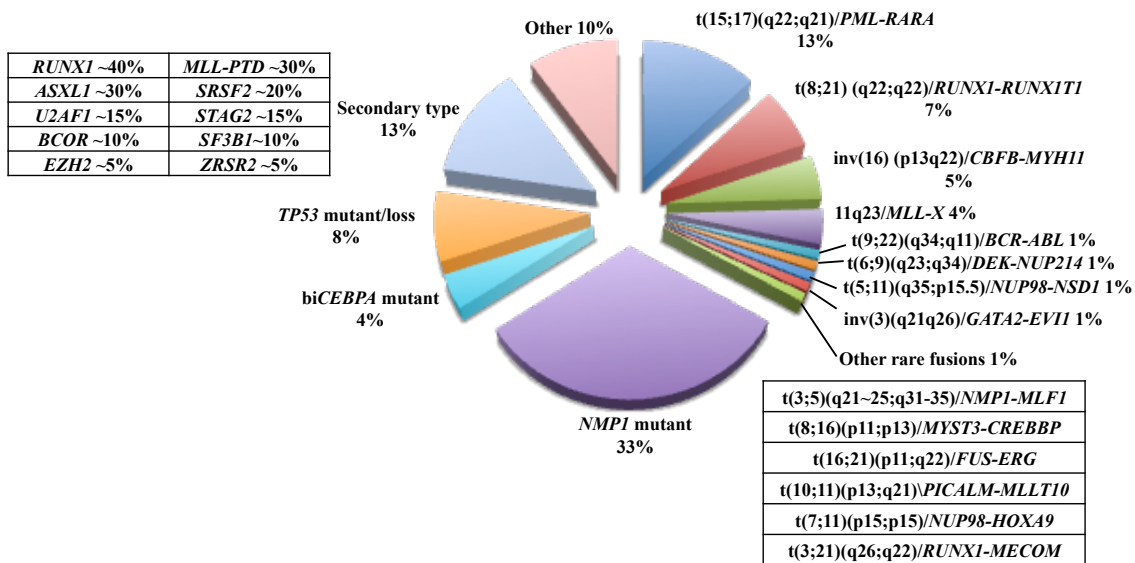
dans la moelle osseuse et le sang périphérique (Swerdlow et al., 2008). D'après l'analyse du registre américain des cancers, les LMA représentent environ 30% de toutes les leucémies chez l'adulte. Cependant, elles restent des maladies très rares, avec une incidence ajustée à l'âge de 4,3 par 100 000 habitants par an sur la période de 2011 à 2015, ce qui représente moins de 2% de la totalité des cancers. Sur la même période, l'incidence est plus élevée chez les hommes que chez les femmes (5,2 contre 3,6 par 100 000 habitants par an) et augmente avec l'âge. L'âge moyen au diagnostique est de 68 ans aux États-Unis (Statistiques du National Cancer Institute, 2018).

Depuis les années 1970, les traitements ont très peu évolué. A l'heure actuelle, les traitements consistent en une ou plusieurs cures de chimiothérapie intensive, associée éventuellement à une greffe allogénique de CSH. La première étape consiste à évaluer l'éligibilité du patient à recevoir ces traitements intensifs. Le traitement initial ou thérapie d'induction de la rémission complète repose sur l'association de cytarabine (7 jours) et d'anthracycline (3 jours) selon le schéma "7+3". Il permet d'obtenir une rémission complète dans 60 à 85 % des patients âgés de moins de 60 ans. Suite à la rémission, des cures de chimiothérapie supplémentaires sont proposées comme thérapie de consolidation ou thérapie post-rémission afin de prévenir la rechute. En cas de pronostic sévère, une allogreffe de CSH de fin traitement peut être proposée aux patients dont la rémission complète ne peut être atteinte avec les traitements conventionnels (Dohner et al., 2015). Par contre, ce type de traitement est moins efficace en cas de rechute et peu de patients atteignent une deuxième rémission complète. Bien que la survie globale se soit améliorée, elle reste d'à peine 30 % après 5 ans d'après l'analyse du registre américain. De plus, chez les patients âgés de plus de 60 ans, le pronostic reste très défavorable (Statistiques du National Cancer Institute, 2018).

Afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus ciblées et d'améliorer le pronostic des patients, une compréhension approfondie de la pathogénèse des LMA au niveau moléculaire s'avère essentielle.

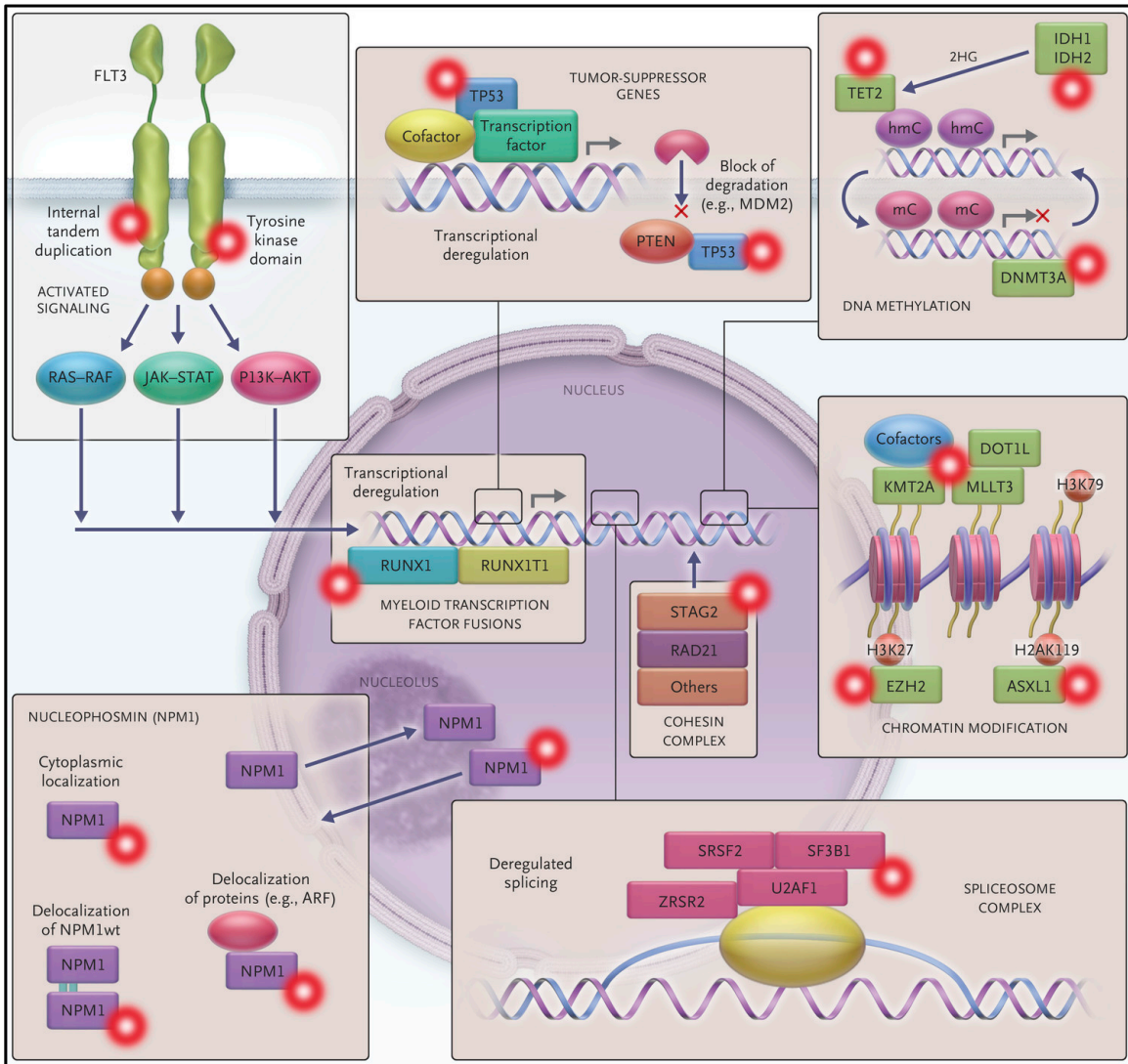


En effet, les LMA sont des maladies très hétérogènes sur le plan biologique, soit au niveau cytologique, cytogénétique et moléculaire d'où la nécessité de thérapies ciblées. Effectivement, la différenciation des précurseurs myéloïdes peut être bloquée à différents niveaux conduisant à la formation de blastes qui présentent des aspects morphologiques et des caractéristiques différentes. De plus, à la fin des années 1970 début des années 1980, l'étude du caryotype des cellules blastiques par la méthode classique de coloration des bandes G (« G-banding ») a révélé la présence de nombreuses anomalies cytogénétiques récurrentes dans plus de 50% des LMA (Hagemeyer and van der Plas, 1990; Mitelman and Brandt, 1974; Takeuchi et al., 1981). Les anomalies chromosomiques les plus courantes sont mentionnées dans la **figure 2**. Et quelques années plus tard, un certain nombre d'anomalies moléculaires récurrentes ont aussi été identifiées dans les gènes *FLT-3* (Nakao et al., 1996), *NPM1* (Falini et al., 2005), *CEBPA* (Pabst et al., 2001) et *MLL* (Caligiuri et al., 1994), souvent associées avec un caryotype normal. De plus, avec l'essor des techniques de séquençage à haut débit ces dernières années, le spectre des mutations récurrentes impliquées dans les LMA a pu être élargi et un accroissement des informations sur l'évolution clonale au cours de la maladie et sur le profil épigénétique a été observé. En particulier, l'étude exhaustive du génome (séquençage du génome, de l'ARN, des microARN et analyse de la méthylation de l'ADN) de 200 patients atteints de LMA *de novo* menée par le Cancer Genome Atlas Research Network en 2013, a permis d'identifier un ensemble de gènes fréquemment mutés qui ont été regroupés en 8 classes fonctionnelles (**Cf. figure 1.3**). Les résultats de cette étude montrent également que les mutations fréquentes dans les gènes *DNMT3A*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1/2* et *RUNX1* sont mutuellement exclusives des fusions chromosomiques (Cancer Genome Atlas Research Network - 39 collaborators, 2013).



**Figure 1.2. Distribution des différentes anomalies cytogénétiques et moléculaires présentes chez des patients âgés de 16 à 60 ans atteints de LMA**

La distribution des anomalies cytogénétiques et moléculaires est basée sur l'analyse d'une grande cohorte de patients âgés de 16 à 60 ans. Approximativement un tiers des LMA est caractérisé par la présence de réarrangements chromosomiques, qui conduisent à la production d'oncoprotéines chimériques considérées comme l'étape initiale du développement de la maladie. Ces aberrations chromosomiques sont mutuellement exclusives des mutations dans le gène nucleophosmin (*NPM1*) ou les mutations bi-allélique *CEBPA* (*biCEBPA*), qui sont reconnues comme des anomalies génétiques récurrentes des LMA et généralement associées avec un caryotype normal. Adapté de Grimwade *et al.*, 2016.



D'après Döhner *et al.*, 2015

### Figure 1.3. Les 8 classes de gènes fréquemment mutés dans les LMA

Basé sur les données du Cancer Research Atlas. Les gènes fréquemment mutés sont désignés par les points rouges. Avec la permission de Döhner *et al.*, 2015, Copyright Massachusetts Medical Society.

Deux types de système de classifications des LMA ont été développés : (i) le système de classification franco-américano-britannique (Kim *et al.*, 2014) établi en 1976 basé sur l'aspect cytologique des blastes (Bennett *et al.*, 1976) et (ii) le système de classification de l'Organisation mondiale de la santé (Pabst *et al.*, 2001) établi en 2001, révisé en 2008 et 2016, basé sur les aspects cytologique, cytogénétique et moléculaire des blastes (Arber *et al.*, 2016; Swerdlow *et al.*, 2008).

Ces différentes anomalies qu'elles soient chromosomiques ou moléculaires sont associées avec un profil d'expression génique spécifique. En particulier, dans les LMA le niveau d'expression des gènes *HOX* et de leurs cofacteurs associés sont très fréquemment surexprimés (Lawrence et al., 1999).

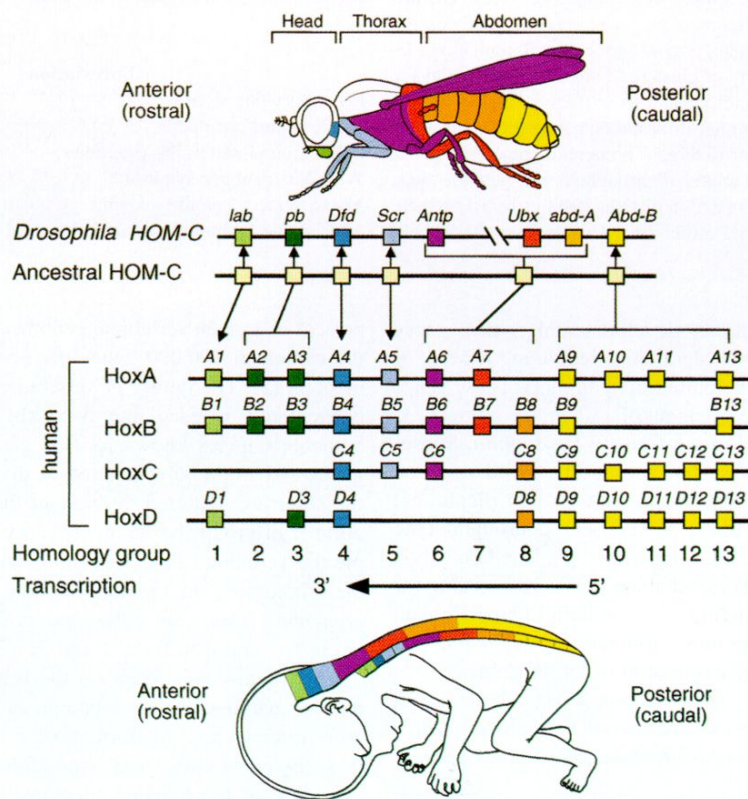
### 1.1.2.1 Les gènes *HOX*

Les gènes *HOX* sont très fortement conservés au cours de l'évolution chez les animaux à symétrie bilatérale (Garcia-Fernandez, 2005). Ce sont des membres de la famille des gènes homéotiques impliqués dans la détermination de l'identité des différents segments morphologiques spécifiques de chaque partie du corps le long de l'axe antéro-postérieur (Mallo et al., 2010). Ces gènes ont été mis en évidence chez la *Drosophile* et font partie aujourd'hui des gènes les plus largement étudiés de la biologie du développement. Les gènes homéotiques sont par définition des gènes dont la mutation produit une homéose (du grec « homeosis »), c'est-à-dire la transformation d'une structure située au niveau d'un segment du corps en une autre homologue située dans un autre segment. Les premières observations de transformations homéotiques remontent à 1894, bien avant la découverte des gènes. C'est le biologiste anglais William Bateson, qui en étudiant les variations intraspécifiques chez un coléoptère, observa notamment l'apparition de pattes à la place des antennes. Il fit des observations similaires chez les plantes (Bateson, 1894). En 1923, Calvin Bridges et Thomas Morgan vont observer l'apparition d'une deuxième paire d'ailes à la place des haltères chez *Drosophila melanogaster* due à une mutation du gène homéotique *bithorax* (Bridges and Morgan, 1923). Ce n'est qu'en 1948, dans le laboratoire d'Edward Lewis que la mutation du gène *Antennapedia* sera identifiée comme étant à l'origine de la transformation des antennes en pattes.

Les huit gènes homéotiques présents chez la drosophile, sont divisés en deux groupes, soit le complexe *Antennapedia* (*Lab*, *Pb*, *Dfd*, *Scr* et *Antp*) qui contrôle le développement de la tête et des segments thoraciques antérieurs et le complexe *Bithorax* (*Ubx*, *Abd-A* et *Abd-B*) qui régule le développement des segments thoraciques et abdominaux postérieurs (Cf. **figure 1.4**) (Mallo and Alonso, 2013). Chez les mammifères, trente-neuf gènes *HOX* sont organisés en quatre complexes HOXA, HOXB, HOXC et HOXD situés chacun sur un chromosome

différent. De plus, chaque complexe comprend de 9 à 11 gènes répartis en treize groupes homologues (Cf. **figure 1.4**) (Mallo and Alonso, 2013).

Les gènes homéotiques contiennent une séquence d'ADN commune d'environ 180 paires de base appelée la boîte homéotique, qui code pour le domaine homéotique ou homéodomaine, une hélice-boucle-hélice de 60 aa hautement conservée (Gehring et al., 1994; McGinnis et al., 1984a; McGinnis et al., 1984b). Les protéines HOX sont des facteurs de transcription, qui par l'intermédiaire de leur domaine homéotique, reconnaissent et lient des séquences spécifiques de l'ADN (Burglin and Affolter, 2016; Levine and Hoey, 1988).



D'après Mark *et al.*, 1997

**Figure 1.4. La disposition des gènes *HOX* chez la drosophile et l'homme**

Chez la drosophile, les huit gènes *HOX* sont localisés sur le chromosome 3 et sont regroupés en deux régions bien distinctes : le complexe *Antennapedia* (*ANT-C*) et le complexe *Bithorax* (*BX-C*) qui, ensemble, forment le complexe homéotique (*HOM-C*). *ANT-C* comprend cinq gènes *HOX* : *labial* (Cancer Genome Atlas Research Network - 39 collaborators), *proboscipedia* (Giotopoulos et al., 2016), *Deformed* (*Dfd*), *Sex combs reduced* (*Scr*) and *Antennapedia* (*Antp*) et *BX-C* trois gènes *HOX* : *Ultrabithorax* (*Ubx*), *Abdominal-A* (*Abd-A*) et *Abdominal-B* (*Abd-B*). Chez l'homme, les trente-neuf gènes *HOX* sont organisés en quatre complexes (HOXA, HOXB, HOXC et HOXD) situés chacun sur un chromosome différent (7, 17, 12 et 2). Chaque complexe contient de 9 à 11

membres qui proviennent de la duplication d'un complexe ancestral. La position relative de chaque membre est conservée de la drosophile à l'homme. Les membres des différents complexes sur chaque chromosome sont alignés verticalement par homologie de séquence, par exemple A4, B4, C4 et D4 qui sont alors qualifiés de paralogues. L'organisation des gènes *HOX* le long des chromosomes joue un rôle crucial dans la coordination de leur expression. Ainsi, les gènes situés dans la région 3' sont exprimés plus tôt et dans les structures antérieures de l'embryon, alors que les gènes situés en 5' sont exprimés plus tard et dans les régions postérieures (colinéarité spatio-temporelle). Avec l'accord de l'éditeur Springer Nature, numéro de licence : 4370800387118.

### **1.1.2.1.1 La régulation des gènes *HOX***

Le contrôle de l'expression des gènes *HOX* est finement régulé et implique un large éventail de mécanismes dont plusieurs sont conservés entre la mouche et les mammifères. Il existe deux classes de régulateurs : ceux qui sont responsables de l'initiation de l'expression des gènes *HOX* et ceux qui sont responsables du maintien de leur expression.

#### **1.1.2.1.1.1 L'initiation de l'expression des gènes *HOX***

L'initiation de l'expression des gènes *HOX* est induite par l'acide rétinoïque, le facteur de croissance FGF (« fibroblast growth factor »), la voie de signalisation Wnt/Wg et les facteurs de transcription tels que les CDX (« caudal type homeobox »).

La signalisation par l'acide rétinoïque joue un rôle primordial au cours de l'embryogenèse. En effet, les embryons de souris exposés à de fortes doses d'acide rétinoïque subissent des transformations homéotiques induites par un changement dans l'expression des gènes *HOX* (Kessel and Gruss, 1990). L'acide rétinoïque, un métabolite de la vitamine A ou rétinol, se fixe sur son récepteur nucléaire RAR (« retinoic acid receptor ») qui forme des hétérodimères avec les récepteurs RXR (« retinoid X receptor ») pour s'associer au niveau de séquences spécifiques de l'ADN, les RARE (« retinoic acid response element ») (Rhinn and Dolle, 2012). En outre, des éléments de réponse à l'acide rétinoïque ou RARE ont été identifiés à proximité des gènes *HOX* et sont nécessaires pour l'activation de leur transcription (Marshall et al., 1996).

Le facteur de croissance FGF lie les récepteurs FGFR (au nombre de quatre chez les mammifères) à activité tyrosine kinase pour induire entre autres la voie de signalisation

Ras/MAPK et conduire à l'activation de facteurs de transcription. La surexpression de FGF induit des défauts dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur chez le Xénope dus à l'induction de l'expression des gènes *HOX* postérieurs (Pownall et al., 1996). De plus, il semblerait que l'effet de FGF sur l'expression des gènes *HOX* soit indirect et provienne de sa capacité à réguler l'expression du facteur de transcription CDX, connu pour réguler la transcription des gènes *HOX* (Isaacs et al., 1998).

La voie de signalisation Wnt/Wg a été montrée comme étant impliquée dans l'activation de l'expression des gènes *HOX*. En effet, chez le vers *C. elegans*, la voie Wnt active l'expression des gènes *HOX* lors de la migration des neuroblastes (Maloof et al., 1999). Il semblerait que le contrôle de l'expression des gènes *HOX* par la voie Wnt soit aussi indirect et ne soit en fait que le résultat de l'induction de l'expression des facteurs de transcription CDX (Dorey and Amaya, 2010).

Les facteurs de transcription CDX apparaissent donc comme l'élément clé dans la régulation des gènes *HOX* puisque l'activation par l'acide rétinoïque, le facteur de croissance FGF et enfin la voie Wnt semblent tous trois converger vers leur expression (Lohnes, 2003). Ces facteurs font partie de la famille des gènes *paraHOX* qui dérivent d'un ancêtre commun avec les gènes *HOX* (Brooke et al., 1998). Le premier membre de la famille *CDX*, le gène à homéodomaine *caudal* (*cad*), a été identifié chez la drosophile (Mlodzik et al., 1985). Chez les mammifères, il existe trois homologues, soit *Cdx1*, *Cdx2* et *Cdx4*. Les facteurs CDX jouent un rôle essentiel dans le développement de la partie postérieure de l'embryon et comme les gènes *HOX* dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur (Young and Deschamps, 2009). L'inactivation du gène *Cdx1* chez la souris induit des transformations homéotiques antérieures (Subramanian et al., 1995). Les facteurs de transcription CDX régulent l'expression des gènes *HOX* en se liant au niveau de sites consensus situés dans leur région régulatrice. En effet, *Cdx1* a la capacité de transactiver l'expression de *Hoxa7* (Subramanian et al., 1995).

Les facteurs CDX sont également connus pour être impliqués dans la spécification des CSH au cours de l'embryogenèse. En effet, chez le poisson-zèbre, les embryons mutants pour le gène *cdx4* présentent à la fois des défauts de développement dans la partie postérieure associés à une diminution des niveaux d'expression des gènes *HOX* postérieurs et des

altérations de l'hématopoïèse embryonnaire (Davidson et al., 2003). En outre, la double répression des gènes *cdx1a* et *cdx4* entraîne l'absence de cellules érythroïdes et une réduction du nombre de CSH, un phénotype qui est complètement restauré suite à la surexpression du gène *HOXA9* dans ces embryons (Davidson and Zon, 2006). Récemment, il a été montré que la double délétion des gènes *Cdx1* et *Cdx2* chez la souris affecte l'hématopoïèse primitive et la vascularisation en concomitance avec la réduction de l'expression de facteurs de transcription hématopoïétiques (Brooke-Bisschop et al., 2017).

#### 1.1.2.1.1.2 Le maintien de l'expression des gènes *HOX*

Le maintien de l'expression des gènes *HOX* est régulé à la fois de façon post-transcriptionnelle par des ARN non codants (ARNnc) et de façon transcriptionnelle par des modifications épigénétiques au niveau de la chromatine.

#### Les ARN non codants (ARNnc)

Les ARNnc sont des ARN, qui comme leur nom l'indique, ne contiennent pas d'information destinée à la synthèse de protéine mais sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes cibles. Il existe deux types d'ARNnc, les petits ARNnc (Stefani and Slack, 2008) et les longs ARNnc (Rinn and Chang, 2012). Les ARNnc jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes *HOX* (Brock et al., 2009).

Il existe trois classes majeures de petits ARNnc : les petits ARN interférants (« small interfering RNA, siRNA »), les ARN interagissant avec Piwi (« piwi-interacting RNA, piRNA ») et les microARN (« miRNA »). Les microARN répriment l'expression de leur gène cible en liant une séquence complémentaire dans la région 3'UTR des ARN messagers conduisant à la dégradation et/ou la répression de la traduction de cet ARNm (Lee and Shin, 2012). La plupart des microARN impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *HOX*, sont encodés dans les *clusters* *HOX*. Cet arrangement génomique permet leur expression parallèlement aux gènes *HOX*. Chez les mammifères, il existe trois familles de microARN : miR-10, miR-196 et miR-615 (Mallo and Alonso, 2013). La diminution de miR-196 chez le poulet (McGlenn et al., 2009) ou le poisson-zèbre (He et al., 2011) génère des transformations



homéotiques dues à la dé-repression des gènes *HOX* exprimés dans la partie plus antérieure de l'embryon. Chez la *Drosophile*, il existe quatre microARN (miR-*iab-4*, miR-*iab-8*, miR-10 et miR-993) impliqués dans la régulation de l'expression des gènes des complexes *Antp* et *Ubx* (Mallo and Alonso, 2013). Les microARN joueraient un rôle dans la prévalence postérieure en réprimant les gènes *HOX* exprimés dans les parties plus antérieures de l'embryon (Mallo and Alonso, 2013).

Les longs ARNnc comportent de 300 à plusieurs milliers de nucléotides. Comme les ARN messagers, ils sont épissés et polyadénylés (Carninci et al., 2005). Différents mécanismes d'action ont été décrits tels que la compétition pour des facteurs de transcription avec des gènes situés à proximité ou le recrutement de complexes de modification de la chromatine (Lee, 2012). Chez la *Drosophile*, deux longs ARNnc *bithoraxoid* (*bxd*) et *iab-8* ont été identifiés comme régulant l'expression des gènes *HOX*. *Bxd* contrôle la transcription du gène *Ubx* en recrutant le complexe TrxG (Petruk et al., 2006). Dans le système nerveux central de la drosophile, l'expression postérieure d'*abd-A* est réprimée par *iab-8* (Gummalla et al., 2012). Chez les mammifères, HOTAIR (« *HOX* transcript antisense intergenic RNA ») fût le premier long ARNnc mis en évidence dans la régulation des gènes *HOX*. Il est localisé au sein du cluster HOXC. De façon surprenante, il réprime l'expression des gènes du complexe postérieur HOXD en recrutant des complexes de modification de la chromatine (Rinn et al., 2007). Quelques années plus tard, HOTTIP (« *HOXA* transcript at the distal tip ») situé au sein du *cluster* HOXA, fût identifié comme étant responsable de l'activation et/ou du maintien de la transcription des gènes *HOXA* en recrutant la protéine WDR5 du complexe TrxG (Wang et al., 2011).

### **Les modifications épigénétiques**

Les marques épigénétiques correspondent à l'ensemble des modifications des composants de la chromatine, qui induise soit des changements dans sa structure soit le recrutement de différents facteurs, le tout sans altérer la séquence d'ADN. L'étude de la régulation des gènes *HOX* chez la *Drosophile* a permis l'identification des complexes épigénétiques Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG). Ces complexes ne sont pas requis pour la mise en place du patron d'expression des gènes *HOX* mais plutôt pour le maintien de leur

expression. Les membres du complexe TrxG sont impliqués dans le maintien d'un état transcriptionnel actif des gènes *HOX* alors qu'à l'inverse, le complexe PcG maintient un état répressif. Des éléments de réponse aux groupes PcG et TrxG, soit PRE et TRE respectivement, sont retrouvés au niveau des séquences régulatrices des gènes *HOX* (Schuettengruber et al., 2007; Schuettengruber et al., 2011). Les groupes PcG et TrxG sont composés de protéines capables de modifier les histones, de protéines de remodelage de la chromatine ou de protéines de liaison à l'ADN. Le groupe PcG comprend trois complexes : PhoRC (« Pleiohomeotic repressive complex »), PRC1 et PRC2 (« Polycomb repressive complex »). Les complexes principaux du groupe TrxG sont : COMPASS (« complex proteins associated with Set1 »), ASH1 (« absent small and homeotic discs 1 »), TAC1 (« trithorax acetylation complex 1 ») et des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant tels que SWI/SNF, ISWI (Schuettengruber et al., 2011).

Le complexe PRC2 interagit dans un premier temps avec l'ADN cible pour introduire les marques répressives H3K27me3 au niveau de la chromatine, qui sont reconnues par le groupe PRC1 qui promeut le silençage de la chromatine associée, par l'ajout de modifications des histones telles que l'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub) (Schuettengruber et al., 2007). Le recrutement des complexes du groupe TrxG est plus complexe et serait associé à la marque active H3K4me3 au niveau de la chromatine (Schuettengruber et al., 2011).

#### **1.1.2.1.1.3 Les cofacteurs des gènes *HOX***

La spécificité d'interaction et l'affinité de liaison à l'ADN des gènes *HOX* résident dans leur association avec leurs cofacteurs. Les plus connus sont MEIS1 (« myeloïd ecotropic viral integration site 1 ») et PBX (« Pre-B-cell leukemia homeobox »), des protéines à homéodomaine de la famille TALE (« three amino acids loop extension »), qui sont conservées chez la drosophile. Ces facteurs seront abordés plus en détails dans la section 1.1.3.2. Cependant, il est important de noter que les protéines *HOX* forment des complexes hétérodimériques de liaison à l'ADN avec PBX (Chang et al., 1995; Mann and Chan, 1996) ou MEIS (Shen et al., 1997). De plus, les facteurs MEIS et PBX peuvent former un complexe hétérodimérique de liaison à l'ADN entre eux (Chang et al., 1997). Finalement, dans les

cellules myéloïdes, MEIS s'associe à l'hétérodimère PBX-HOXA9 lié à l'ADN pour former un hétérotrimère. En outre, il semblerait que la liaison à l'ADN ne soit pas requise puisque des hétérotrimères PBX-HOXA9-MEIS sont retrouvés de façon stable sans liaison à l'ADN dans des cellules myéloïdes leucémiques (Shen et al., 1999).

#### 1.1.2.1.2 Le rôle des gènes *HOX* au cours du développement

Au cours de l'embryogénèse, les gènes *HOX* jouent un rôle essentiel dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur (A-P) et le développement des membres. En 1978, Edward Lewis introduisit pour la première fois, la notion de **colinéarité spatiale** de l'expression des gènes *HOX* chez la *Drosophile* (Lewis, 1978). En effet, il remarqua en établissant la carte génétique de mutants homéotiques affectant le thorax et l'abdomen de la drosophile, que ces mutations formaient un complexe de gènes sur le chromosome 3 qu'il appela complexe *Bithorax* et que l'alignement des effets des mutants le long de l'axe A-P correspondait exactement à celui de la carte génétique (Cf. **figure 1.4**). Cette colinéarité spatiale est également retrouvée chez les mammifères (Gaunt, 1988) (Cf. **figure 1.4**). De plus, il existe une **colinéarité temporelle** : les gènes situés dans la région 3' s'expriment plus précocement que ceux situés en 5' (Duboule and Dolle, 1989). Ainsi, le long de l'axe A-P, chaque segment de l'embryon est caractérisé par un patron unique d'expression des gènes *HOX*, ce qui a conduit à l'hypothèse d'un code des gènes *HOX* (« Hox code hypothesis ») (Kessel and Gruss, 1990). De plus, la perte de fonction d'un gène *HOX* provoque généralement une transformation homéotique seulement dans la limite antérieure de son domaine d'expression, ce qui a conduit à la suggestion de la **règle de prévalence postérieure** (Duboule and Morata, 1994). En effet, les protéines HOX postérieures répriment l'expression des gènes *HOX* dans les zones plus antérieures. (Les gènes postérieurs sont dominants sur les plus antérieurs.) Les gènes paralogues présentent une **redondance fonctionnelle** entre eux. Par exemple, la délétion des gènes *Hoxa11* ou *Hoxd11* seuls ne présente que des défauts développementaux mineurs des os des membres antérieurs : le radius et le cubitus (ulna), alors qu'une perte complète de ces deux os est observée suite à la délétion concomitante des deux gènes *Hoxa11* et *Hoxd11* (Davis and Capecchi, 1994; Davis et al., 1995; Small and Potter, 1993). Les quatre caractéristiques indiquées en gras sont le fondement du code des gènes *HOX*.

Chez les mammifères, les gènes *HOX* sont essentiels pour le développement des rhombomères (constituants du tube neural de l'embryon), des arcs branchiaux et des somites mais également dans la détermination des patrons de développement des membres (Mallo et al., 2010). Ils sont également impliqués dans le développement des organes internes tels que les poumons, le foie, la prostate (Economides and Capecchi, 2003; Hrycaj et al., 2015; Wellik et al., 2002; Yallowitz et al., 2011).

#### **1.1.2.1.2.1 Le rôle des gènes *HOX* dans l'hématopoïèse normale**

Le rôle des gènes *HOX* n'est pas seulement limité au développement puisque leur expression est maintenue dans les tissus adultes avec des profils spécifiques (Dunwell and Holland, 2016; Yamamoto et al., 2003). Les gènes *HOX* jouent un rôle essentiel dans les tissus adultes qui ont une capacité de régénération et/ou de renouvellement constant. Ils vont induire la différenciation des cellules souches ou progéniteurs vers leur lignage spécifique afin de réparer ou simplement maintenir la fonction normale de ces tissus (Rux and Wellik, 2017; Seifert et al., 2015). Entre autre, les gènes *HOX* ont un rôle essentiel dans l'hématopoïèse où chaque lignage présente un profil d'expression spécifique (Kongsuwan et al., 1988).

Au cours de l'hématopoïèse, seuls les gènes des complexes HOXA, B et C sont exprimés et ce de façon majoritaire dans les CSH les plus primitives et dans les progéniteurs (les cellules CD34<sup>+</sup>) puisque leur expression est quasiment absente dans les cellules matures (les cellules CD34<sup>-</sup>) (Pineault et al., 2002; Sauvageau et al., 1994). Ainsi, il est possible, en modulant l'expression de certains gènes *HOX*, de favoriser de façon expérimentale, la formation d'un lignage spécifique. Par exemple, la surexpression de *HOXA5* dans des CSH humaines favorise l'expansion des progéniteurs myéloïdes et bloque l'érythropoïèse (Crooks et al., 1999).

Le gène *HOXA9* est un des gènes *HOX* les plus exprimés dans les CSH et progéniteurs alors que son expression diminue au cours de la différenciation, suggérant un rôle dans la régulation des CSH (Lawrence et al., 1997; Pineault et al., 2002; Sauvageau et al., 1994). En effet, l'inactivation totale du gène *Hoxa9* chez la souris présente un certain nombre de défauts hématopoïétiques dont une diminution du nombre de granulocytes et lymphocytes en circulation ainsi qu'une réduction de la population de progéniteurs myéloïdes, érythroïdes et

lymphoïdes B dans la moelle osseuse. De plus, ces souris présentent une rate et un thymus de petite taille (Lawrence et al., 1997). L'étude plus approfondie des CSH de ces souris montre une altération dans leur capacité de prolifération, de réponse à un stress hématopoïétique et de reconstitution à long terme de l'hématopoïèse après transplantation (Lawrence et al., 2005). À l'inverse, la surexpression du gène *Hoxa9*, *in vitro* et *in vivo*, dans les CSH favorise l'auto-renouvellement des CSH et l'expansion des précurseurs myéloïdes (Thorsteinsdottir et al., 2002). De façon intéressante, il a été montré que la surexpression du gène *HOXA9* dans des CSH humaines de sang de cordon induit une hausse d'expression de gènes impliqués dans la voie Wnt, une voie requise dans le maintien des CSH (Ferrell et al., 2005; Huang et al., 2012).

#### 1.1.2.1.2.2 Le rôle des gènes *HOX* dans les LMA

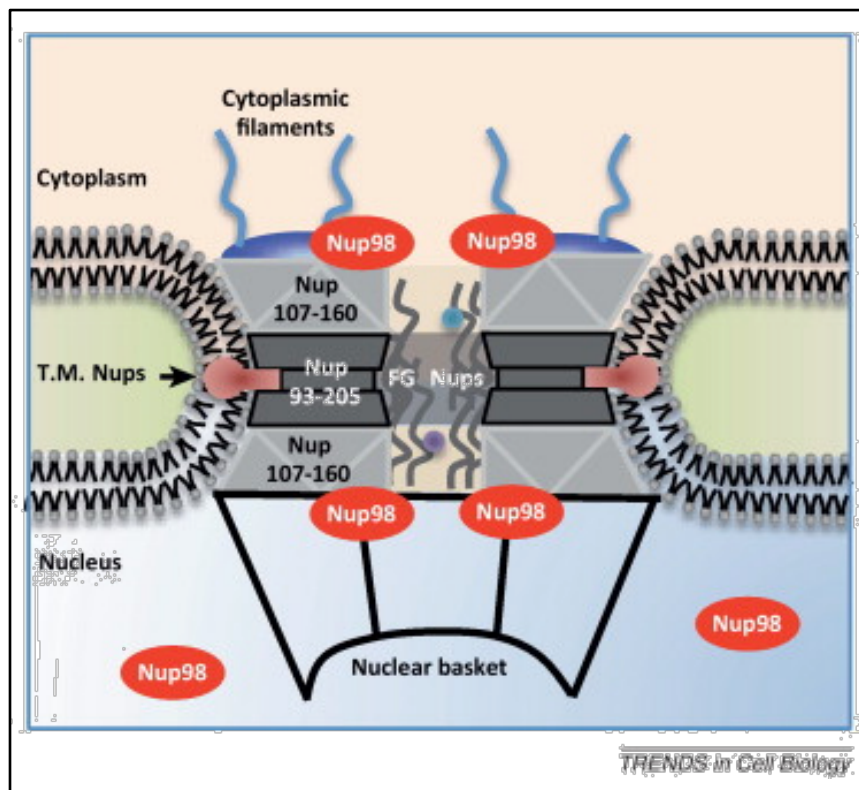
Comme les gènes *HOX* jouent un rôle essentiel dans l'hématopoïèse normale, il n'est pas surprenant que leur dérégulation soit associée avec la leucémogénèse (Alharbi et al., 2013; Golub et al., 1999). En effet, en 1988, Blatt *et al.* ont observé que le gène *Hoxb8* était constitutivement exprimé dans une lignée de leucémie myéloïde de souris (WEHI-3B) (Blatt et al., 1988). Il s'avère que le gène *Hoxb8* et l'interleukine 3 (IL-3) coopèrent pour induire le développement de LMA (Perkins and Cory, 1993). De nombreuses études ont rapporté le rôle des gènes *HOX* dans le développement de LMA (Alharbi et al., 2013; Skvarova Kramarzova et al., 2014).

Le gène *HOXA9* est d'un intérêt tout particulier puisqu'il est surexprimé dans plus de 50% des LMA et parmi une liste de 6 817 gènes, il est celui qui corrèle le plus avec un pronostic défavorable et un risque de rechute de la maladie (Golub et al., 1999). La transplantation de souris avec des CSH qui surexpriment le gène *Hoxa9* induit le développement d'un syndrome myéloprolifératif puis, après une longue latence (130 jours), les souris finissent par mourir d'une LMA. Cependant, la coexpression du gène *Hoxa9* et de son cofacteur MEIS1, induit le développement rapide de LMA et une issue fatale chez la souris en 40 à 60 jours (Kroon et al., 1998; Thorsteinsdottir et al., 2002). Il apparaît alors que la surexpression seule des gènes *HOX* ne soit pas suffisante à l'induction de la leucémie mais nécessite d'autres altérations génétiques.

L'analyse de différents profils de patients atteints de LMA a permis d'associer la dérégulation de l'expression des gènes *HOX* avec des anomalies génétiques récurrentes telles que des translocations impliquant directement les gènes *HOX* ou leur cofacteurs (Alharbi et al., 2013; Collins and Hess, 2016a, b). Entre autres, la nucléoporine NUP98 est un facteur impliqué dans la formation de fusion avec une large variété de gènes mais le plus fréquemment avec des gènes *HOX* (Nakamura, 2005) (Cf. **figure 1.6**). Et généralement, les réarrangements *NUP98* induisent l'activation oncogénique des gènes du complexe HOXA et B (Gough et al., 2011; Xu et al., 2016b).

### 1.1.2.2 Les fusions impliquant la nucléoporine NUP98

La nucléoporine NUP98 compte parmi la trentaine de nucléoporines qui composent le complexe du pore nucléaire, impliqué dans le transport bidirectionnel d'ARN et/ou de protéines. Le gène *NUP98* est situé sur le chromosome 11 à la position p15.4 et code pour deux variants de l'ARNm, soit *NUP98* et *NUP98-96* issus d'épissages alternatifs. La maturation autoprotéolytique du précurseur prépondérant NUP98-96 conduit alors à la formation de deux peptides NUP98 et NUP96. Cette étape est importante pour la localisation correcte de ces deux protéines matures (Franks and Hetzer, 2013). La protéine NUP98 est localisée à la fois sur les faces interne (côté nucléoplasme) et externe (côté cytoplasme) du pore mais aussi dans le noyau au niveau de structures indépendantes du pore, appelées les corps GLFG (Griffis et al., 2002; Griffis et al., 2003) (Cf. **figure 1.5**). En effet, la protéine NUP98 de 98 kDa et 920 aa contient dans sa partie N-terminale des motifs à répétition phénylalanine-glycine (FG) et glycine-leucine-phénylalanine-glycine (GLFG) et un domaine de liaison GLEBS (« Gle2p-binding sequence ») et dans sa partie C-terminale un domaine de liaison à l'ARN ainsi qu'un site de clivage autoprotéolytique à l'extrémité C-terminale (Cf **figure 1.6**). Le recrutement de NUP98 au niveau du pore nucléaire nécessite à la fois les motifs à répétition FG/GLFG et la partie C-terminale alors que sa localisation dans le noyau, quant à elle, ne requiert que les motifs FG/GLFG. La localisation de NUP98 dans le nucléoplasme suggère un rôle dans le modelage de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes (Capelson et al., 2010; Kalverda et al., 2010).



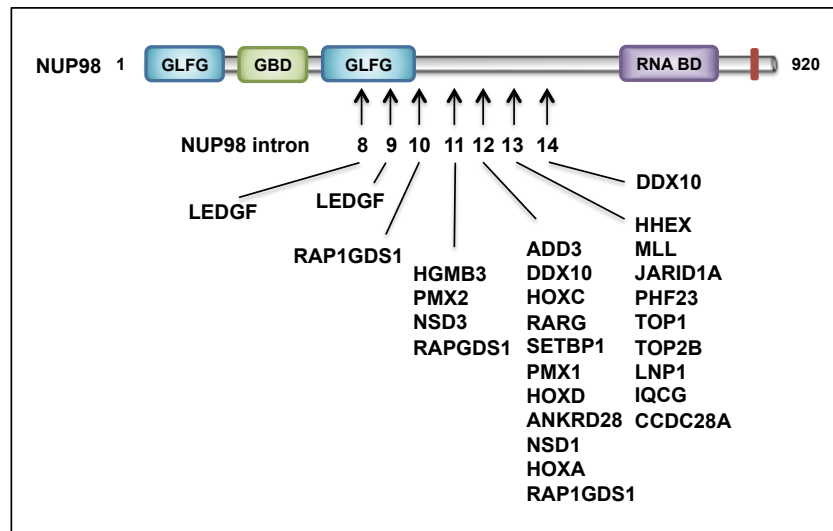
D'après Franks and Hetzer, 2013

### Figure 1.5. La localisation de NUP98 au niveau du pore nucléaire

La structure principale du pore est composée du complexe des nucléoporines NUP93 à 205 (en noir) et les structures de soutien du complexe des nucléoporines NUP107 à 160 (en gris) sur les faces interne et externe du pore. NUP98 est localisé à la fois au niveau des faces interne (côté nucléaire) et externe (côté cytoplasmique) du pore et dans le nucléoplasme (cercle rouge). Avec l'accord de l'éditeur Elsevier, numéro de licence : 4374291459257.

Bien que les réarrangements impliquant *NUP98* soient rares dans les LMA (1 à 2%), 35% des patients atteints d'une anomalie 11p15 présentent des réarrangements impliquant *NUP98* et ces derniers sont associés à un pronostic défavorable (Gough et al., 2011) (Cf. **Tableau 1.1**). Dans tous les cas, les translocations ou inversions *NUP98* (28 répertoriées) produisent des réarrangements conduisant à la formation de protéines fusionnées qui possèdent toutes une partie N-terminale commune, consistant aux motifs FG/GLFG répétés et au domaine GLEBS fusionné avec une partie C-terminale variable du partenaire de fusion (Cf. **figure 1.6**). Des modèles chez la souris ont démontré le potentiel leucémogénique d'une majorité de ces fusions (Gough et al., 2011). Entre autres, *NUP98* forment des fusions avec 9

gènes *HOX* (Alharbi et al., 2013) (Cf. **Tableau 1.1**). D'ailleurs, *NUP98* fût pour la première fois associé à une hémopathie maligne, la LMA, en 1996, avec l'identification de la fusion *NUP98-HOXA9* (Borrow et al., 1996; Nakamura et al., 1996).



**Figure 1.6. Les différents partenaires de fusion de NUP98**

Représentation schématique de la protéine NUP98 avec les différents points de fusion pour chaque partenaire impliqués dans les leucémies. Adapté de Gough *et al.*, 2011.



Rearrangement	Fusion transcript	Disease
<b>NUP98</b>		
t(7;11)(p15;p15)	NUP98-HOXA9	AML/MDS, t-AML/MDS, CML
t(7;11)(p15;p15)	NUP98-HOXA11	CML-BC
t(7;11)(p15;p15)	NUP98-HOXA13	AML, MDS
t(11;12)(p15;q13)	NUP98-HOXC11	AML
t(11;12)(p15;q13)	NUP98-HOXC13	AML
t(2;11)(q35;p15)	NUP98-HOXD11	Pediatric AML
t(2;11)(q31;p15)	NUP98-HOXD13	AML, t-AML
t(1;11)(q23;p15)	NUP98-PMX1	AML, t-MDS/AML
t(9;11)(q34;p15)	NUP98-PRRX2	t-AML
t(10;11)(q23;p15)	NUP98-HHEX	AML
inv(11)(p15;q22)	NUP98-DDX10	AML, MDS, CML
t(11;20)(p15;q11)	NUP98-TOP1	AML, t-MDS
t(9;11)(p22;p15)	NUP98-PSIP1	AML, MDS
t(5;11)(q31;p15)	NUP98-NSD1	Pediatric AML
t(8;11)(p11.2;p15)	NUP98-NSD3	AML
t(3;11)(p24;p15)	NUP98-TOP2B	AML (Monoblastic)
Complex (12p13)	NUP98-JARID1A	AML (Megakaryoblastic)
t(11;17)(p15;p13)	NUP98-PHF23	AML
Complex (3p25)	NUP98-ANKRD28	MDS/AML
t(6;11)(q24.1;p15.5)	NUP98-CCDC28A	AML (Megakaryoblastic), T-ALL
Complex (3q29)	NUP98-IQCG	Biphenotypic T-ALL/AML
t(11;18)(p15;q12)	NUP98-SETBP1	Pediatric T-ALL
t(4;11)(q21;p15)	NUP98-RAP1GDS1	Adult T-ALL
t(10;11)(q25;p15)	NUP98-Adducin 3	T-ALL
t(X;11)(q28;p15)	NUP98-HMGB3	t-AML
t(3;11)(q12;p15)	NUP98-LOC348801	AML
inv(11)(p15q23)	NUP98-MLL	AML
t(11;12)(p15;q13)	NUP98-RARG	APL
t(3;11)(p11;p15)	NUP98-POU1F1	t-AML

D'après Takeda and Yaseen, 2014

### Tableau 1.I. Réarrangements chromosomiques impliquant la nucléoporeine NUP98 dans les hémopathies malignes

AML : leucémie myéloïde aigüe; CML-BC : leucémie myéloïde chronique en phase blastique; MDS : syndrome myélodysplasique; t-AML : leucémie myéloïde aigüe reliée à la thérapie; t-MDS : syndrome myélodysplasique relié à la thérapie; APL : leucémie promyélocytaire aigüe; T-ALL : leucémie lymphoïde aigüe des cellules T ; B-ALL : leucémie lymphoïde aigüe des cellules B ; AUL : leucémie aigüe indifférenciée. Avec l'accord de l'éditeur Elsevier, numéro de licence : 4385950259778.

#### 1.1.3 La translocation chromosomique t(7;11)(p15;p15)

La translocation chromosomique t(7;11)(p15;p15), identifiée chez des patients atteints de LMA, génère la fusion des gènes *NUP98* et *HOXA9*, ce qui résulte en la formation d'une

protéine chimère qui consiste en la juxtaposition des parties N-terminale de NUP98 et C-terminale de HOXA9 (Borrow et al., 1996; Nakamura et al., 1996), référée ci-dessous à NA9.

### 1.1.3.1 Description de la translocation t(7;11)(p15;p15)

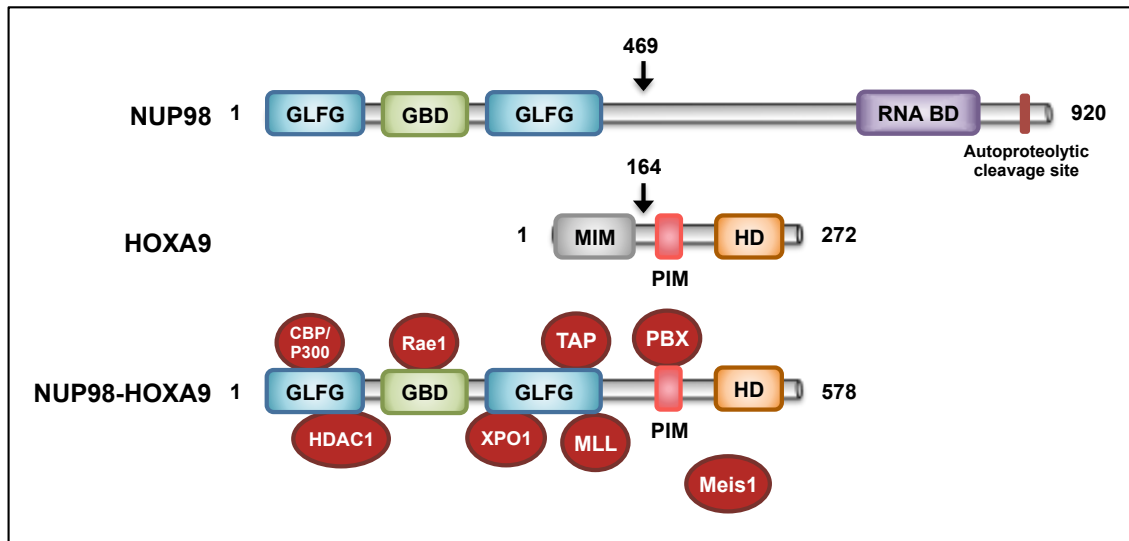
En effet, la protéine de fusion NA9 contient la région enrichie en motifs FG/GLFG de NUP98 ainsi que l'homéodomaine de HOXA9 (Cf **figure 1.7**). Principalement localisée dans des structures finement ponctuées à travers le noyau et exclus du nucléole, NA9 présente une localisation particulière, bien distincte de celle de chacune des parties qui la compose et même des protéines NUP98 et HOXA9 sauvages. De plus, au cours de la mitose, la fusion NA9 est localisée au niveau des kinétochores et des bras de chromosomes contrairement à la protéine NUP98, qui elle, est complètement diffuse dans la cellule (Xu and Powers, 2010). En outre, il semblerait que la fusion NA9 affecte la localisation de NUP98 en induisant la dispersion des corps GLFG (Xu and Powers, 2010).

Il a été montré, *in cellulo*, chez la souris, que la fusion NA9 favorisent la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et bloquent leur différenciation (Calvo et al., 2002). *In vivo*, les souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse surexprimant NA9 par transduction, développent un syndrome myéloprolifératif et finissent dans la majorité des cas par succomber d'une LMA après une longue latence (Kroon et al., 2001). Cependant, la coexpression du cofacteur MEIS1 ou de l'oncogène BCR-ABL accélère drastiquement le développement de la LMA (Dash et al., 2002; Kroon et al., 2001; Mayotte et al., 2002). Ce qui suggère que NA9 établit un état préleucémique qui requiert l'addition de transformations secondaires pour finalement conduire au développement de la LMA. *In cellulo*, NA9 promeut la prolifération des cellules primaires CD34<sup>+</sup> humaines et bloque leur différenciation autant vers la voie myéloïde qu'érythroïde. Et il s'avère que l'accroissement de la capacité proliférative coïncide avec une expression accrue d'oncogènes tels que les facteurs de transcription à homéodomaine, FLT-3 ou KIT et que le blocage de la différenciation coïncide avec la répression de gènes suppresseurs de tumeurs (Takeda et al., 2006).

C'est une étude *in cellulo* chez la souris, qui a fourni le premier indice sur l'activité de NA9 au niveau moléculaire, puisqu'elle a permis de montrer que les motifs à répétition

FG/GLFG de NUP98 agissaient comme un domaine de transactivation lorsque fusionnés au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 (Kasper et al., 1999). Consistant avec un rôle dans la modulation de la transcription, il a été montré que le profil d'expression génique de cellules myéloïdes humaines K562 exprimant NA9 présente un nombre significatif de gènes dont l'expression est modulée. Ainsi, la fusion NA9 agit comme un facteur de transcription aberrant capable de moduler l'expression de nombreux gènes et ce de manière dépendante de l'homéodomaine de HOXA9 (Ghannam et al., 2004).

Ces études fournissent un portrait des changements induits par NA9 qui pourraient en partie expliquer son potentiel leucémogénique. De plus, un certain nombre de partenaires d'interaction impliqués dans l'activité oncogénique de NA9 ont été identifiés au cours des 20 dernières années. Ces différents partenaires seront abordés dans la prochaine section.



**Figure 1.7. Structure schématique des protéines NUP98, HOXA9 et de la fusion NUP98-HOXA9 avec ses différents partenaires d'interaction**

La protéine NUP98 comporte trois types de domaines : un domaine riche en répétition glycine-leucine-phénylalanine-glycine (GLFG), un domaine de liaison GLEBS (GBD) et un domaine de liaison à l'ARN (RNA BD) ainsi qu'un site de clivage autoprotéolytique dans sa partie C-terminale. La protéine HOXA9 contient en plus de l'homéodomaine, deux motifs de liaison à ses cofacteurs MEIS (MIM) et PBX (PIM). La fusion NUP98-HOXA9 contient les 469 premiers acides aminés de NUP98 fusionnés aux acides aminés 164 à 272 de HOXA9. En rouge sont représentés les différents facteurs impliqués dans l'activité de NA9.

### **1.1.3.2 Les facteurs interagissant avec la protéine de fusion NUP98-HOXA9**

De nombreuses études ont permis l'identification de différents facteurs impliqués dans l'activité de la protéine de fusion NA9 dont les cofacteurs des gènes HOX, MEIS1 et PBX mais aussi des facteurs épigénétiques ou encore des facteurs impliqués dans le transport nucléo-cytoplasmique déjà connus pour interagir avec la nucléoporine NUP98 (Cf. **figure 1.7**).

#### **1.1.3.2.1 Les facteurs de transcription de la famille des TALE**

Les facteurs de transcription TALE («three amino acids loop extension») appartiennent à une classe de facteurs possédant un homéodomaine atypique de 63 aa au lieu des 60 aa habituels et sont largement conservés parmi les métazoaires (Burglin, 1997; Burglin and Affolter, 2016). On en compte seulement 8 chez la drosophile contre 20 chez l'homme. Les facteurs TALE sont les cofacteurs des gènes HOX les mieux caractérisés jusqu'à maintenant. En effet, l'homéodomaine des gènes *HOX* n'est pas suffisant pour lier l'ADN de façon spécifique, alors que l'interaction avec les cofacteurs TALE permet d'augmenter grandement l'affinité et la spécificité de liaison à l'ADN. Chez la drosophile, deux facteurs TALE sont reconnus comme étant des cofacteurs des gènes *HOX*, soit Extradenticle (Exd) et Homothorax (Hth) et chez la souris, il existe 4 protéines homologues de Exd (Pbx1 à 4) et 5 de Hth (Meis1 à 3, Prep1 et Prep2) (Mann and Chan, 1996; Mann et al., 2009). Comme il a été mentionné plus tôt, les facteurs PBX et MEIS1 s'associent au gène *HOXA9* pour former un complexe trimérique permettant d'accroître la spécificité de liaison à l'ADN. De plus, il semblerait qu'ils soient également indispensables à l'activité oncogénique de NA9.

##### **1.1.3.2.1.1 Le facteur de transcription PBX**

Chez la drosophile, les membres du complexe HOM-C, ANTP et UBX partagent la même séquence consensus de liaison à l'ADN bien que leurs rôles soient complètement distincts au cours du développement. Par exemple, *Ubx* est requis pour favoriser le

développement des haltères ou balanciers plutôt que des ailes alors qu'*Antp* est indispensable pour la formation correcte des pattes. Ceci s'explique en partie par l'existence de cofacteurs qui confèrent la spécificité de liaison à l'ADN aux protéines HOX, comme c'est le cas de la protéine EXD (Mann and Chan, 1996; Peifer and Wieschaus, 1990). En parallèle, l'homologue de *Exd* chez l'homme, *PBX1* (« Pre-B-cell leukemia homéobox 1 ») a été identifié dans des leucémies aiguës des lymphocytes B sous la forme d'une fusion avec la protéine E2A (Kamps et al., 1990). PBX forme alors des hétérodimères avec les protéines HOX afin de lier spécifiquement leurs gènes cibles comme c'est aussi le cas chez la drosophile entre EXD et les membres du complexe HOM-C (Rauskolb and Wieschaus, 1994). La formation de ces hétérodimères dépend à la fois du domaine homéotique de PBX et d'une région conservée des protéines HOX appelée le domaine PIM (« PBX-interacting motif ») située proche de l'homéodomaine (Chang et al., 1996; Mann and Chan, 1996).

En effet, Kasper *et al.* ont montré que la protéine de fusion NA9 a la capacité de transformer des fibroblastes NIH 3T3 et que cette transformation est dépendante de son interaction avec PBX et de sa liaison à l'ADN (Kasper et al., 1999). L'introduction de mutations dans le domaine homéotique de NA9 abolit sa capacité de lier l'ADN alors que la mutation du résidu conservé tryptophane en alanine dans le domaine PIM n'affecte aucunement la liaison à l'ADN mais par contre diminue drastiquement le phénomène de coopérativité observé en présence de PBX. Par contre, dans les deux cas, la capacité de transformation des fibroblastes par la fusion NA9 mutante est complètement abolie.

#### **1.1.3.2.1.2 Le facteur de transcription MEIS1**

Le gène *Meis1* a été identifié pour la première fois comme un site commun d'intégration virale dans le modèle de souris BXH-2, un modèle d'insertion rétrovirale où les souris développent des leucémies myéloïdes (Moskow et al., 1995). Chez la drosophile, le gène *hth* a été identifié comme étant requis pour le développement de l'embryon et la fonction normale des gènes *Hox* (Rieckhof et al., 1997). Au cours du développement, *Meis1/hth* est requis pour la mise en place de l'axe proximo-distal dans les membres (Mercader et al., 1999). De plus, la déplétion de *Meis1* est létale au stade embryonnaire due à un défaut de l'hématopoïèse (Azcoitia et al., 2005). En effet, *Meis1* joue un rôle essentiel dans le

développement et le maintien des CSH mais aussi dans la formation des mégacaryocytes et des érythrocytes (Miller et al., 2016).

Cependant, *Meis1* seul n'a aucune capacité de transformation mais il acquiert cette capacité lorsqu'il est fusionné avec le domaine de transactivation de VP16, suggérant que son activité oncogénique relève de l'activation transcriptionnelle de gènes cibles (Wang et al., 2006). Malgré la forte homologie de MEIS1 avec PBX, son interaction avec les protéines HOX ne se fait pas au travers du domaine PIM mais plutôt du domaine MIM (« Meis1-Interacting Motif ») situé dans la partie N-terminale de PBX et de certaines protéines HOX dont HOXA9 (Chang et al., 1997; Shen et al., 1997). Effectivement, différents types de complexes de liaison à l'ADN tels que des hétérodimères MEIS1-HOXA9 ainsi que des hétérotrimères MEIS1-HOXA9-PBX2 ont été observés dans des cellules myéloïdes (Shen et al., 1997; Shen et al., 1999). De plus, différentes études ont montré que non seulement MEIS interagit avec PBX mais il est aussi responsable de sa localisation nucléaire (Berthelsen et al., 1999; Pai et al., 1998; Rieckhof et al., 1997).

Depuis sa découverte, *Meis1* a suscité beaucoup d'intérêts en vertu de son association étroite avec les gènes *HOX* dans le développement des LMA (Kroon et al., 1998; Lawrence et al., 1999; Thorsteinsdottir et al., 2001). Effectivement, la surexpression de MEIS1 synergise avec la fusion NA9 pour accélérer le développement de la LMA dans un modèle de souris. Les souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse qui coexpriment MEIS1 et NA9 développent une LMA dans les 142 jours post-transplantation contrairement aux 230 jours de latence observés lorsque NA9 est exprimé seul (Kroon et al., 2001). Avec le modèle de souris BXH-2, Iwasaki *et al.* ont montré que *Meis1* était un gène contribuant à l'activité leucémogénique de NA9 (Iwasaki et al., 2005).

Par ailleurs, il semblerait que l'activité de transactivation de MEIS1 soit en cause dans le phénomène de collaboration observé dans les leucémies. En effet, MEIS1 a pour cible un ensemble de gènes associés à la leucémogénèse *Cd34*, *Flt3*, *Erg1*, *c-Myb* et *Trib2* (Argiropoulos et al., 2008; Hess et al., 2006; Wang, 2005).

### 1.1.3.2.2 L'acétyltransférase CBP/p300

CBP et p300 sont les seuls membres de la famille CBP/p300 ou KAT3 (Allis et al., 2007). Initialement, CBP (« CREB-Binding Protein ») et p300 ont été identifiés comme des partenaires d'interaction du facteur de transcription CREB (« cAMP Responsive Element Binding ») et de la protéine adénovirale E1A, respectivement (Chrivia et al., 1993; Eckner et al., 1994). Les protéines CBP et p300 présentent une forte homologie (>70%) et partagent les mêmes domaines fonctionnels (i) un bromodomaine, (ii) trois domaines riches en cystéines-histidines (CH1 à 3), (iii) un domaine de type KAT (« Lysine AcetylTransférase »), (iv) deux domaines de transactivation et (v) de multiples domaines d'interaction spécifiques (Chan and La Thangue, 2001). Ce sont des coactivateurs transcriptionnels d'une variété de facteurs de transcription.

CBP et p300 jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'hématopoïèse au cours du développement et chez l'adulte (Chan et al., 2011; Rebel et al., 2002). Au cours des dernières années, *CBP* et *p300* ont été identifiés comme des gènes suppresseurs de tumeurs associés aux hémopathies (Giotopoulos et al., 2016; Kung et al., 2000). Dans les LMA, *CBP* et *p300* sont impliqués à la fois de façon directe dans des réarrangements chromosomiques avec les gènes *MLL* (« Mixed Lineage Leukemia ») et *MYST3* et comme facteurs d'interaction avec différents oncogènes de fusion tels que NA9 (Giotopoulos et al., 2016; Kasper et al., 1999).

En effet, Kasper *et al.* ont montré grâce à la fois à un essai de transactivation et de GST pull-down que le coactivateur transcriptionnel CBP s'associe à la portion NUP98 au niveau des premiers motifs FG/GLFG afin d'activer la transcription. Au contraire, la portion HOXA9 qui ne présente aucune activité de transactivation, ne s'associe pas avec le facteur CBP. De plus, l'interaction entre NA9 et CBP a été confirmée, *in vitro*, par des expériences de co-immunoprécipitation dans les cellules NIH 3T3. Ainsi, cette étude démontre que le potentiel de transformation des cellules NIH 3T3 médié par NA9 repose sur l'activité transcriptionnelle de NUP98 induite par la liaison du facteur CBP (Kasper et al., 1999). Il semble que le recrutement de CBP/p300 au niveau des motifs FG/GLFG de NA9 soit nécessaire à son activité leucémogénique. En effet, Rio-Machin *et al.* ont réalisé une expérience de qChIP dans des cellules HEK293FT préalablement transfectées avec quatre régions régulatrices de gènes dont l'expression est positivement modulée par NA9. Les résultats montrent que le facteur

CBP/p300 s'associe spécifiquement au niveau des régions régulatrices de ces gènes (Rio-Machin et al., 2017).

### 1.1.3.2.3 L'histone déacétylase HDAC1

Les histones déacétylases font partie d'une famille d'enzymes qui catalysent la perte des groupements acétyl sur la queue N-terminale des histones, généralement associée à la répression de la transcription. Chez les mammifères, il existe dix-huit HDAC regroupées en quatre classes différentes, soit les classes I, II, III et IV. HDAC1 est un membre de la classe I, impliquée dans la croissance et la différenciation des cellules (Seto and Yoshida, 2014). Parmi les nombreux rôles que possèdent HDAC1, il semblerait qu'elle soit impliquée dans l'hématopoïèse. En effet, la diminution de l'expression de HDAC1 par des petits ARN interférants perturbe le programme de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques. De plus, les souris transplantées avec des CSH surexprimant HDAC1 présente un défaut au niveau de la différenciation myéloïde, observé par une diminution du nombre de leucocytes dans le sang périphérique alors que la différenciation érythro-mégacaryotaire n'est pas affectée (Wada et al., 2009). Il semblerait que l'expression des HDAC soit requise pour la formation des érythrocytes et mégacaryocytes (Wilting et al., 2010). En outre, HDAC1 joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie des CSH (Heideman et al., 2014).

Les HDAC de classe I sont impliquées dans la tumorigénèse, en effet ces enzymes sont fréquemment surexprimées dans de nombreux types de tumeurs et interagissent avec des protéines de fusion oncogéniques telles que les fusions impliquant NUP98. Bai *et al.* ont montré, *in vitro*, avec un essai de pull-down, que l'enzyme HDAC1 interagit avec NA9 au niveau des motifs FG/GLFG et plus fortement avec le premier stretch de répétitions FG. Ils ont confirmés ces résultats, *in cellulo*, avec un essai de co-immunoprécipitation dans des cellules 293T. Ainsi, la fusion NA9 présente à la fois une activité de co-activateur et de co-répresseur transcriptionnel en recrutant respectivement les facteurs CBP/p300 et HDAC1, par l'intermédiaire de ces motifs FG/GLFG (Bai et al., 2006). Récemment, Rio-Machin *et al.* ont montré qu'en effet, l'enzyme HDAC1 est significativement enrichie au niveau de la région promotrice de gènes qui sont réprimés par NA9 (Rio-Machin et al., 2016; Rio-Machin et al., 2017).



Des inhibiteurs ciblant les HDAC de classe I ont fait leur preuve sur la réduction de la prolifération des cellules tumorales. En outre, l'inhibiteur de HDAC1, LBH589 (Panobinostat) inhibe complètement la capacité des cellules h-HP NA9 (des progéniteurs hématopoïétiques humains isolés de sang de cordon et exprimant NA9 par transduction rétrovirale), de former des colonies en méthylcellulose (test de croissance CFC) et induit l'apoptose dans les vingt-quatre heures, avec une dose aussi faible que 4 nM (Rio-Machin et al., 2017). Depuis quelques années, les inhibiteurs des HDAC ont fait leur entrée en phase clinique dans le traitement des hémopathies malignes. Il semblerait que les inhibiteurs non sélectifs présentent des effets de toxicité, ce qui a conduit au développement d'inhibiteurs sélectifs (Min et al., 2017).

#### 1.1.3.2.4 La méthyltransférase MLL1

La protéine MLL1 (« Mixed Lineage Leukemia 1 ») et son homologue Trithorax (Trx) chez la drosophile font partie du groupe trithorax ou *trx-G*. Elle possède un domaine de type SET qui lui confère une activité de méthyltransférase, c'est-à-dire qu'elle catalyse l'ajout de groupements méthyles au niveau de la lysine 4 de l'histone H3, une marque de chromatine activée, et active l'expression des gènes *HOX* (Milne et al., 2002). *MLL1* est indispensable pour le développement et le maintien des CSH (McMahon et al., 2007). En effet, de nombreuses translocations impliquant *MLL1* et une variété de partenaires sont observées dans les LMA, résultant en protéine de fusion MLL, qui vont activer de façon constitutive les gènes *HOX*.

Récemment, deux études indépendantes ont montré que la protéine MLL1 est requise pour l'activité leucémogénique de NA9 (Shima et al., 2017; Xu et al., 2016b). En particulier, les deux équipes montrent que la fusion NA9 interagit avec MLL1, par l'intermédiaire des motifs FG/GLFG principalement le deuxième *stretch*, dans un cas par un essai de pull-down streptavidine-biotine (Xu et al., 2016b) et dans l'autre par une analyse de spectrométrie de masse (Shima et al., 2017) pour identifier les interacteurs de NA9. D'ailleurs, Shima *et al.* démontrent que le deuxième *stretch* de motifs FG/GLFG est requis pour l'induction de l'expression des gènes du complexe *Hoxa*. Par deux approches *in vitro* différentes, les deux études montrent que MLL1 est requise pour l'immortalisation induite par NA9. De plus, Xu *et al.* montrent que c'est aussi le cas *in vivo*. Avec la technique d'immunoprécipitation de la

chromatine associée au séquençage à haut débit (ChIP-seq), les deux études mettent en avant la colocalisation des protéines MLL1 et NA9 au niveau du locus *Hoxa*. De plus, il semblerait que MLL1 et NA9 soient enrichies au niveau des régions promotrices des gènes du complexe *Hoxb*, des locus *Meis1* et *Pbx3* (Xu et al., 2016b). Il semblerait que la fusion NA9 interagisse avec MLL1 ce qui est indispensable au recrutement de NA9 au niveau du locus des gènes *HOX* et donc de l'activation de leur expression par NA9. Ainsi, MLL1 est indispensable à l'activité leucémogénique de NA9.

De façon intéressante, il a aussi été montré chez la drosophile que NUP98 interagisse avec Trx afin de réguler l'expression des gènes *HOX* (Pascual-Garcia et al., 2014). Cependant, il semblerait que dans les cellules de mammifères NUP98 seul n'interagisse pas avec MLL1 (Shima et al., 2017).

#### **1.1.3.2.5 Les facteurs d'export nucléaire**

NUP98 étant un membre du complexe du pore nucléaire, il est bien connu pour interagir avec des facteurs impliqués dans le transport nucléo-cytoplasmique d'ARN et de protéines. D'ailleurs, certains d'entre eux sont aussi reconnus pour interagir avec la protéine de fusion NA9.

##### **1.1.3.2.5.1 Le facteur RAE1**

Rae1/Gle2 (RNA export factor 1) est un membre dynamique de la famille des nucléoporines à motifs répétés WD40. Il contribue au transport nucléo-cytoplasmique actif d'ARNm grâce à son interaction avec le domaine GLEBS (domaine situé entre les deux *stretches* de motifs répétés FG/GLFG, (Cf. **figure 1.7**) de NUP98 au niveau du pore nucléaire (Matsuoka et al., 1999; Murphy et al., 1996; Pritchard et al., 1999). Il semblerait que RAE1 s'associe de la même façon avec NA9 et que la localisation de RAE1 ne soit aucunement affectée par la fusion (Funasaka et al., 2011; Xu and Powers, 2010). Par contre, Funasaka *et al.* montrent que les niveaux d'expression de RAE1 sont significativement réduits en présence de NA9 dans différents types de cellules (HeLa, MCF7 et K562). Et de façon très intéressante, il semblerait que les niveaux d'expression de RAE1 et NUP98 soient aussi réduits dans la rate

de souris transgéniques NA9 ainsi que dans la moelle osseuse de patients atteints de LMA (Funasaka et al., 2011).

De plus, RAE1 joue un rôle crucial dans l'assemblage et le maintien de l'intégrité du fuseau mitotique bipolaire puisque sa déplétion induit une instabilité chromosomique et la formation de fuseaux multipolaires, responsables de l'aneuploïdie (Babu et al., 2003; Blower et al., 2005; Wong, 2010; Wong et al., 2006). D'ailleurs, Jenagathan *et al.* ont montré que RAE1 et NUP98 modulent la fonction du complexe de promotion de l'anaphase APC/C afin de prévenir la dégradation précoce de la securine et de préserver ainsi l'euploïdie (Jenagathan et al., 2005). En outre, Salsi *et al.* ont montré que les protéines de fusion oncogéniques impliquant NUP98: NUP98-HOXD13, NUP98-LOC348801 et NUP98-HHEX inhibent le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (« spindle assembling checkpoint, SAC ») provoquant ainsi de l'aneuploïdie en raison d'un défaut de ségrégation des chromosomes dans des cellules arrêtées en mitose. Comme NUP98, les fusions oncogéniques lient (APC/C)<sup>Cdc20</sup> par l'intermédiaire du domaine GLEBS de NUP98 prévenant ainsi la régulation de (APC/C)<sup>Cdc20</sup> par le complexe du point de contrôle mitotique (« mitotic checkpoint complex, MCC »), qui est activé lorsque le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique n'est pas satisfait (Salsi et al., 2016; Salsi et al., 2014).

Il semblerait que le facteur RAE1 contribue à l'activité leucémogénique de NA9 en affectant à la fois le transport des ARNm et le cycle cellulaire.

#### **1.1.3.2.5.2 Le facteur TAP**

TAP est un facteur impliqué dans l'export nucléaire d'ARNm situé dans le nucléoplasme et à la fois sur les faces interne (côté nucléoplasme) et externe (côté cytoplasme) du pore nucléaire. Il interagit avec de nombreux composants du pore dont différentes nucléoporines incluant NUP98 (Bachi et al., 2000). Ainsi, TAP, NUP98 et RAE1/GLE2 sont trois facteurs impliqués dans l'export nucléaire d'ARNm. Ces trois protéines forment un complexe où TAP, comme RAE1, lie NUP98 au niveau des motifs répétés FG/GLFG mais sur un site adjacent. De plus, RAE1 et TAP interagissent aussi entre elles et il semblerait que NUP98 et TAP soient en compétition pour lier RAE1 mais une fois lié à NUP98, RAE1 n'interagit plus directement avec TAP (Blevins et al., 2003).

Dogan *et al.* ont montré, en utilisant le transport nucléaire rétroviral comme modèle, que la navigation nucléo-cytoplasmique au niveau du récepteur nucléaire TAP était abolie dans des cellules exprimant NA9. TAP est impliqué dans l'export nucléaire de l'ARNm des rétrovirus de type-D qui comporte l'élément CTE (constitutive transport element) (Bachi et al., 2000). En utilisant comme modèle l'export nucléaire TAP-dépendant d'ARNm comportant l'élément CTE, Dogan *et al.* ont observé que TAP colocalise avec NA9 au niveau d'agrégats dans le noyau, ce qui altère la sortie du noyau des ARNm-CTE induite par TAP (Dogan et al., 2011). Ces résultats suggèrent que la perturbation de l'export du noyau par TAP de ses substrats pourrait être en partie responsable de l'activité oncogénique de NA9.

#### 1.1.3.2.5.3 Le facteur Exportin1 (XPO1)

Exportin 1 (XPO1), aussi connu sous le nom de CRM1 (« chromosomal maintenance 1 »), est un des transporteurs impliqués dans l'export nucléaire de protéines et d'ARN, les mieux caractérisés (Fornerod et al., 1997a; Nguyen et al., 2012). La voie principale pour l'export des protéines du noyau est celle qui est contrôlée par le facteur CRM1. Il reconnaît de courtes séquences enrichies en leucine connues sous le nom de signal d'export nucléaire ou SEN (« nuclear export signal, NES ») (Fischer et al., 1995; Fornerod et al., 1997b; Fukuda et al., 1997). CRM1 lie, de façon coopérative, les substrats à exporter appelé cargo, au niveau de leur séquence SEN, et Ran-GTP afin de former le complexe d'export du noyau. Les récepteurs d'export nucléaire tels que CRM1 ne reconnaissent leur cargo qu'en présence de Ran lié au GTP du côté du noyau alors que la dissociation du complexe et par conséquent la libération du cargo dans le cytoplasme nécessite l'hydrolyse de Ran-GTP en Ran-GDP (Nguyen et al., 2012).

CRM1 interagit entre autres avec différentes nucléoporines contenant des motifs répétés FG dont NUP214 et NUP98 (Neville et al., 1997; Zolotukhin and Felber, 1999). En effet, Oka *et al.* ont montré par GST-pull down dans des cellules HeLa et 293F que NUP98 interagit directement, par l'intermédiaire de ses motifs répétés FG/GLFG, avec CRM1 de façon Ran-GTP-dépendante et agit comme un cofacteur dans l'export nucléaire médié par CRM1 (Oka et al., 2010).

L'expression de la protéine de fusion NA9 dans des cellules myéloïdes humaines K562 induit la rétention significative des facteurs de transcription NMPc et HIV-1 Rev normalement exportés en dehors du noyau par CRM1 (Takeda et al., 2010). De plus, en inhibant l'export nucléaire médié par CRM1, NA9 cause l'accumulation dans le noyau de facteurs de transcription dont le transport est normalement régulé par CRM1, favorisant ainsi l'activité transcriptionnelle de ces facteurs (Takeda et al., 2010). Dogan *et al.* ont montré en parallèle, en étudiant le transport rétroviral de HIV-1 Rev par CRM1, que le transport nucléocytoplasmique du facteur CRM1 était aboli dans des cellules surexprimant NA9. En effet, il semblerait que NA9 induise la séquestration de CRM1 dans des agrégats nucléaires, ce qui conduit à un défaut dans l'export de Rev et de ses ARNm en dehors du noyau (Dogan et al., 2011). Ainsi, l'inhibition du transport nucléocytoplasmique de CRM1 semble en partie être à l'origine de l'activité transcriptionnelle aberrante de NA9.

Les travaux d'Oka *et al.* démontrent que l'expression de NA9 dans des cellules souches embryonnaires de souris induit sélectivement l'expression des gènes *Hox*. L'analyse des sites de liaison à la chromatine de NA9 et CRM1 à l'échelle du génome révèle que NA9 est préférentiellement ciblé et accumulé dans la région chromosomique des gènes *Hox* où le facteur d'export CRM1 est initialement lié. De plus, le traitement à la leptomycine B, un inhibiteur de CRM1, entraîne le désassemblage des agrégats nucléaires NA9, ce qui résulte en la perte de la liaison de NA9 à la chromatine ainsi que l'activation des gènes *Hox* par NA9. Cette étude suggère que le ciblage sélectif de NA9 au niveau des régions chromosomiques des gènes *Hox* via la liaison préalable de CRM1, induit la formation de structures d'ordre supérieur de la chromatine à l'origine de l'expression aberrante des gènes *Hox* (Oka et al., 2016).

### **1.1.3.3 Les modèles d'étude *in vivo* de la fusion NUP98-HOXA9**

La protéine de fusion NA9 est l'archétype des protéines de fusion oncogéniques issues de réarrangements impliquant le gène *NUP98*. De nombreux modèles ont été développés afin d'étudier l'activité leucémogénique de NA9.

### 1.1.3.3.1 Chez la souris

L'équipe du Dr Sauvageau a développé un modèle transgénique chez la souris afin de voir si l'expression de la protéine de fusion NUP98-HOXA9 dans les cellules de la moelle osseuse pouvait induire le développement de leucémie chez la souris. Pour ce faire, des souris receveuses B6C3 ont subi une greffe de moelle osseuse provenant de souris donneuses Pep3C exprimant NA9 par rétrotransduction virale. Le sang périphérique, la moelle osseuse ainsi que la rate de souris sacrifiées ont été analysés révélant une augmentation du nombre de monocytes et neutrophiles, un élargissement de la rate contenant un nombre accru de cellules myéloïdes (granulocytes et macrophages) et une augmentation de la taille des plaquettes. Finalement, les résultats de cette étude montrent que les souris exprimant NA9 développent un syndrome myéloprolifératif et succombent éventuellement d'une LMA après une latence de plusieurs mois, latence qui est significativement réduite par la co-expression de MEIS1 (Kroon et al., 2001).

Quelques années plus tard, l'équipe du Dr Nakamura a développé un modèle quelque peu différent où l'expression de NA9 est spécifiquement ciblée au lignage myéloïde sous le contrôle du promoteur de la cathepsine G. Dans ce cas, 20% des souris développent une LMA après une longue latence de plusieurs mois (environ 15 mois). Il semblerait que l'expression de NA9 favorise de façon significative la prolifération des progéniteurs myéloïdes. De plus, avec l'objectif d'identifier des gènes coopératifs pour l'activité leucémogénique de NA9, le transgène NA9 a été transféré dans un fond génétique BXH-2. La totalité des souris BXH-2 développe une LMA en moins d'une année et l'expression de NA9 accélère la progression de la LMA (Moskow et al., 1995). Iwasaki *et al.* ont identifié 6 sites communs d'intégration rétrovirale et 5 d'entre eux ont été validés par leur capacité coopérative à transformer des cellules NIH 3T3. Ils s'avèrent que les gènes *Meis1*, *Fcgr2b*, *Fcrl*, *Dnalc4* et *Con1* coopèrent avec NA9 afin de promouvoir son activité leucémogénique (Iwasaki et al., 2005).

### 1.1.3.3.2 Chez le poisson-zèbre ou *zebrafish*

L'équipe du Dr Berman a généré un modèle transgénique inductible chez le poisson-zèbre exprimant la fusion humaine *NA9* sous le contrôle du promoteur myéloïde du poisson-zèbre *spi1*, l'homologue de *pu.1*. Environ 25% de ces poissons transgéniques adultes développent l'équivalent d'un néoplasme myéloprolifératif après une longue latence d'une vingtaine de mois, mais aucun ne progresse complètement vers une LMA. De plus, NA9 affecte l'hématopoïèse au stade embryonnaire puisque les embryons présentent un nombre accru de cellules myéloïdes immatures au détriment des érythrocytes (Forrester et al., 2011). Par analyse de biopuces, ils ont observé que la méthyltransférase *Dnmt1* est fortement exprimée dans les embryons de poissons-zèbres exprimant NA9. L'injection des embryons NA9 avec un morpholino qui bloque le gène *Dnmt1* ou le traitement des embryons avec la decitabine, un agent déméthylant qui cible spécifiquement l'enzyme DNMT1, restaurent une hématopoïèse normale. Il semblerait que la thérapie épigénétique inhibe le développement de syndrome myéloprolifératif induit par NA9 chez le poisson-zèbre (Deveau et al., 2012). À partir du modèle qu'ils ont développé chez le poisson-zèbre, Deveau *et al.* montrent que l'expression de NA9 accroît la prolifération des CSH et que l'activité oncogénique de NA9 dépend à la fois de *meis1*, de la voie PTGS/COX («prostaglandin synthase/cyclooxygenase») ainsi que de l'hyperméthylation de l'ADN par *dnmt1*. En effet, l'hématopoïèse normale est restaurée dans les embryons NA9, suite au blocage par un morpholino des gènes *meis1* ou *dnmt1*, ou un traitement avec des inhibiteurs de DNMT1 ou encore des COX. Pour finir, ils ont observé une synergie dans la restauration de l'hématopoïèse normale dans des poissons-zèbres exprimant NA9 lorsque ces derniers sont traités avec une combinaison de différentes thérapies épigénétiques telles qu'un inhibiteur des HDAC combiné avec soit un inhibiteur des DNMT soit un inhibiteur des COX (Deveau et al., 2015).

Cette dernière étude souligne le rôle majeur que jouent les facteurs épigénétiques dans l'activité oncogénique de NA9.

## 1.2 La drosophile, *Drosophila melanogaster*, un organisme modèle puissant

Cette deuxième section de l'introduction sera complètement axée sur la *Drosophila* comme organisme modèle. La première partie traitera de l'hématopoïèse chez la mouche et la deuxième abordera l'œil composé et son utilisation à des fins de criblage génétique.

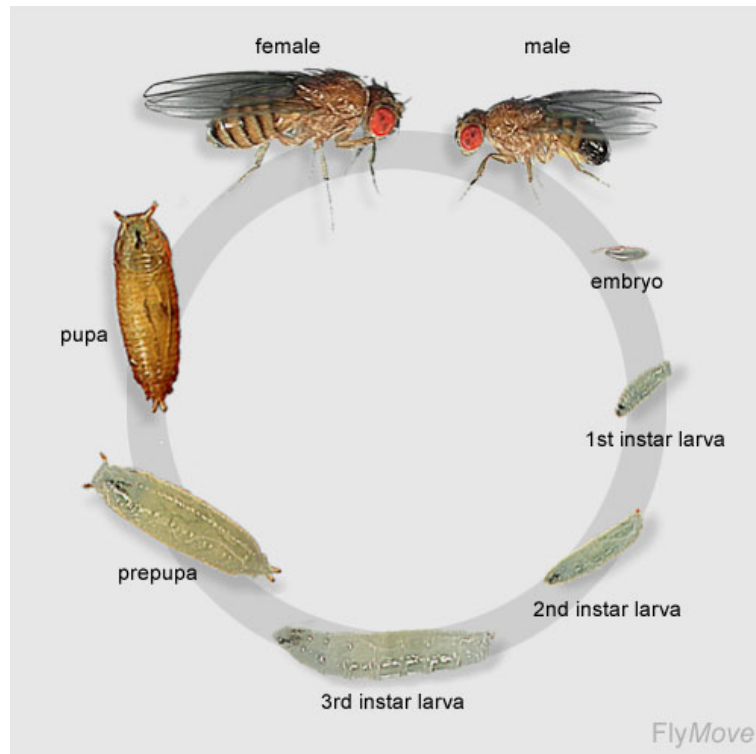
### 1.2.1 Les avantages de la *Drosophila*

Ce fût en 1908-1909 que le célèbre embryologiste et généticien américain Thomas Hunt Morgan introduisit pour la première fois la *Drosophila* dans son laboratoire à l'Université de Columbia afin d'étudier le caractère héréditaire. En 1910, il fit l'étonnante observation d'un mâle aux yeux blancs alors que les drosophiles sauvages ont les yeux rouges. A partir de cette mutation, Morgan effectuera de nombreux croisements afin de dégager les modes de transmission de ce caractère. Il nommera ainsi le premier gène responsable de la couleur de l'œil *white*. S'en suivirent de nombreuses découvertes dont sa fameuse découverte sur le rôle des chromosomes dans la transmission de l'information génétique, qui lui valut le prix Nobel de médecine en 1933. La drosophile communément appelée mouche à fruits est alors rapidement devenue un organisme modèle de choix pour la recherche en génétique et en biologie du développement.

La drosophile est un insecte holométabole diptère, c'est-à-dire qu'au cours de son développement elle subit une métamorphose complète. Le cycle de vie de la drosophile se divise en quatre phases bien définies : le stade embryonnaire (embryon), les stades larvaires (larve), le stade pupal (pupe) et enfin le stade adulte (imago). La drosophile est un organisme modèle de petite taille (2 à 4 mm) relativement facile et peu coûteux à élever avec un cycle de développement de l'embryon à l'adulte extrêmement rapide d'environ 10 jours à 25°C (**Cf. figure 1.8**). De plus, elle possède un petit génome d'environ 14 700 gènes répartis sur 4 chromosomes, qui a été entièrement séquencé en 1998 et complètement annoté depuis les années 2000 (Adams et al., 2000). En plus des nombreux avantages cités ici, la drosophile est à l'origine de nombreuses découvertes. Après un siècle d'étude, une diversité d'outils génétiques a vu le jour. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré une conservation importante des voies de signalisation et gènes avec l'humain. En effet, 75% des gènes



impliqués dans des maladies chez l'humain présenteraient un homologue chez la drosophile (Reiter et al., 2001). Au cours de la dernière décennie, la drosophile est ainsi devenue un modèle de choix dans la modélisation de maladies humaines telles que le cancer, la neurodégénérescence, le diabète et les maladies cardio-vasculaires pour n'en citer que quelques-unes (Marcogliese and Wangler, 2018; Pandey and Nichols, 2011; Wangler et al., 2015).



(<http://flymove.uni-muenster.de>)

**Figure 1.8. Le cycle de vie de la *Drosophila melanogaster***

Les quatre phases du cycle de développement de la drosophile sont : le stade embryonnaire (embryon), les trois stades larvaires L1 à L3 (larve), le stade prépupal suivi du stade pupal (pupe) et enfin le stade adulte (imago). La femelle est représentée à gauche et le mâle à droite identifiable grâce à l'extrémité noire de son abdomen. Le cycle de reproduction est de 10 jours à 25°C.

### 1.2.2 L'hématopoïèse chez la drosophile

Bien que l'hématopoïèse chez les invertébrés soit moins complexe et diffère à certains égards de celle des vertébrés, ils existent de nombreux parallèles. Comme tous les invertébrés, la drosophile possède un système immunitaire qui ne lui confère qu'une réponse immunitaire

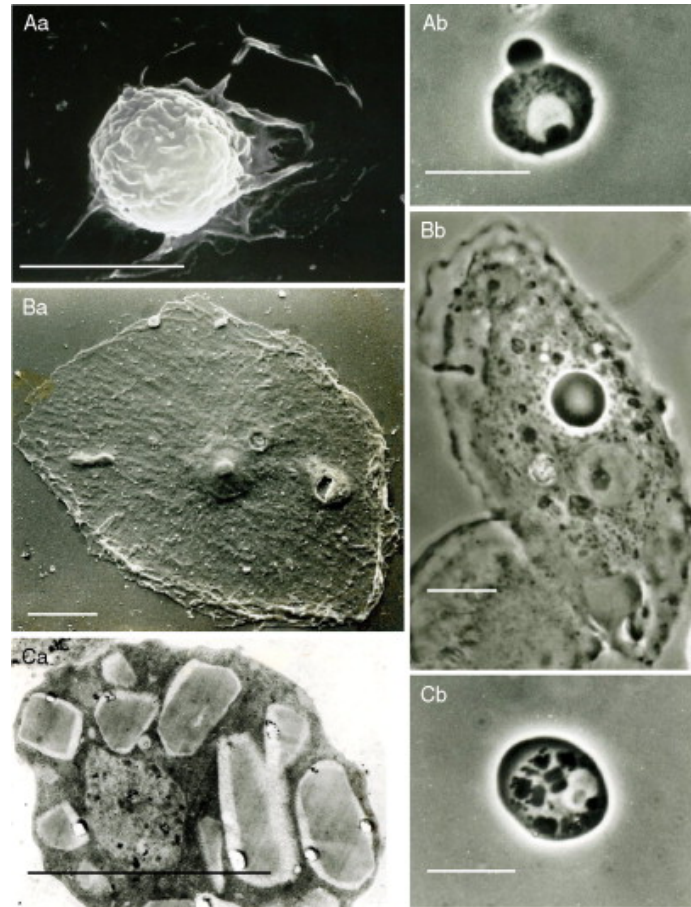
innée. Puisque les insectes ne possèdent pas de lymphocytes, ils sont dépourvus de système immunitaire adaptatif. Cependant, la drosophile possède différents types de cellules sanguines ou hémocytes qui présentent des caractéristiques très similaires aux cellules de la lignée myéloïde chez les vertébrés (Letourneau et al., 2016). Ces hémocytes dérivent de progéniteurs hématopoïétiques multipotents appelés prohémocytes. Comme l'hématopoïèse chez les vertébrés, les prohémocytes sont produits au cours de deux phases distinctes du développement. La première vague de production a lieu au stade embryonnaire alors que la deuxième survient un peu plus tard au stade larvaire dans un organe spécialisé, la glande lymphatique (Holz et al., 2003; Letourneau et al., 2016). Récemment, des sites actifs d'hématopoïèse ont été identifiés chez l'adulte (Ghosh et al., 2015). Contrairement aux nombreux types de cellules différenciées chez les vertébrés, il n'en existe que trois sortes chez la drosophile parmi lesquelles seulement deux sont produites constitutivement : les plasmacytes et les cellules à cristaux, et la troisième, les lamellocytes ne sont produits qu'en réponse à un challenge immunitaire. La drosophile possède un système circulatoire ouvert où les hémocytes circulent librement. Aux stades larvaire et adulte, le cœur de la drosophile plus connu sous le nom de « vaisseau dorsal » pompe l'hémolymph de la partie postérieure du corps vers la zone antérieure assurant ainsi le flux circulatoire. L'hémolymph correspond au fluide interstitiel et joue le rôle du sang chez les insectes bien qu'il soit dépourvu de globules rouges transportant l'oxygène. Il assure entre autres l'apport des organes en nutriments, métabolites et hormones. et contribue à la défense immunitaire. Chez les insectes, le transport de l'oxygène se fait par un système de trachée (Rotstein and Paululat, 2016).

### **1.2.2.1 Les cellules sanguines chez la mouche : description et fonctions**

Contrairement à la complexité des lignages cellulaires chez les mammifères, l'hématopoïèse chez la drosophile est plutôt simple avec seulement trois types d'hémocytes matures (Lanot et al., 2001; Rizki and Rizki, 1984).

Chez les insectes, les hémocytes présents dans l'hémolymph jouent plusieurs rôles fondamentaux. Ils sont principalement reconnus pour leur participation à la défense immunitaire de l'organisme. Cependant, ils jouent aussi un rôle majeur au cours du

développement embryonnaire à travers l'élimination des corps apoptotiques et le dépôt de matrice extracellulaire (Honti et al., 2010).



D'après Eslin *et al.*, 2009

### Figure 1.9. Les différentes populations d'hémocytes

Hémocytes circulants dans des larves de stade L3 de *D. melanogaster* observés par microscopie électronique à balayage (Aa et Ba) ou à transmission (Ca) et par microscopie à contraste de phase (Ac, Bb et Cb). (A) Plasmatocyte, (B) Lamellocyte, (C) Cellule à cristaux; Barre: 10  $\mu\text{m}$ . Avec l'accord de l'éditeur Elsevier, numéro de licence : 4345940491312.

#### 1.2.2.1.1 Les plasmatocytes

Les plasmatocytes sont des cellules sphériques d'environ 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, qui constituent la majeure partie des hémocytes (~95%) à chaque stade développemental (Cf. **figure 1.9**). Ces hémocytes, apparentés aux macrophages chez les vertébrés, sont impliqués dans la phagocytose de corps étrangers et débris apoptotiques (Gold and Bruckner, 2015). En

effet, ils possèdent de nombreux lysosomes, phagosomes (vacuoles de phagocytose) et corps de résorption suggérant une activité phagocytaire importante. D'autre part, ils sécrètent aussi des protéines de la matrice extracellulaire au cours du développement ainsi que des peptides microbiens.

Les plasmatoctes peuvent être identifiés avec les marqueurs suivants: *Peroxidasin* (Nelson et al., 1994), *Croquemort* (Franc et al., 1996), *NimCI* ou *PI* (Asha et al., 2003) et *Eater* (Kocks et al., 2005).

#### 1.2.2.1.2 Les cellules à cristaux

Les cellules à cristaux représentent moins de 5% de la population d'hémocytes (**Cf. figure 1.9**). Bien que ces dernières aient une taille très similaire aux plasmatoctes, elles se distinguent très nettement par la présence d'inclusions paracrystallines de prophénoloxydase dans leur cytoplasme. Ces hémocytes apparentés à des mégacaryocytes, sont impliqués dans la mélanisation, un mécanisme de défense propre aux arthropodes qui résulte en un dépôt de mélanine (pigment noir) au cours du processus de cicatrisation (Letourneau et al., 2016).

Les cellules à cristaux peuvent être identifiées à l'aide des marqueurs suivants: *proPO-A1* (Rizki and Rizki, 1984), *Lozenge* (Lebestky et al., 2000) ou *Hindsight* (Terriente-Felix et al., 2013).

#### 1.2.2.1.3 Les lamellocytes

Les lamellocytes sont des cellules de grande taille (environ 40  $\mu\text{m}$ ) de forme aplatie (**Cf. figure 1.9**). Elles sont impliquées dans l'encapsulation de pathogènes ou corps étrangers trop gros pour être phagocytés par les plasmatoctes. Ces hémocytes sont rarement présents dans des individus sains. Cependant, dans certaines conditions une différenciation massive en lamellocytes peut être induite, par exemple: en cas de réponse immunitaire cellulaire au parasitisme par les œufs de guêpes *Leptopilina boulardi*. Lors du parasitisme, la guêpe pond ses œufs dans la larve de drosophile. Les lamellocytes vont alors venir former une capsule autour de l'œuf et avec l'aide des plasmatoctes et des cellules à cristaux neutraliser le développement de ce dernier suite au processus de mélanisation et production de radicaux

libres (« ROS, reactive oxygen species »). En absence de réponse immunitaire cellulaire, l'œuf de guêpe se développe au dépend de son hôte, entraînant sa mort (Carton and Nappi, 2001; Letourneau et al., 2016).

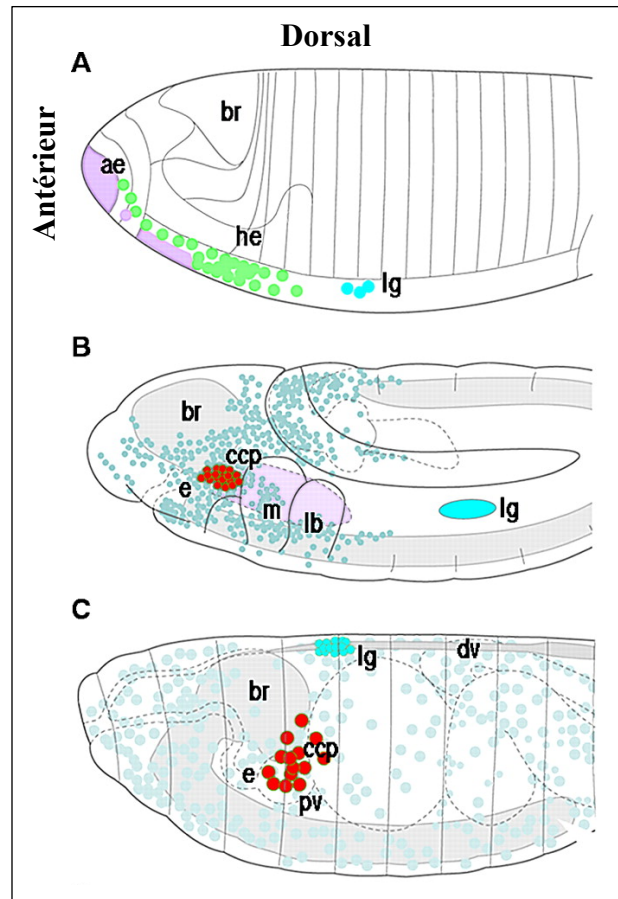
Le gène rapporteur *misshapen-lacZ* (Braun et al., 1997), les marqueurs *LI* (Asha et al., 2003) ou  *$\alpha$ -PS4* (Crozatier et al., 2004; Irving et al., 2005) permettent de visualiser les lamellocytes.

### 1.2.2.2 L'hématopoïèse embryonnaire

La première vague d'hématopoïèse ou vague primitive a lieu lors du développement embryonnaire de la drosophile. Les précurseurs des hémocytes embryonnaires ou prohémocytes sont spécifiés très tôt au cours de l'embryogénèse, dès le stade blastoderme cellulaire au niveau du mésoderme pro-encéphalique antérieur (Holz et al., 2003) (Cf. **figure 1.10**). Les prohémocytes, au nombre de 80 environ, s'invaginent lors de la gastrulation au niveau du sillon ventral. Ils vont alors commencer à migrer, et simultanément, se différencier en deux types de cellules sanguines : les plasmatocytes et les cellules à cristaux (Tepass et al., 1994). Environ deux heures après la gastrulation (stade 10), apparaît une première population d'hémocytes différenciés : les plasmatocytes qui expriment alors un marqueur précoce : la Peroxydase (Nelson et al., 1994; Tepass et al., 1994) (Cf. **figure 1.10B**). Ces plasmatocytes vont ensuite migrer et coloniser l'ensemble de l'embryon, un processus qui dépend de l'activité du récepteur de type PDGF/VEGF (Platelet Derived Growth Factor/ Vascular Endothelial Growth Factor), PVR (Bruckner et al., 2004; Duchek et al., 2001). Au cours de leur migration, ils vont acquérir des propriétés caractéristiques des macrophages. En fin d'embryogénèse, environ 700 plasmatocytes sont répartis dans l'ensemble de l'embryon (Tepass et al., 1994).

Simultanément à la différenciation des plasmatocytes, une deuxième population d'hémocytes (environ 30 cellules) se différencie pour donner naissance aux cellules à cristaux qui contrairement aux plasmatocytes, migrent peu et restent groupées au niveau du proventricule, une structure antérieure de l'intestin moyen (Lebestky et al., 2000) (Cf. **figure 1.10B et C**, en rouge).

Les hémocytes embryonnaires perdurent dans l'hémolymphe de la larve, où on compte entre 2500 et 5000 hémocytes au total à la fin du stade larvaire L3 (Lanot et al., 2001). Des plasmatocytes produits lors de cette première vague sont également retrouvés dans l'hémolymphe chez l'adulte (Holz et al., 2003).



D'après Lebetzky *et al.*, 2000

**Figure 1.10. Représentation schématique de l'hématopoïèse embryonnaire chez la drosophile**

(A) Embryon de stade 5 : l'endoderme antérieur est représenté en violet pâle (ae), les prohémocytes en vert (he) et le primordium de la glande lymphatique en bleu (lg). (B) Embryon de stade 11 : les prohémocytes se différencient en nombreux plasmatocytes (gris-bleu) et en cellules à cristaux (ccps, rouge). Les précurseurs de la glande lymphatique commencent à migrer dorsalement. (C) Embryon de stade 17 : les plasmatocytes sont dispersés dans l'hémolymphe alors que les cellules à cristaux restent groupées au niveau du proventricule (pv). La glande lymphatique est localisée au niveau dorsal le long du vaisseau dorsal (dv). Avec l'accord de l'éditeur The American Association for the Advancement of Science, numéro de licence : 4347670563878.

### 1.2.2.3 L'hématopoïèse larvaire

La deuxième vague d'hématopoïèse a lieu au stade larvaire. Dans la larve, les hémocytes sont de deux origines, soit embryonnaire et larvaire. Les hémocytes d'origine embryonnaire (i.e. dérivés du mésoderme proencéphalique) sont retrouvés soit en circulation et qualifiés d'hémocytes circulants, soit pour la majorité d'entre eux attachés à l'épiderme cuticulaire où ils forment alors des structures appelés îlots sessiles (Kurucz et al., 2007; Lanot et al., 2001; Leitao and Sucena, 2015; Makhijani et al., 2011). Les hémocytes d'origine larvaire (i.e. dérivés du mésoderme cardiogénique) quant à eux composent l'organe spécialisé appelé glande lymphatique (GL) (Jung et al., 2005; Lanot et al., 2001; Shrestha and Gateff, 1982).

#### 1.2.2.3.1 Les hémocytes circulants et sessiles

Les hémocytes en circulation sont capables de se regrouper pour former des structures particulières qualifiées d'îlots sessiles. Ces groupes de plasmotocytes et cellules à cristaux sont attachés à l'épiderme suivant une distribution bien particulière le long de chacun des segments abdominaux de la larve (Csordas et al., 2014; Lanot et al., 2001; Makhijani et al., 2011). Au stade larvaire L3, les hémocytes sessiles sont principalement localisés au niveau du vaisseau dorsal où ils sont pris en sandwich entre l'épiderme et la paroi musculaire de la larve (Makhijani et al., 2011) (Cf. **figure 1.11a**). Ces îlots sessiles sont alors qualifiés de niches hématopoïétiques. En effet, ces niches fournissent un environnement propice à la survie, la prolifération et la différenciation des plasmotocytes (Babcock et al., 2008; Bretscher et al., 2015; Makhijani et al., 2011). Les hémocytes qui forment ces niches ont la capacité de quitter puis de réintégrer ces dernières permettant ainsi un échange continu entre les hémocytes circulants dans l'hémolymphe et ceux résidents dans les îlots sessiles (Babcock et al., 2008; Makhijani et al., 2011; Welman et al., 2010) (Cf. **figure 1.11b**). Différents facteurs responsables de la rétention et de la mobilisation des hémocytes ont été identifiés. Entre autres, les études de Makhijani *et al.* ont montré que les hémocytes des îlots sessiles sont en contact avec des neurones du système nerveux périphérique ce qui représenterait un microenvironnement attractif et propice à la fois pour la survie et la prolifération des hémocytes (Makhijani et al., 2011) (Cf. **figure 1.11b**). Cette observation fait d'ailleurs un rappel direct au concept de niche hématopoïétique chez les vertébrés où le système nerveux

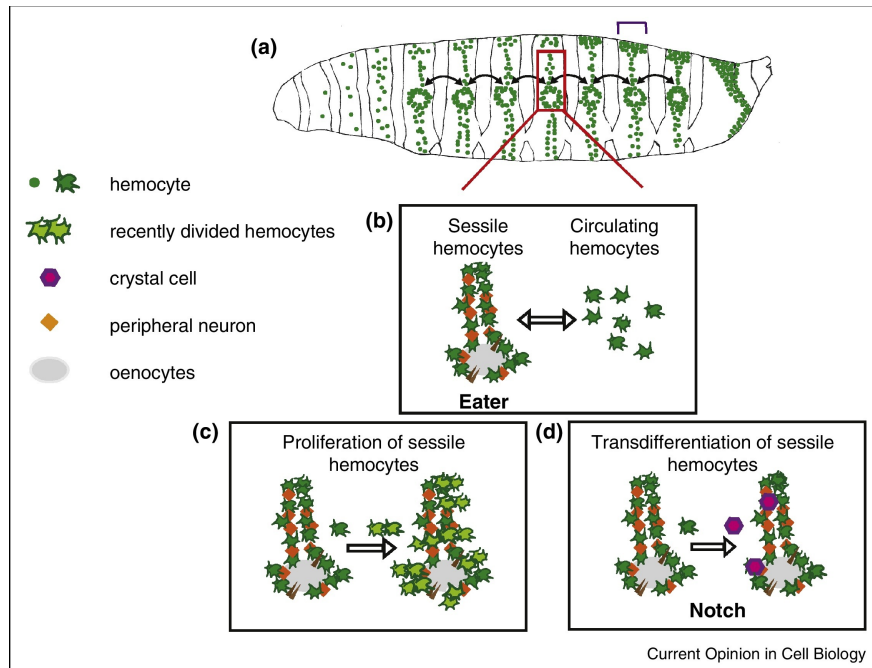
joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie, la régénération et la réponse inflammatoire (Hanoun et al., 2015). Un autre facteur clé dans la rétention des hémocytes sessiles est le récepteur Eater, un récepteur de la famille Nimrod, originellement identifié pour son rôle dans la phagocytose des bactéries Gram<sup>+</sup> par les plasmatoctes (Kocks et al., 2005). De récentes études ont montré l'implication de Eater dans l'adhésion des plasmatoctes à la cuticule (Bretscher et al., 2015).

Alors que la GL ne libère son contenu qu'au moment de la métamorphose, la quantité d'hémocytes circulants/sessiles augmente drastiquement entre les stades larvaires L1 et L3 (Lanot et al., 2001; Makhijani et al., 2011). Ce qui suggère la prolifération ou la différenciation d'une population de progéniteurs. En effet, une population d'hémocytes qui n'expriment aucun marqueur de différenciation connu, a été identifiée en circulation dans la larve et pourrait contribuer à la production *de novo* de plasmatoctes et/ou cellules à cristaux (Lanot et al., 2001). Toutefois, ceci n'a pas encore été démontré. Par contre, il a été montré que l'accroissement de la population de plasmatoctes reposait sur sa capacité d'auto-renouvellement. De plus, il semblerait que les plasmatoctes sessiles prolifèrent d'avantage que les plasmatoctes en circulation suggérant un microenvironnement propice à la prolifération (Makhijani et al., 2011) (Cf. **figure 1.11c**).

D'autre part, une étude récente a montré que les plasmatoctes possédaient la capacité de se trans-différencier en cellules à cristaux (Leitao and Sucena, 2015) (Cf. **figure 1.11d**). De plus, Markus *et al.* ont observé que suite à un parasitisme par les œufs de guêpes *Leptopilina boulardi*, les hémocytes des îlots sessiles entrent en circulation et se différencient en lamellocytes. D'autres études ont montré la capacité des plasmatoctes à se trans-différencier en lamellocytes (Honti et al., 2010; Markus et al., 2009; Stofanko et al., 2010).

Toutes ces évidences soulignent la plasticité des plasmatoctes d'origine embryonnaire qui sont capables à la fois de proliférer et de se trans-différencier dans les deux autres types de cellules, et démontrent une activité hématopoïétique larvaire dans les îlots sessiles qualifiés de niches hématopoïétiques.





D'après Ratheesh *et al.*, 2015

### Figure 1.11. Les hémocytes circulants et sessiles du stade larvaire

(a) Représentation schématique illustrant la distribution des hémocytes dans une larve au stade L3. Les hémocytes colonisent chaque segment et sont encrés dans la paroi interne de la larve dès le début du stade larvaire. Plus tard, les hémocytes sont aussi retrouvés associés au vaisseau dorsal (indiqué par le crochet en violet). (b) Les hémocytes sessiles au niveau des îlots sont regroupés autour des œnocytes et s'associent avec des neurones du système nerveux périphérique, indispensables à leur survie. Les hémocytes circulent des îlots sessiles vers la circulation et inversement. (c) Les hémocytes sessiles ont la capacité de proliférer et (d) de se trans-différencier en cellules à cristaux sous l'influence de la voie Notch. Avec l'accord de l'éditeur Elsevier.

#### 1.2.2.3.2 La glande lymphatique : l'organe hématopoïétique larvaire

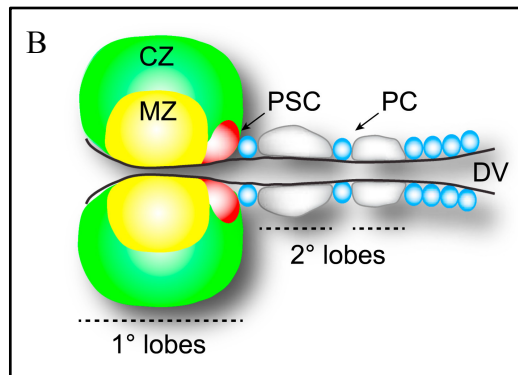
Les précurseurs de l'organe hématopoïétique larvaire se différencient, au cours de l'embryogénèse, à partir de cellules du mésoderme cardiogénique (Tepass *et al.*, 1994) (Cf. **figure 1.10**, en bleu). Ces cellules vont migrer dans la partie dorsale et se localiser de part et d'autre du vaisseau dorsal pour former le primordium de la glande lymphatique. A la fin de l'embryogénèse, le primordium de la GL correspond à deux lobes d'une vingtaine de cellules appelés lobes antérieurs ou primaires alignés le long du vaisseau dorsal (Cf. **figure 1.10C**, en bleu). Ces lobes ne contiennent alors que des cellules non différenciées ou prohémocytes (Jung *et al.*, 2005). Au cours des deux premiers stades larvaires L1 et L2, la morphologie de la GL évolue, les hémocytes prolifèrent conduisant à une expansion des lobes primaires et plusieurs paires de lobes secondaires apparaissent postérieurement. Au cours du stade larvaire

L3, les hémocytes prolifèrent activement et conduisent à une expansion majeure des lobes primaires. En fin de stade larvaire L3, la GL est alors composée de deux à sept paires de lobes alignés le long du vaisseau dorsal ou l'équivalent du cœur (tube cardiaque) chez la drosophile (Jung et al., 2005). Chaque lobe est séparé du suivant par une cellule péricardiale ou néphrocyte (Evans et al., 2003) (Cf. **figure 1.12**).

Les prohémocytes des lobes primaires entrent en quiescence proliférative et commencent à se différencier au stade larvaire L3 (Jung et al., 2005; Lebestky et al., 2000). Une étude exhaustive de la GL au stade L3 a permis de mettre en avant l'existence dans les lobes primaires de trois régions qui se distinguent par leur morphologie et leur composition hémocytaire (Jung et al., 2005) (Cf. **figure 1.12B**). À la périphérie des lobes primaires, la zone corticale (Azcoitia et al., 2005) d'apparence granuleuse renferme des hémocytes différenciés, c'est-à-dire des plasmacytes et des cellules à cristaux (Cf. **figure 1.12B**, en vert). La zone médullaire (Edwards et al., 2016), située dans la région médiane, est d'apparence plus lisse mais compacte en comparaison de la ZC. Elle contient une population d'hémocytes plus dense et non différenciés, les prohémocytes (Cf. **figure 1.12B**, en jaune). La troisième région ou centre de signalisation postérieur (PSC pour « posterior signalling center ») correspond à un groupe de quelques cellules formant un compartiment situé à l'extrémité postérieure des lobes primaires (Cf. **figure 1.12B**, en rouge). D'après les travaux de Lebestky *et al.*, il jouerait un rôle instructeur dans la différenciation des cellules à cristaux (Lebestky et al., 2003). Le PSC est composé d'une population hémocytaire unique qui est caractérisée par l'expression de marqueurs spécifiques, différents des marqueurs caractéristiques des hémocytes matures et indifférenciés (Jung et al., 2005). Pendant longtemps, le PSC a été considéré comme étant la niche hématopoïétique larvaire impliquée dans le maintien du caractère indifférencié des prohémocytes (Krzemien et al., 2007; Mandal et al., 2007) et dans la réponse au parasitisme (Crozatier et al., 2004; Krzemien et al., 2007; Sinenko et al., 2011). Cependant les résultats d'une étude récente ont remis en question ce modèle, en montrant que l'ablation complète du PSC n'avait aucun impact sur le maintien des prohémocytes de la ZM (Benmimoun et al., 2015). Dans le même sens, une seconde étude montre que la réduction du PSC affecte la différenciation des hémocytes mais ce, sans affecter le réservoir de prohémocytes (Oyallon et al., 2016).



D'après Meister et Lagueux, 2003



D'après Baril *et al.*, 2017

### Figure 1.12. L'organe hématopoïétique larvaire : la glande lymphatique

(A) Organe hématopoïétique larvaire observé au microscope électronique à balayage. La glande lymphatique est composée de 3 à 7 paires de lobes alignées le long du vaisseau dorsal (indiqué par la flèche); barre : 50  $\mu\text{m}$ . Avec l'accord de l'éditeur John Wiley and Sons, numéro de licence : 4351361286732.

(B) Représentation schématique de la glande lymphatique. Les lobes primaires sont constitués de la zone corticale (CZ) en vert, la zone médullaire (MZ) en jaune, et du PSC en rouge. Les lobes secondaires quant à eux sont représentés en gris. Chaque paire de lobes est séparée par une cellule péri-cardiale (PC) en bleu et alignée le long du vaisseau dorsal (DV).

Les hémocytes de la ZC proviennent de la différenciation des prohémocytes de la ZM (Jung *et al.*, 2005). De plus, il existe une population de progéniteurs intermédiaires qui n'expriment aucun des marqueurs des prohémocytes ou hémocytes matures à la jonction entre les zones ZC et ZM (Krzemien *et al.*, 2010). Jusqu'à la fin du stade larvaire L2, les lobes secondaires contiennent des prohémocytes qui vont commencer à se différencier en plasmacytes et en cellules à cristaux à la fin du stade larvaire L3 ou en cas de réponse immunitaire (Kurucz *et al.*, 2007).

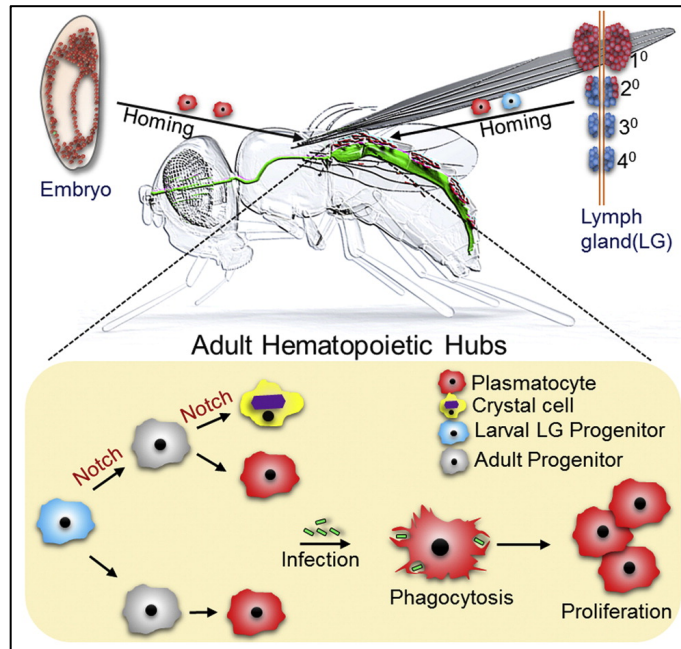
En condition normale, la GL se rupture et disperse son contenu en circulation seulement au moment de la métamorphose (Grigorian *et al.*, 2011; Holz *et al.*, 2003). C'est l'hormone stéroïde ecdysone qualifiée d'hormone de mue, qui orchestre alors tous les changements tissulaires dont la différenciation de la majorité des prohémocytes en

plasmatoctes (macrophages) hyperactifs qui vont phagocyter tous les tissus larvaires lysés (Lanot et al., 2001).

En réponse à un challenge immun tel que le parasitisme par les œufs de guêpes *L. boulandi*, la GL se disperse de façon précoce. Les hémocytes prolifèrent activement et les prohémocytes des lobes primaires et secondaires se différencient prématurément et massivement en lamellocytes avant d'être relargués en circulation dans l'hémolymphe (Krzemien et al., 2010; Lanot et al., 2001).

#### 1.2.2.4 L'hématopoïèse chez l'adulte

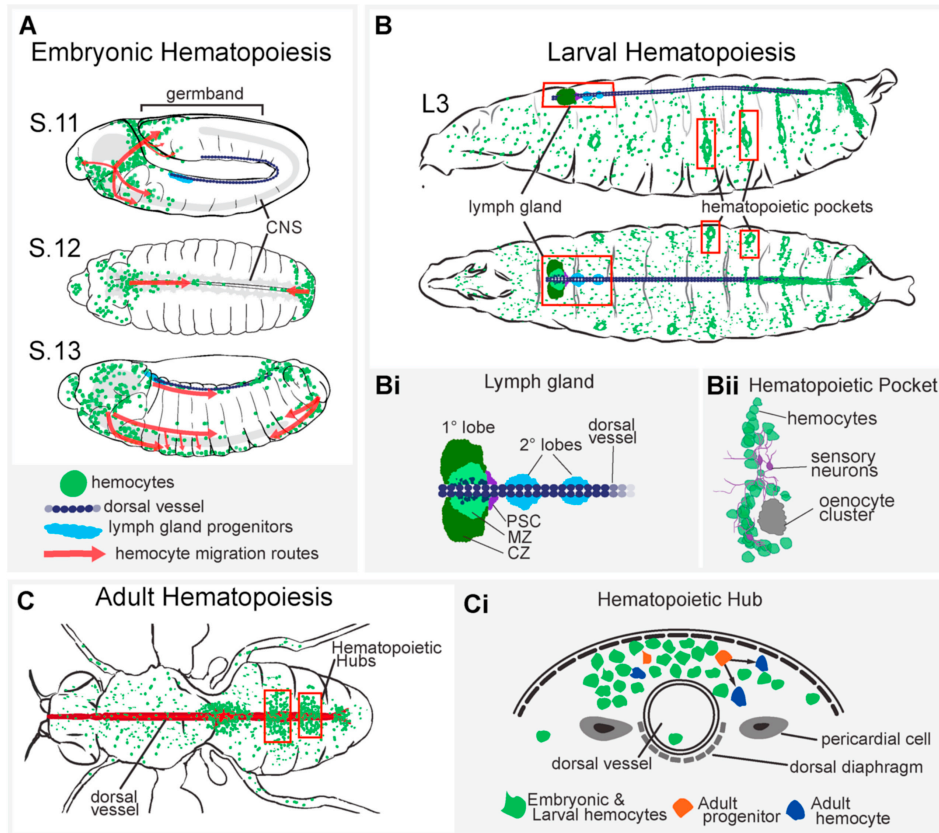
Les hémocytes chez l'adulte proviennent des deux vagues d'hématopoïèse embryonnaire et larvaire (Holz et al., 2003). Jusqu'à tout récemment, aucun site actif d'hématopoïèse chez l'adulte n'avait été identifié. On considérait alors que la population d'hémocytes adultes était composée uniquement de plasmatoctes différenciés exprimant le marqueur Nimrod C1, capables de produire des peptides microbiens et de phagocyter et que leur nombre ainsi que leur activité phagocytaire diminuaient avec l'âge (Elrod-Erickson et al., 2000; Lanot et al., 2001). Cependant ce modèle a été invalidé suite à l'identification chez l'adulte, d'au moins deux sous-populations de macrophages aux fonctions différentes ainsi que la présence de cellules à cristaux (Clark et al., 2011; Honti et al., 2014; Kurucz et al., 2007). De plus, une étude récente démontre la présence de sites actifs d'hématopoïèse dans la partie dorsale de l'abdomen au niveau des segments A1 à A4 chez l'adulte (Ghosh et al., 2015) (**Cf. figure 1.13**). Ces sites actifs sont des groupes d'hémocytes intégrés dans un réseau de matrice extracellulaire au niveau du cœur. Ils seraient constitués d'hémocytes d'origine embryonnaires et larvaires (plasmatoctes et cellules à cristaux), de progéniteurs hématopoïétiques adultes provenant des lobes les plus postérieurs de la GL, mais aussi d'hémocytes différenciés au cours de la vie adulte. En effet, les progéniteurs adultes seraient capables de se différencier *de novo* en plasmatoctes et cellules à cristaux. De plus, cette étude montre que les plasmatoctes, qui sont normalement quiescents et dont le nombre diminuent avec l'âge, auraient la capacité de proliférer en réponse à une infection bactérienne (Ghosh et al., 2015).



D'après Ghosh *et al.*, 2015

**Figure 1.13. L'hématopoïèse chez la mouche adulte**

Quatre sites actifs d'hématopoïèse ont été identifiés chez l'adulte dans la partie dorsale des segments A1 à A4 le long du vaisseau dorsal. Dans ces sites, différentes cellules sont présentes : des plasmacytes et cellules à cristaux d'origine embryonnaire, des progéniteurs larvaires provenant de la GL et des progéniteurs adultes. Avec l'accord de l'éditeur Elsevier.



D'après Parsons and Foley, 2016

### Figure 1.14. L'hématopoïèse en bref, au cours du développement chez la drosophile

(A) L'hématopoïèse embryonnaire, (B) l'hématopoïèse larvaire au niveau de la glande lymphatique (Bi) et des îlots sessiles (Bii), (C) l'hématopoïèse adulte au niveau des sites hématopoïétiques actifs. Avec l'accord de l'éditeur Elsevier, numéro de licence : 4365920537541.

### 1.2.3 Régulation génétique de l'hématopoïèse

De nombreux travaux réalisés sur des cellules sanguines en culture ou dans des organismes modèles tels que la souris, le poisson-zèbre ou encore plus récemment la drosophile ont permis d'identifier de nombreux facteurs de transcription (tels que les facteurs GATA et RUNX) et voies de signalisation (comme Notch et JAK/STAT) impliqués dans le contrôle des différents aspects de l'hématopoïèse tels que la spécification des progéniteurs sanguins, leur prolifération ou leur différenciation en cellules matures. De façon remarquable, une grande majorité des gènes impliqués dans les processus de régulation de l'hématopoïèse sont conservés au cours de l'évolution, de la drosophile à l'homme (Hartenstein, 2006; Hartenstein and Mandal, 2006; Martinez-Agosto et al., 2007). Nous aborderons dans cette

partie, les différents facteurs et voies de signalisation impliqués dans le contrôle de l'hématopoïèse chez la drosophile au stade embryonnaire puis larvaire.

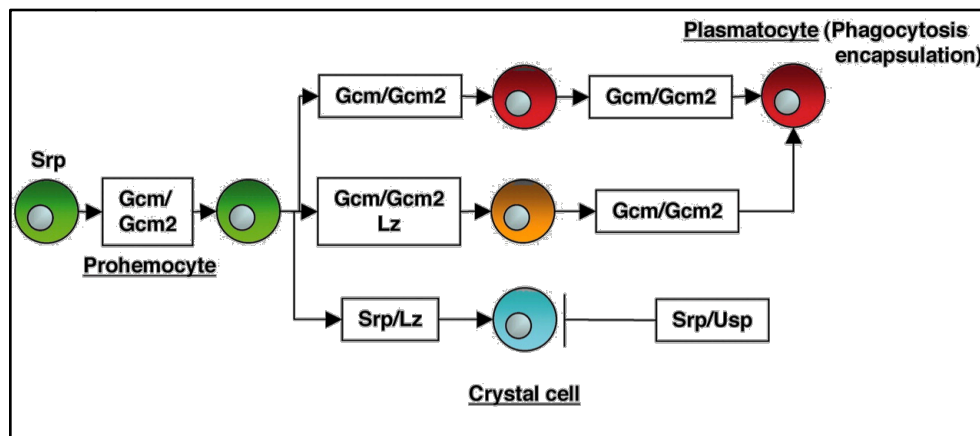
### 1.2.3.1 Régulation génétique de l'hématopoïèse embryonnaire

Dans l'embryon de drosophile, la population de progéniteurs hématopoïétiques ou prohémostocytes est établie très tôt au cours du développement, dès le stade blastoderme, au niveau du mésoderme proencéphalique, par l'expression du facteur de transcription de type GATA Serpent (*Srp*) (Rehorn et al., 1996; Waltzer et al., 2010). L'expression de *Srp* est requise pour la spécification des hémostocytes embryonnaires et est maintenue dans ces cellules au cours du développement de la drosophile, il est d'ailleurs qualifié de facteur panhémostocytaire, i.e. exprimé par tous les hémostocytes (Fossett et al., 2003). En cas de mutations perte de fonction de *Srp*, le nombre de prohémostocytes est très fortement diminué voire complètement absent et par conséquent l'embryon est dépourvu d'hémostocytes matures (Rehorn et al., 1996). Un peu plus récemment, l'expression de *Srp* a été montrée comme étant suffisante pour promouvoir le développement d'hémostocytes au niveau du mésoderme antérieur (Spahn et al., 2014). Chez la drosophile, il existe 5 facteurs GATA, dont deux d'entre eux, *Srp* et Pannier (*Pnr*) jouent un rôle clé dans l'hématopoïèse.

Les prohémostocytes embryonnaires sont dits bipotents: ils peuvent se différencier en deux types de cellules matures, les plasmotocytes ou cellules à cristaux, et la ségrégation entre ces deux lignages repose sur une balance d'expression entre les facteurs de transcription de type GATA, RUNX et GCM (Cf. **figure 1.15**). Alors que la différenciation des plasmotocytes requiert les facteurs Glide/Glial Cell Missing (GCM) et GCM2, celle des cellules à cristaux nécessite le facteur de transcription de type RUNX, Lozange (*Lz*) (Alfonso and Jones, 2002; Bataille et al., 2005; Fossett et al., 2003; Lebestky et al., 2000; Waltzer et al., 2002; Waltzer et al., 2003). L'expression de *gcm/gcm2* est détectée dès le stade embryonnaire 5 dans l'ensemble des prohémostocytes exprimant *srp* et est par la suite restreinte aux plasmotocytes. Au stade 7, les progéniteurs des cellules à cristaux apparaissent lorsque les prohémostocytes les plus antérieurs du mésoderme vont cesser d'exprimer *gcm/gcm2* et commencer à exprimer *lz* (Bataille et al., 2005). Parmi ces prohémostocytes, environ 60% vont maintenir une expression élevée de *lz* à travers une boucle d'auto-activation et se différencier en cellules à cristaux.

Alors que pour les 40% restants, l'expression résiduelle de *gcm/gcm2* inhibe l'expression de *lz* et conduit ainsi à leur différenciation en plasmatoctes (Bataille et al., 2005). Le gène *U-shaped* (*Ush*), un membre de la famille Friend-Of-GATA (FOG), est aussi un régulateur du choix de lignage, qui lui, est exprimé dans les progéniteurs au stade 8 et maintenu par la suite dans les plasmatoctes (Muratoglu et al., 2006). *Ush* lie *Srp* et inhibe son activité transcriptionnelle qui, combinée avec l'expression de *gcm/gcm2*, conduit à la différenciation des prohémostes en plasmatoctes. En résumé, *Ush* réprime la destinée « cellules à cristaux » et promeut la destinée « plasmatoctes » (Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2002).

Alors que le facteur GATA *srp* est à l'origine de l'expression des facteurs *gcm* et *ush* dans les prohémostes et les plasmatoctes ainsi que dans le maintien de l'expression de *lz* dans les cellules à cristaux, le signal responsable de l'induction de *lz* dans les progéniteurs embryonnaires est inconnu à ce jour (Muratoglu et al., 2006; Waltzer et al., 2002; Waltzer et al., 2003). Par contre, il a été montré que *lz* interagit physiquement et fonctionnellement avec *Srp* pour induire la transcription de gènes spécifiques des cellules à cristaux tels que les prohémostes et promouvoir leur différenciation (Ferjoux et al., 2007; Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2003).



D'après Williams, 2007

### Figure 1.15. Les différents facteurs impliqués dans la différenciation des hémostes matures au stade embryonnaire

La formation des prohémostes requiert l'expression du facteur de transcription de type GATA, *Srp*. Dès le stade embryonnaire 5, tous les prohémostes commencent à exprimer les facteurs de transcription *Gcm* et *Gcm2*. Une partie des hémostes vont cesser d'exprimer *gcm/gcm2* et commencer à exprimer le facteur de transcription de type RUNX, *Lz*. L'expression de *Lz* induit la différenciation d'une partie des prohémostes en cellules à cristaux alors que l'expression soutenue de *gcm/gcm2* est requise pour la différenciation en plasmatoctes. Copyright 2007. The American Association of Immunologists Inc.



Les précurseurs de la GL sont spécifiés au cours de l'embryogénèse au niveau du mésoderme thoracique latéral à partir de trois groupes de cellules situés dans la partie dorsale des segments thoraciques T1 à T3 (Holz et al., 2003; Mandal et al., 2004). Le facteur de transcription de la famille EBF (Early B-Cell Factor), Collier (Col) est le premier marqueur exprimé par ces cellules (Crozatier et al., 2004; Crozatier et al., 1996). Dans l'embryon au stade 11, les groupes de cellules des segments T2 et T3 expriment Col alors que l'expression du gène homéotique *Antennapedia* (*Antp*) est restreinte au segment T3. Un autre facteur de transcription Odd-skipped (Odd) est simultanément exprimé dans les segments T1 à T3 (Mandal et al., 2007). A la fin de l'embryogénèse (stade 13 à 16), les trois groupes de cellules qui expriment Odd fusionnent pour former les lobes primaires de la GL, où seules 5 à 6 cellules situées à l'extrémité postérieure de chaque lobe expriment *Antp* et Col (Crozatier et al., 2004; Mandal et al., 2007). Ces cellules sont les précurseurs du PSC. Pour être exacte, Col est fortement exprimé dans les cellules qui formeront le PSC, mais il est aussi faiblement exprimé dans d'autres cellules de la GL ainsi que dans quelques cellules péricardiales (Crozatier et al., 2004). Une fois les lobes primaires formés, les prohémyocytes commencent à exprimer le facteur de transcription *Srp* dont l'expression sera maintenue tout au long du stade larvaire (Jung et al., 2005; Lebestky et al., 2000). A la fin du stade embryonnaire, la GL consiste alors en une paire de lobes primaires d'une vingtaine de cellules accompagnée de cellules péricardiales ou néphrocytes qui expriment le facteur Odd (Lanot et al., 2001; Mandal et al., 2007).

### **1.2.3.2 Régulation génétique de l'hématopoïèse larvaire au niveau de la glande lymphatique**

La régulation de l'hématopoïèse au stade larvaire a été très largement étudiée au cours des dernières années et a permis de mettre en évidence de nombreux facteurs et voies de signalisation, impliqués dans le maintien de l'homéostasie de la GL. Ces facteurs ou voies de signalisation régulent d'une part le maintien du caractère indifférencié des progéniteurs hématopoïétiques ou prohémyocytes et d'autre part leur différenciation en hémyocytes matures. Alors que l'hématopoïèse embryonnaire ne semble réguler que par des facteurs intrinsèques, l'hématopoïèse larvaire est quant à elle régulée à la fois par des facteurs intrinsèques i.e. issus

de la glande lymphatique, et des facteurs extrinsèques i.e. externes à la glande, comme les facteurs environnementaux (l'apport en nutriments) ou la communication entre les organes (Cf. **figure 1.16**).

#### **1.2.3.2.1 Contrôle moléculaire du maintien du caractère indifférencié des prohémyocytes de la zone médullaire**

Les facteurs et voies de signalisation qui contrôlent le maintien des prohémyocytes chez la drosophile ont principalement été étudiés dans la GL au stade larvaire. En effet, Jung *et al.* ont mis en évidence la présence de progéniteurs dans la GL jusqu'au dernier stade larvaire L3 suggérant ainsi l'existence d'un contrôle moléculaire permettant le maintien de ces prohémyocytes (Jung et al., 2005). Au cours de la dernière décennie, la GL est devenue un modèle de choix pour l'identification et l'étude des facteurs impliqués dans le maintien du caractère indifférencié ou souche des progéniteurs. Ces études démontrent que le maintien du « caractère souche » est assuré à la fois de manière autonome par les prohémyocytes de la zone médullaire (Edwards et al., 2016) et de manière non autonome en réponse à des signaux qui sont soit intrinsèques à la GL émanant du PSC ou des hémyocytes différenciés de la zone corticale (Azcoitia et al., 2005) soit d'origine systémique.

##### **1.2.3.2.1.1 Régulation autonome de la zone médullaire**

A l'intérieur de la GL, les différents compartiments communiquent entre eux pour assurer le contrôle de la balance entre le maintien des progéniteurs et leur différenciation en hémyocytes matures. La ZM est capable de réguler de façon autonome le devenir de ses prohémyocytes à travers différents facteurs et voies de signalisation (Letourneau et al., 2016; Yu et al., 2018). Entre autre, l'expression du ligand Wingless (Wg) dans la ZM, qui par sa liaison aux récepteurs Frizzled (Fz) et Fz2, active la voie de signalisation Wnt/Wg canonique et prévient la différenciation des progéniteurs en maintenant l'expression de Shotgun (Shg), l'homologue chez la drosophile de la cadhérine E (Sinenko et al., 2009). Le facteur de type FOG, *ush* est aussi exprimé dans les prohémyocytes de la ZM et permet de maintenir leur caractère indifférencié (Gao et al., 2009, 2013). De plus, deux récentes études ont montré

qu'en plus d'être fortement exprimé dans les cellules du PSC, Col était exprimé à des niveaux plus faibles dans les prohémyocytes de la ZM, ce qui est nécessaire au maintien de leur caractère indifférencié. Puisque la diminution de l'expression de Col dans les progéniteurs entraîne leur différenciation et par conséquent la perte de la ZM (Benmimoun et al., 2015; Oyallon et al., 2016).

Contrairement aux trois facteurs mentionnés ci-dessus, qui favorisent le maintien des progéniteurs, il existe aussi de nombreux gènes et voies de signalisation dans la ZM qui quant à eux induisent la différenciation des prohémyocytes. Par exemple, l'activation du récepteur de type FGF (« Fibroblast Growth Factor »), Heartless, par ses deux ligands Pyramus et Thisbe dans la ZM est requise pour induire la différenciation des progéniteurs. De plus, la voie de signalisation Heartless est négativement régulée par le protéoglycane d'héparane sulfate, Terribly Reduced Optic Lobes (Trol)/Perlecan qui est un composé de la matrice extracellulaire (Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2013). Trol promeut également l'activité de la voie de signalisation Hedgehog qui est requise pour le maintien des progéniteurs (Grigorian et al., 2013). Ces dernières études illustrent le rôle important que joue la matrice extracellulaire dans le maintien du caractère indifférencié des progéniteurs à travers la séquestration et la libération contrôlée de ligands tels que Pyramus, Thisbe ou Hh. Une étude récente a aussi montré que Jumeau (Jumu), un membre de la famille des facteurs de transcription Forkhead ou à motif en tête de fourche, induit la différenciation des prohémyocytes en réprimant de façon autonome l'expression de Col dans la ZM (Hao and Jin, 2017).

Il a également été démontré que le maintien de l'état indifférencié des progéniteurs sanguins dépend du niveau de ROS (« Reactive Oxygen Species »). En effet, les prohémyocytes de la ZM présentent des niveaux élevés de ROS contrairement aux hémyocytes de la ZC. De plus, alors que la diminution des niveaux de ROS dans la ZM inhibe la différenciation des prohémyocytes, l'augmentation de ces derniers entraîne leur différenciation prématurée (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). Une étude ultérieure montre que cette différenciation précoce est due à l'activation de la voie de signalisation JNK, qui à son tour active le facteur de transcription FoxO qui lui agit pour réduire les niveaux de cadhérine E (Gao et al., 2014).

### 1.2.3.2.1.2 Signaux émanant du PSC

Jusqu'à ce qu'une étude publiée en 2015 vienne bouleverser les croyances, les cellules du PSC étaient considérées comme la niche hématopoïétique requise pour le maintien indifférencié des progéniteurs sanguins de la glande (Krzemien et al., 2007; Mandal et al., 2007). Le PSC régule la différenciation des prohémyocytes notamment à travers l'expression des ligands Upd3 et Hh, qui vont activer respectivement les voies de signalisation JAK/STAT et Hedgehog dans les prohémyocytes de la ZM (Krzemien et al., 2007; Mandal et al., 2007). Cependant, ce modèle a été remis en question suite à la publication de deux études successives en 2015 et 2016 montrant que le PSC n'était pas absolument requis pour le maintien des prohémyocytes de la ZM. Puisque l'ablation complète du PSC n'a aucun effet sur le maintien de la ZM de même que la réduction de la taille du PSC (Benmimoun et al., 2015; Oyallon et al., 2016). Bien que l'ablation du PSC n'affecte pas la quiescence des progéniteurs, de nombreuses études précédentes suggèrent néanmoins que l'augmentation de la taille ou de l'activité du PSC modifie l'équilibre entre les prohémyocytes et les hémyocytes (expansion de la ZM aux dépens de la ZC). Effectivement, ces études ont montré que de nombreux facteurs sont impliqués dans le contrôle de la taille du PSC, incluant les voies de signalisation Wnt/Wingless (Wg) (Sinenko et al., 2009), BMP/Decapentaplegic (Dpp), dMyc (Pennetier et al., 2012), ou Insulin/Target of Rapamycin (InR/TOR) (Benmimoun et al., 2012) ainsi que les gènes *Jumeau (Jumu)* (Hao and Jin, 2017), *Bag of marbles (Bam)* (Tokusumi et al., 2015), *Bantam* (Lam et al., 2014), *Robos* (Morin-Poulard et al., 2016), *ARF-1* (Khadilkar et al., 2014), *Col* ou *Antp* (Mandal et al., 2007). De plus, de nombreuses études ont rapporté l'existence de longs filopodes au niveau des cellules du PSC qui s'étendent jusque dans la ZM, ce qui suggère un autre moyen de communication entre le PSC et les prohémyocytes (Mandal et al., 2007; Pennetier et al., 2012).

En plus de son rôle dans le maintien de l'homéostasie de la GL en conditions normales, le PSC joue un rôle clé dans la réponse immunitaire, par exemple suite à un parasitisme par les œufs de guêpes (Crozatier et al., 2004; Krzemien et al., 2007; Sinenko et al., 2011).

### **1.2.3.2.1.3 Signaux provenant des cellules différenciées de la zone corticale**

D'autre part, il a été montré que les hémocytes différenciés de la ZC envoient des signaux aux prohémocytes de la ZM afin de maintenir leur caractère indifférencié. Il a été proposé que le ligand Pvf1 (« PDGF-VEGF related Factor 1 ») émanant du PSC était transporté par des vésicules jusque dans la ZC où il lie son récepteur PVR (« PDGF-VEGF related Receptor »). PVR active ensuite le facteur de transcription STAT92E qui induit à son tour l'expression du facteur de croissance ADGF-A (« Adenosine Deaminase-related Growth Factor A »). La production du facteur de croissance ADGF-A, par les hémocytes de la ZC, entraîne la diminution des niveaux extracellulaires d'Adénosine dans la ZM et ainsi inhibe la différenciation des prohémocytes en bloquant la voie de signalisation Adénosine/AdoR (Mondal et al., 2011). Les signaux provenant des hémocytes différenciés de la ZC maintiennent alors le réservoir de progéniteurs et aident ainsi à réguler la balance entre la quiescence et la différenciation des prohémocytes et cette régulation de la ZC à la ZM a été surnommée « equilibrium signal » (Mondal et al., 2014). De plus, l'expression de PVR dans cet « equilibrium signal » semble réguler par les facteurs bip1 et RpS8 ainsi que la nucléoporine Nup98 (Mondal et al., 2014). Plus récemment, le facteur de transcription Scalloped (Sd) a aussi été identifié comme étant impliqué dans cet équilibre à travers l'expression de PVR (Ferguson and Martinez-Agosto, 2017).

### **1.2.3.2.1.4 Les facteurs environnementaux**

Le maintien du caractère indifférencié des prohémocytes de la ZM dépend également de facteurs externes à la GL comme les signaux systémiques ou encore les signaux provenant d'autres organes. Parmi les facteurs environnementaux régulant le maintien des progéniteurs, le principal est le statut nutritionnel de la larve. En effet, la carence nutritive affecte directement le maintien des progéniteurs de la GL en conduisant à leur différenciation prématurée (Benmimoun et al., 2012; Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2013; Shim et al., 2012; Tokusumi et al., 2012). La voie de signalisation InR/TOR est la principale qui intègre les signaux métaboliques et la croissance des tissus (Tennessee and Thummel, 2011). Le corps gras, qui est l'équivalent du foie chez les mammifères, agit comme un senseur qui

orchestre la croissance des autres tissus en fonction des conditions nutritionnelles de la larve. En cas de carence nutritive, le corps gras restreint la croissance globale en régulant la sécrétion de DILPs (« *Drosophila insulin-like peptides* ») par les cellules IPCs (« *insulin-producing cells* ») du cerveau (l'équivalent des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas chez les mammifères) et la diminution des DILPs dans l'hémolymphe diminue l'activité de la voie InR/TOR dans les prohémocytes, ce qui induit leur différenciation prématurée. D'après Shim *et al.*, la diminution de l'activité de la voie InR/TOR dans les prohémocytes induirait une diminution de l'expression de Wg, qui est requise pour le maintien autonome des progéniteurs, et par conséquent la différenciation de ces derniers (Shim *et al.*, 2012). Dragojlovic-Munther et Martinez-Agosto quant à eux ont montré que l'activation de la voie InR/TOR dans les progéniteurs induisait une expansion de la GL ainsi qu'une augmentation des radicaux libres ou ROS dans les progéniteurs et que l'élimination des ROS permet de restaurer le phénotype d'hyper-prolifération (Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2013). Cependant, la voie de signalisation InR/TOR n'est pas seulement requise pour le maintien des progéniteurs de la ZM, puisqu'elle agit aussi de façon autonome sur la taille du PSC en promouvant la prolifération de ces cellules (Benmimoun *et al.*, 2012; Tokusumi *et al.*, 2012).

De manière plus surprenante, le système olfactif est aussi impliqué dans le contrôle de l'homéostasie de la GL (Shim *et al.*, 2013). Suite à la stimulation olfactive, le neurotransmetteur GABA est sécrété dans l'hémolymphe de la larve. Il active ensuite son récepteur GABA<sub>B</sub> exprimé par les progéniteurs dans la GL. Le signal GABA qui en résulte conduit au maintien de niveaux élevés de Ca<sup>2+</sup> cytosolique, qui est nécessaire pour prévenir la différenciation des prohémocytes (Shim *et al.*, 2013).

Enfin, en réponse au parasitisme par les œufs de guêpes *L. bouvardi*, l'inactivation de la voie de signalisation JAK/STAT dans les prohémocytes de la GL, induit leur différenciation précoce et massive en lamellocytes (Makki *et al.*, 2010).

#### **1.2.3.2.1.5 La communication entre les organes**

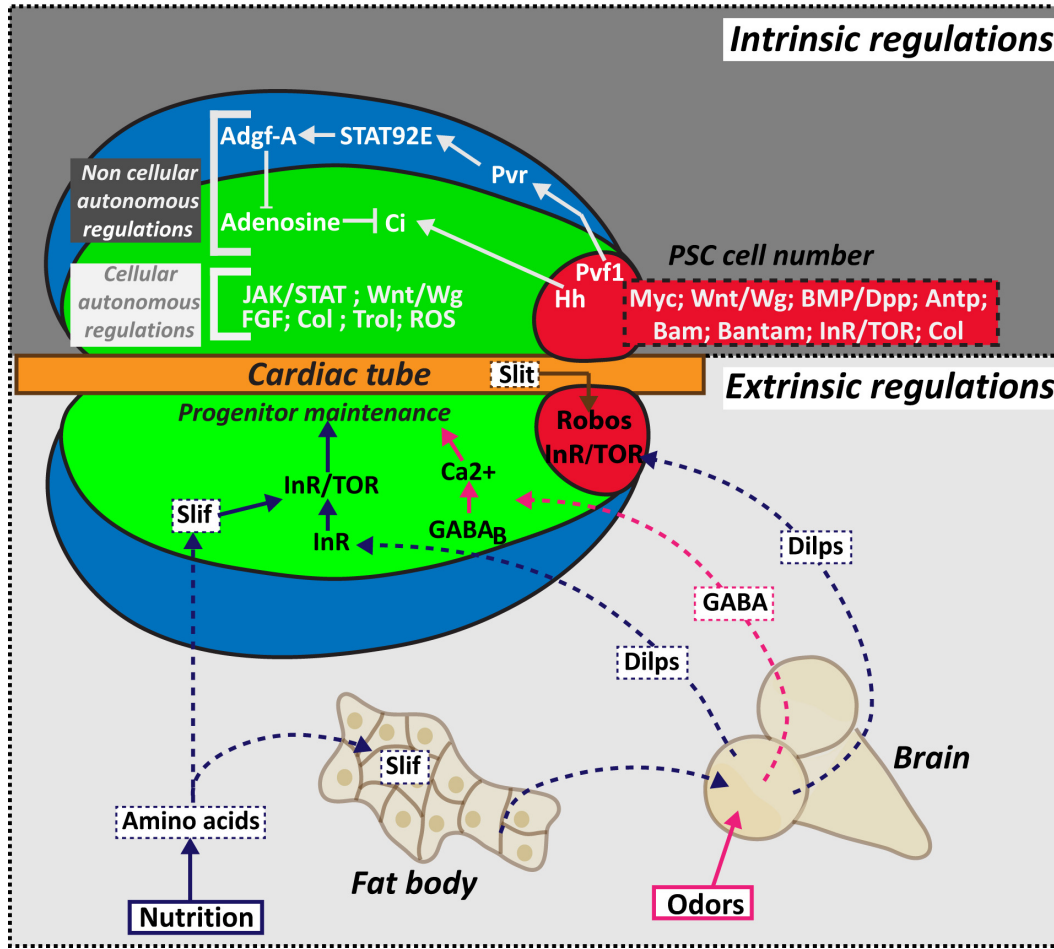
Comme dans la moelle osseuse des mammifères, où les CSHs reçoivent des signaux à la fois de la niche endostéale et de la niche vasculaire, de récentes études ont mis en évidence chez la drosophile une étroite communication entre le système sanguin vasculaire et la GL (He

et al., 2014; Morin-Poulard et al., 2016). Cette étude montre que la communication entre le tube cardiaque et la GL est médiée par la voie de signalisation Slit/Robo. Le ligand Slit, exprimé par les cellules du tube cardiaque, active son récepteur Robo dans le PSC, contrôlant ainsi à la fois la prolifération des cellules du PSC et leur regroupement (Morin-Poulard et al., 2016). Et d'ailleurs, la signalisation Slit/Robo joue également un rôle important dans l'homéostasie des CSHs chez les mammifères (Geutskens et al., 2012; Smith-Berdan et al., 2011).

#### **1.2.3.2.2 Contrôle moléculaire de la spécification des plasmatoctes**

Alors que les mécanismes qui contrôlent le maintien des progéniteurs sanguins dans la GL ont fait l'objet de nombreuses études, les facteurs qui régulent la spécification des plasmatoctes sont assez peu connus. Les plasmatoctes, qui représentent la majorité des hémocytes matures, sont formés à partir des prohémoctes de la ZM mais aussi des progéniteurs intermédiaires, qui représentent un état transitoire entre les prohémoctes et les hémocytes matures (Jung et al., 2005; Krzemien et al., 2010; Tokusumi et al., 2011). Dans la GL, la différenciation des plasmatoctes requiert le récepteur PVR, l'homologue des récepteurs PDGF et VEGF des vertébrés (Jung et al., 2005). En effet, par une analyse clonale, Jung *et al.* ont montré que des clones dépourvus de *Pvr*, générés dans la GL au stade larvaire L1 sont capables de générer au stade L3 des cellules à cristaux qui expriment les marqueurs Lz et ProPOA1 mais pas de cellules exprimant P1/NimC1 ou Pxn, qui sont deux marqueurs spécifiques des plasmatoctes. L'activation de l'expression du facteur de transcription de type GATA, Pnr par STAT92E dans la ZC est requise pour la différenciation des plasmatoctes (Minakhina et al., 2011). Un autre facteur impliqué dans la différenciation des plasmatoctes est Mtf-1 (« Metal-responsive Transcription Factor 1 »), une protéine conservée contenant des motifs à doigt de zinc (Tan et al., 2012). De plus, une étude plus récente a identifiée Tiggrin (Tig), une protéine de la matrice extracellulaire, comme étant un facteur clé dans la maturation des plasmatoctes de la ZC. En effet, la suppression de Tig entraîne une différenciation prématurée des plasmatoctes alors que sa surexpression inhibe leur maturation, de plus cette étude suggère que la protéine kinase Wee1 impliquée dans la régulation du cycle cellulaire

contrôle la maturation des plasmatoctes en régulant l'expression de Tig (Zhang and Cadigan, 2017).



D'après Letourneau *et al.*, 2016

**Figure 1.16. L'homéostasie de la GL est contrôlée par de nombreux signaux intrinsèques et extrinsèques.**

Avec l'accord de l'éditeur John Wiley and Sons, numéro de licence : 4365930698610.

### 1.2.3.2.3 Contrôle moléculaire de la spécification des cellules à cristaux

La régulation de la différenciation des cellules à cristaux dans la GL est mieux connue. Comme au cours de l'hématopoïèse embryonnaire, le facteur Lz est requis pour la spécification des cellules à cristaux au cours de l'hématopoïèse larvaire (Lebestky et al., 2000). De plus il a été montré que le développement des cellules à cristaux aussi bien dans la



GL qu'en circulation dépend de la voie de signalisation Serrate/Notch (Duvic et al., 2002; Lebestky et al., 2003). En effet, les travaux de Lebestky *et al.* ont montré que l'activation de la voie de signalisation Notch par le ligand Serrate (Ser) agit en amont de Lz pour induire son expression dans les précurseurs de cellules à cristaux. De plus, il a été initialement proposé que le PSC, qui exprime le ligand Ser, agit comme un centre de signalisation nécessaire à la spécification des cellules adjacentes en cellules à cristaux (Lebestky et al., 2003). Cependant ce modèle s'est avéré inexacte puisqu'en absence de PSC (GL Col-mutante), les cellules à cristaux sont encore capables de se différencier, ce qui suggère que ce sont d'autres cellules exprimant également Ser et localisées dans la ZC qui sont responsables du signal induisant le développement des cellules à cristaux (Crozatier et al., 2004). Une étude plus récente appuie ce modèle en montrant que le facteur de transcription Yorkie (Yki) et son partenaire Scalloped (Sd), deux effecteurs de la voie Hippo, induisent l'expression de Ser dans ces cellules de la zone corticale qui activent alors la voie Notch dans les progéniteurs intermédiaires adjacents pour induire leur différenciation en cellules à cristaux (Ferguson and Martinez-Agosto, 2014). Une deuxième étude publiée en parallèle suggère que Yki et Sd contrôlent le développement des cellules à cristaux, à la fois de façon autonome en régulant directement l'expression de Lz mais aussi de façon non-autonome via l'activation de la voie Notch (Milton et al., 2014). De plus, il a été montré que Lz coopère avec l'effecteur transcriptionnel de la voie Notch, Su(H) (« Suppressor of Hairless ») afin d'activer la transcription de certains gènes tels que *hindsight* qui est impliqué dans l'endoréplication des cellules à cristaux ou *klumpfuss* qui réprime le destin alternatif de la cellule (Terriente-Felix et al., 2013). Ainsi, il semblerait que la voie Notch agissent à deux niveaux dans le développement des cellules à cristaux : d'une part elle induit l'expression de Lz et d'autre part elle coopère avec ce dernier pour verrouiller leur destin cellulaire.

En plus de son rôle dans la ZM, la voie de signalisation Wg régule aussi de façon positive la prolifération et le maintien des cellules à cristaux dans la ZC (Sinenko et al., 2009).

La spécification des cellules à cristaux n'est pas uniquement régulée par des facteurs internes à la glande puisque des facteurs systémiques tels que l'hypoxie agissent sur la survie des cellules à cristaux. En cas d'hypoxie, Sima, l'orthologue chez la *Drosophile* de Hif-1 $\alpha$ , active la voie Notch de façon non canonique afin d'augmenter le nombre de cellules à cristaux (Mukherjee et al., 2011). Dans le même sens, le parasitisme par les œufs de guêpes entraîne la

différenciation des lamellocytes aux dépends des cellules à cristaux, alors que la privation nutritive induit la rupture des cellules à cristaux suite à l'activation de la voie JNK (Ferguson and Martinez-Agosto, 2014; Krzemien et al., 2010; Shim et al., 2012). Par ailleurs, deux études successives montrent que la déplétion dans la GL soit de la petite GTPase ARF1 soit de la protéine Asrij, qui est impliquée dans l'endocytose, augmente la différenciation des cellules à cristaux et des plasmatoctes. Il semblerait que ARF1 régule la fonction et l'expression de Asrij, qui elle, régule le trafic intracellulaire de Notch permettant ainsi la restriction du nombre de cellules à cristaux (Khadilkar et al., 2014; Kulkarni et al., 2011).

Enfin, il a été montré que dans les îlots sessiles, les cellules à cristaux étaient produites par transdifférenciation des plasmatoctes suite à l'activation de la voie Ser/Notch (Leitao and Sucena, 2015).

#### 1.2.3.2.4 Contrôle moléculaire de la spécification des lamellocytes

Comme mentionné précédemment, dans des conditions normales, les lamellocytes sont rarement présents dans les larves de *Drosophila*. Cependant, une différenciation massive en lamellocytes peut être observée en réponse à certains challenges immuns tels qu'une infection aux œufs de guêpes *L. bouvardi*. Les voies de signalisation Ras/MAPK, JAK/STAT et Toll sont bien connues pour leur impact sur la prolifération des hémocytes en circulation dans la larve. En effet, des mutations qui activent ces voies de signalisation comme *Ras<sup>V12</sup>*, *hop<sup>Tumorous-lethal</sup>* ou *Toll<sup>10B</sup>*. induisent non seulement une augmentation des hémocytes en circulation, une mobilisation des hémocytes sessiles mais aussi l'apparition de lamellocytes ainsi que la formation de masses mélanotiques (Asha et al., 2003; Evans et al., 2003; Harrison et al., 1995; Luo et al., 1995; Luo et al., 2002; Sorrentino et al., 2004). Zettervall *et al.* ont notamment montré en 2004 que la prolifération et la différenciation des lamellocytes sont deux phénomènes indépendants puisque l'activation de la voie Ras/MAPK induit seulement une prolifération accrue des hémocytes alors que la surexpression de Hopscotch ou Hemipterous, deux kinases des voies de signalisation JAK/STAT et JNK respectivement, conduit à une différenciation massive en lamellocytes sans affecter le nombre total d'hémocytes en circulation (Zettervall et al., 2004). Cependant, les mécanismes qui régulent la différenciation en lamellocytes sont encore mal déterminés. Il est important de noter que la formation des

lamellocytes peut être induite simplement suite à la dérégulation de la différenciation des cellules sanguines mais aussi suite à un dommage tissulaire tel que la rupture de la membrane basale et de l'intégrité cellulaire (Avet-Rochex et al., 2010; Kim and Choe, 2014; Stofanko et al., 2010; Zettervall et al., 2004). De façon intéressante, les travaux de Schmid *et al.* montrent que le phénotype induit par le mutant constitutivement actif du récepteur Toll, *Toll<sup>l0B</sup>*, passe majoritairement par l'activation de la voie Toll dans le corps gras plutôt que dans les hémocytes eux-mêmes, soulignant ainsi la complexité des mécanismes qui régulent la formation des lamellocytes (Schmid et al., 2014).

Néanmoins, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence l'importance de la voie JAK/STAT dans la production des lamellocytes et la réponse immunitaire. En effet, la forme constitutivement activée de la kinase JAK Hopscotch, *hop<sup>Tum-1</sup>* induit une hyperprolifération des hémocytes et une différenciation massive en lamellocytes en circulation et dans les lobes primaires de la GL (Davidson et al., 2005; Harrison et al., 1995; Luo et al., 1995). De plus, la diminution de la capacité d'encapsulation observée dans des larves mutantes perte de fonction de *Hop* et *STAT92E* suggère l'implication de la voie JAK/STAT dans la réponse immunitaire larvaire (Sorrentino et al., 2004). De plus, de récentes études révèlent une régulation complexe de la voie JAK/STAT dans la GL et les autres tissus larvaires en réponse au parasitisme par les œufs de guêpes. En effet, Makki *et al.* ont montré que le récepteur Latran (Lat), qui est une forme tronquée non signalisatrice des récepteurs aux cytokines, est exprimé dans les prohémocytes de la GL et agit comme dominant négatif. Normalement, la voie JAK/STAT est active dans les prohémocytes de la GL mais en cas d'infection par la guêpe *L. Boulardi*, l'hétérodimérisation de Lat avec le récepteur de la voie JAK/STAT Domeless (Dome) combinée avec la diminution simultanée des niveaux de cytokines conduisent à l'extinction de la voie JAK/STAT dans la ZM, un prérequis pour la différenciation des prohémocytes en lamellocytes (Makki et al., 2010). De plus, il a été montré que le parasitisme par les œufs de guêpes active la voie JAK/STAT à la fois dans les muscles somatiques larvaires et dans les hémocytes circulants mais que seule l'activation dans les muscles joue un rôle clé dans la formation des lamellocytes et l'encapsulation des œufs de guêpes (Yang et al., 2015).

D'autre part, l'infection par *L. boulardi* active la voie Toll/NF-κB et induit l'augmentation des radicaux libres ou ROS dans le PSC ce qui conduit à la production de

lamellocytes dans la GL et en circulation (Gueguen et al., 2013; Sinenko et al., 2011). En particulier, l'augmentation des ROS induit la sécrétion du ligand Spitz (Adams et al., 2000) par la petite GTPase Rho1, et active la voie de signalisation à l'EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor ») pour induire la différenciation des hémocytes circulants en lamellocytes (Sinenko et al., 2011).

De plus, bien qu'initialement proposé comme étant nécessaire à la prolifération des lamellocytes, il semblerait que la voie Notch soit plutôt requise dans le PSC afin de réprimer la formation des lamellocytes (Duvic et al., 2002; Small et al., 2014). En effet, l'infection par *L. boulardi* induit une diminution de l'activité de la voie Notch ce qui favorise la formation de lamellocytes dans la ZC aux dépens des cellules à cristaux (Small et al., 2014).

Enfin, il a été montré que l'expression de Col dans le PSC et sa diminution dans les prohémocytes de la ZM est requise pour la différenciation en lamellocytes en réponse au parasitisme (Crozatier et al., 2004; Oyallon et al., 2016). Ainsi, différents signaux qui sont soit relayés par le PSC soit indépendants doivent être intégrés par les prohémocytes de la ZM pour générer une réponse immunitaire efficace.

Pour terminer, un crible génétique récent a permis d'identifier cinq nouveaux gènes : *longitudinals lacking (lola)*, *dFOXO*, *kayak* (DasGupta et al., 2005), *cap-n-collar (cnc)* and *delilah (del)* qui sont requis pour la production de lamellocytes dans des larves parasitées (Tokusumi et al., 2017a). Les gènes de nociception *painless (pain)* et *Piezo* sont impliqués dans la production de lamellocytes dans l'hémolymphe en réponse au parasitisme mais pas dans la GL (Tokusumi et al., 2017b).

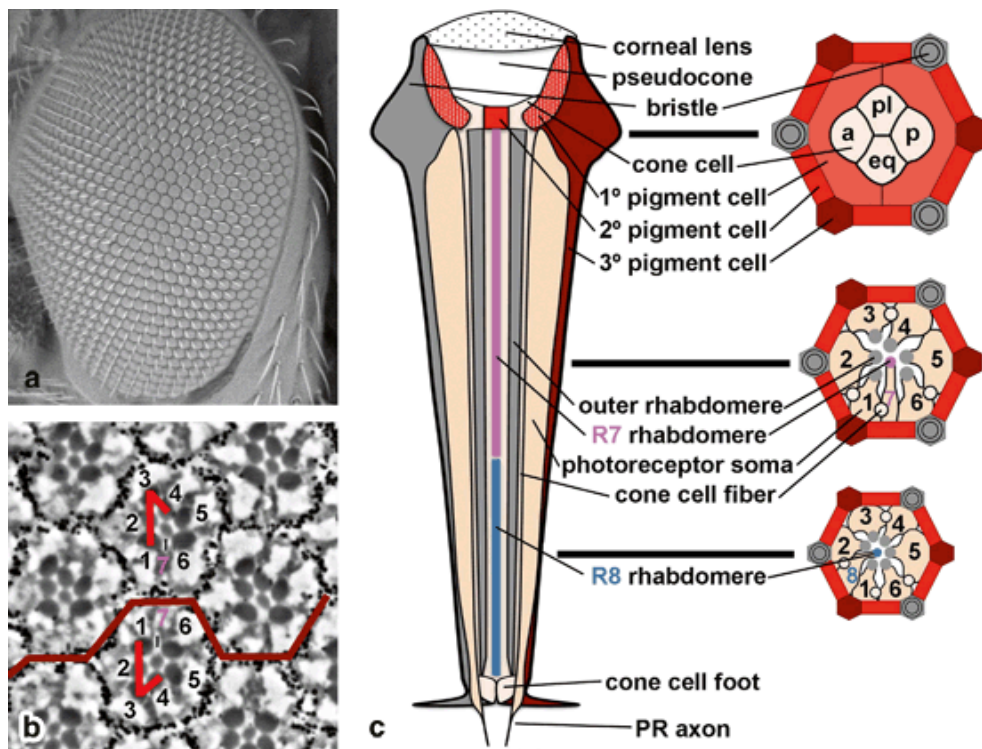
Toutes ces données soulignent la complexité des mécanismes impliqués dans la production de lamellocytes et par conséquent la réponse immunitaire.

#### **1.2.4 L'œil composé de la mouche**

Alors que les parties précédentes abordaient différents aspects de l'hématopoïèse chez la drosophile, la présente section abordera sommairement le développement de l'œil composé chez la drosophile et son utilisation dans l'étude d'interactions génétiques notamment dans les cribles puis s'attardera plus particulièrement sur les différentes techniques de criblages génétiques employées dans l'identification et la caractérisation de nouveaux facteurs.

### 1.2.4.1 Description et formation de l'œil composé

L'œil composé, appelé également œil à facettes de la drosophile adulte, est constitué de 700 à 800 unités structurales identiques qui sont sensibles à la lumière, les ommatidies. Ces dernières forment des facettes hexagonales qui sont placées les unes à côté des autres. Chaque ommatidie contient 8 cellules nerveuses, les photorécepteurs (R1-R8) entourés de cellules accessoires non neurales dont 4 cellules Semper qui forment le cône cristallin et 2 cellules pigmentaires primaires. Elles sont séparées de leurs voisines par un treillis hexagonal imbriqué de cellules pigmentaires secondaires et tertiaires qui bloque le passage de la lumière et également 3 poils mécano-sensoriels (Heberlein and Moses, 1995; Rubin, 1991) (Cf. **figure 1.17**). Cette disposition est incroyablement précise, visant à positionner correctement chaque ommatidie afin de couvrir uniformément le champ visuel. L'œil de la drosophile est un organe non vital facilement observable au stéréomicroscope optique. De nombreuses mutations qui affectent la taille, la forme ou encore la régularité de l'œil ont permis d'identifier les mécanismes de sa morphogénèse.



D'après Curtiss, 2013

**Figure 1.17. La structure de l'œil composé de la drosophile**

(a) Œil adulte observé au microscope électronique à balayage. (b) Section tangentielle de l'œil prise au niveau du récepteur R7. La ligne rouge marque l'axe équatorial dorso-ventral. Les nombres désignent les corps des photorécepteurs visibles. Les rhadomères des photorécepteurs R1 à R6 forment un trapèze avec au centre le rhadomère R7. Les flèches rouges représentent l'orientation des ommatidies dans la partie dorsale versus ventrale. (c) Représentation des sections longitudinales (à gauche) et tangentielles (à droite aux niveaux indiqués) d'une ommatidie dorsale. « a » pour antérieur, « p » pour postérieur, « pl » pour polaire et « eq » pour équatorial représentent la position des 4 cellules qui forment le cône cristallin. La partie antérieure pointe vers la gauche et la région dorsale vers le haut. Avec l'accord de l'éditeur Springer Nature, numéro de licence : 4386591430447.

Comme tous les tissus de la drosophile adulte, l'œil se développe à partir d'un disque imaginal, le disque imaginal œil-antenne, qui est un épithélium de cellules indifférenciées formé au stade larvaire, à partir de 6 cellules spécifiées très tôt au cours de l'embryogénèse à travers l'expression du facteur de transcription *eyeless* (*ey*) (Halder et al., 1995). La morphogénèse du disque imaginal œil-antenne commence au stade larvaire L3 où la constriction apicale et la contraction apico-basale des cellules provoquent l'apparition d'un renforcement au niveau de la marge postérieure, le sillon morphogénétique (SM). Le SM qui s'étend des marges dorsale à ventrale, balaie ensuite l'ensemble du disque de la partie postérieure vers la partie antérieure, laissant derrière lui des photorécepteurs différenciés (Heberlein and Moses, 1995). En avant du SM, les cellules indifférenciées prolifèrent alors que juste en avant (dans le présillon) et dans le SM, les cellules se synchronisent en phase G1 (Thomas et al., 1994). La différenciation s'amorce dans le SM et se poursuit au fur et à mesure qu'il progresse. Ainsi, plus les cellules sont postérieures au SM, plus leur stade de différenciation est avancé. Juste en arrière du sillon des cellules se divisent une dernière fois de façon synchrone et forment la seconde vague mitotique (Wolff and Ready, 1991). Au stade pupal, le disque imaginal de l'œil subit des changements morphologiques importants afin d'acquérir sa forme finale et développer ses capacités de détection de la lumière. De nombreux facteurs et voies de signalisation sont impliqués dans la formation de l'œil. Notamment, les voies de signalisation BMP, Hedgehog et EGFR qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de la différenciation des photorécepteurs et la formation des ommatidies. L'architecture et le développement complexe de l'œil composé en ont fait un des organes les plus étudiés chez la drosophile (Cagan, 2009).

### 1.2.4.2 Mécanismes moléculaires régulant le développement de l'œil

Dans le primordium de l'œil, la spécification du tissu est gouvernée par un ensemble de facteurs de transcription qui interagissent entre eux et avec de nombreux autres facteurs. Parmi les facteurs clés dans l'établissement de l'œil, on retrouve les gènes Pax6 *ey* (Quiring et al., 1994) et *twin of eyeless (toy)* (Czerny et al., 1999), les membres de la famille Six *sine oculis (so)* (Cheyette et al., 1994) et *optix* (Seimiya and Gehring, 2000), le coactivateur transcriptionnel *eyes absent (eya)* (Bonini et al., 1993) et *dachsund (dac)* (Fukuda et al., 1997) (Fukuda et al., 1997; Mardon et al., 1994). Ces gènes forment un réseau complexe d'interactions génétiques, moléculaires et biochimiques qui contrôle le développement de la rétine.

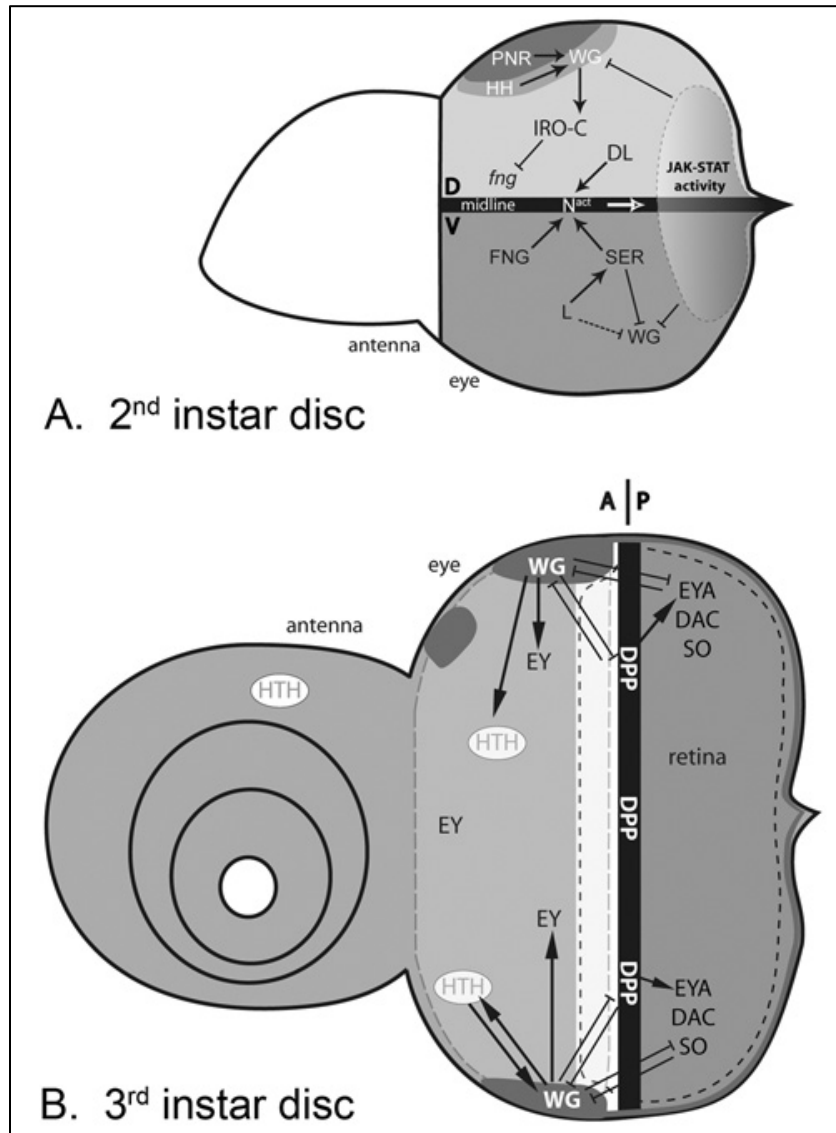
Au cours du premier stade larvaire, l'axe dorso-ventral est établi au niveau de l'équateur du disque œil-antenne (Maurel-Zaffran and Treisman, 2000; Singh et al., 2005). Les facteurs du complexe Iroquois (*Iro-C*) et *Slp1/2* sont exprimés respectivement dans les parties dorsales et ventrales (McNeill et al., 1997; Sato and Tomlinson, 2007), ce qui restreint l'expression de *fringe (fng)* seulement dans les cellules ventrales (Cho and Choi, 1998). Chez la drosophile, les ligands du récepteur Notch (N) sont Delta (Dl) et Serrate (Ser) (de Celis et al., 1993; Koo et al., 1993). Dans l'œil, *fng* et *Lobe (L)* induisent sélectivement l'expression de *Ser* dans la partie ventrale alors que le ligand Dl est restreint à la partie dorsale (Chern and Choi, 2002; Cho et al., 2000; Cho and Choi, 1998). Ainsi l'activation de la voie Notch est maximale au niveau de la frontière dorso-ventrale ce qui promeut la croissance de l'œil. Il semblerait que Wingless (Wg), dont l'expression est restreinte dans la partie dorsale des marges antérieures par le facteur de transcription Pnr, soit requis pour l'établissement de l'axe dorso-ventral (Maurel-Zaffran and Treisman, 2000). En effet, il promeut l'expression des gènes *Iro-C* dans la partie dorsale (Cavodeassi et al., 1999) (Cf. **figure 1.18A**).

De plus, avant l'initiation du SM, l'expression de Wg est inhibée au niveau de la marge postérieure du disque par les voies JAK/STAT et Dpp (Chanut and Heberlein, 1997; Dominguez and Hafen, 1997; Tsai et al., 2007) (Cf. **figure 1.18**). Les activités concurrentes des voies de signalisation JAK/STAT, Dpp et Wg résultent en l'activation de la voie Hh à l'intersection de la marge postérieure avec l'équateur qui correspond au point d'initiation du

SM (Dominguez and Hafen, 1997; Ma et al., 1993). Les trois facteurs de transcription à doigts de zinc Odd skipped (Odd), Bowl et Drumstick (Drm) sont exprimés le long de la marge postérieure où ils sont responsables de l'initiation de la transcription de Hedgehog (Kocks et al., 2005). Et il semblerait que Wg prévient la formation de sillons ectopiques en inhibant *odd/drm/bowl* et donc finalement l'activation de *Hh* (Bras-Pereira et al., 2006).

En effet, Hh est un élément clé dans l'initiation et la progression du SM (Heberlein et al., 1995; Heberlein et al., 1993; Ma et al., 1993). Hh est exprimé dans la marge postérieure du disque avant l'initiation du SM et induit la différenciation des cellules antérieures. Alors qu'elles se différencient en photorécepteurs, elles commencent à exprimer à leur tour Hh et peuvent alors agir sur des cellules antérieures (Heberlein and Moses, 1995). Une des cibles de la voie Hh est Dpp, un membre de la famille BMP, qui fonctionne de manière redondante avec Hh dans la progression du SM (Curtiss and Mlodzik, 2000; Heberlein et al., 1993). Le facteur de transcription Atonal (Ato) est une autre de ses cibles, qui est requis pour la spécification des photorécepteurs R8, les premiers à se différencier dans chaque ommatidie. Ils orchestrent par la suite la différenciation des autres photorécepteurs et cellules qui constituent l'ommatidie suite à la sécrétion du ligand Spitz (Adams et al., 2000) qui active le récepteur de type EGFR (« epidermal growth factor receptor ») (Freeman, 1996; Miller and Cagan, 1998).





D'après Legent and Treisman, 2008

**Figure 1.18. Représentation schématique du disque imaginal œil-antenne au stade larvaire L2 (A) et L3 (B)**

Les interactions génétiques dépendantes de Wingless (Wg) gouvernent la compartimentalisation dorso-ventrale (A) et la formation de la rétine (B). La partie antérieure pointe vers la gauche et la région dorsale vers le haut. (B) Au stade larvaire L3, l'expression de Wg est restreinte dans une petite zone des marges antérieures dorsale et ventrale ainsi que dans une mince bande le long de la marge postérieure. La ligne en pointillé grise représente le domaine d'expression du facteur EY alors que la ligne en pointillé noire correspond au domaine d'expression des facteurs EYA, SO et DAC. Il est à noter que l'expression de DAC ne s'étend pas jusqu'au niveau des marges dans la partie postérieure comme c'est le cas pour EYA et SO. Avec l'accord de l'éditeur Springer Nature, numéro de licence : 4386620266202.

### **1.2.4.3 Outil pour réaliser des cribles génétiques**

En 1980, Christiane Nüsslein-Volhard et Eric F. Wieschaus vont révolutionner le monde de la génétique en réalisant le premier crible à large échelle, le crible Heidelberg, qui consistait à identifier les gènes impliqués dans la segmentation de l'embryon de drosophile (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). D'ailleurs, leurs découvertes sur le contrôle génétique du développement précoce de l'embryon, leur valurent en 1995, le prix Nobel de médecine conjointement avec Edward B. Lewis. Par la suite, l'œil de la drosophile sera perçu comme un excellent modèle employé pour le criblage génétique et l'étude d'interactions génétiques (Thomas and Wassarman, 1999). Plusieurs raisons expliquent cet engouement pour l'utilisation de l'œil composé. D'une part, il semblerait que les deux tiers des gènes essentiels chez la drosophile soient requis pour le développement de l'œil (Thaker and Kankel, 1992). Bien qu'une partie de ces gènes soient spécifiques au développement de l'œil, un grand nombre d'entre eux sont impliqués dans des processus cellulaires plus généraux (Thomas and Wassarman, 1999). Une majeure partie des voies de signalisation impliquée dans le développement de l'œil sont donc aussi requise dans d'autres tissus. D'autre part, l'œil composé est dispensable pour la viabilité et la fertilité de la drosophile et de part sa structure ordonnée de façon très précise, même un défaut subtil qui altère la géométrie d'une seule ommatidie induit un phénotype morphologique qui est observable au stéréomicroscope. Pour toutes ces raisons, l'œil de la drosophile a été étudié de façon extensive au cours des 30 dernières années et a joué un rôle majeur dans l'identification et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent le développement comme la prolifération et la différenciation des cellules, l'apoptose, la formation des tissus. Ces progrès ont en grande partie été réalisés à travers différents types de cribles génétiques, qui auront permis à ce jour, de relier de nombreux gènes à une large gamme de processus biologiques (Ashburner, 1989; Bier, 2005; St Johnston, 2002).

A l'heure actuelle, les stratégies de criblage suivent deux approches : la génétique directe ou classique et la génétique inverse. Toutefois, dans les deux cas, ils ont pour but commun d'identifier et de déterminer la fonction d'un ou plusieurs gènes.

### 1.2.4.3.1 Crible génétique classique ou « forward genetics »

Les techniques de criblage génétique directe ou dites de « forward genetics » consistent à identifier la cause génétique responsable d'un phénotype. Typiquement, un grand nombre de mutants est généré aléatoirement et ceux qui produisent le ou les phénotype(s) recherché(s) sont sélectionnés puis le gène responsable du phénotype est identifié. Parmi les techniques de criblage génétique directes, on compte le crible traditionnel, le crible modificateur ou encore le crible mosaïque ou de clones mitotiques, qui sont utilisés dans des contextes différents avec des objectifs qui leur sont propres et qui seront abordés ici.

#### 1.2.4.3.1.1 Crible traditionnel

La première étape du criblage traditionnel consiste à générer aléatoirement un grand nombre de mutants à l'aide d'agents mutagènes tels que la radiation aux rayons X, l'utilisation d'agents chimiques tels que l'éthylméthane sulfonate (EMS) ou encore des techniques de génétique comme l'insertion aléatoire de transposons qui viennent perturber la fonction du gène (St Johnston, 2002). Deux classes de mutations sont alors générées : des mutations qui sont soit des gains de fonction soit des pertes de fonction. Dans les deux cas, les mutations responsables du phénotype recherché sont isolées. La deuxième étape du criblage consiste à identifier le gène responsable de ce phénotype. Pour ce faire, des tests de complémentation sont effectués afin de regrouper toutes les mutations qui affectent le même gène, et la région chromosomique où sont situées les mutations est ensuite déterminée afin de permettre l'identification de gènes candidats, communément appelé le *mapping* ou cartographie. Généralement, les gènes sont cartographiés par tests de complémentation contre une collection de délétions chromosomiques connues qui couvre le génome au complet. D'ailleurs, un ensemble de délétions pour chaque chromosome ou « deficiency kit » est disponible chez Bloomington (Cook et al., 2010). Une autre approche plus ancienne est la cartographie par recombinaison génétique avec des marqueurs visibles (Greenspan, 1997; Sapiro et al., 2013). Avec ces méthodes, l'identification des gènes mutés est souvent un travail de longue haleine mais avec les techniques de séquençage à haut débit dont le coût devient plus abordable, il est maintenant possible de contourner les techniques de génétique classiques afin d'identifier plus rapidement et plus facilement les lésions génétiques (Schneeberger, 2014).

#### 1.2.4.3.1.2 Crible modificateur dominant

Le crible modificateur dominant (« dominant modifier screen ») est une approche particulièrement utilisée pour l'identification de nouveaux facteurs d'une voie de signalisation donnée, qui sont plus difficilement trouvés dans un crible traditionnel. Comme son nom l'indique, ce type de crible consiste à identifier des mutations hétérozygotes qui modifient de façon dominante un phénotype de départ connu. Il est important de noter toutefois que ces mutations hétérozygotes ne provoquent pas de phénotype lorsque testées en absence du phénotype de départ. Donc, ces mutations sont dites dominantes seulement dans le contexte du phénotype de départ pour lequel elles ont été isolées. En effet, dans la majorité des cas, les mutations « perte-de-fonction » d'une seule copie d'un gène ne sont pas suffisantes pour perturber de façon visible son activité. Cependant, si le processus biologique dans lequel est impliqué ce gène est déjà partiellement affectée par une première mutation (ou expression d'un transgène provoquant un phénotype), il y a plus de chances que des mutations dans ce gène soient identifiées. Ainsi, dans ce type de crible, seules des mutations hétérozygotes capables de perturber le phénotype de départ peuvent être identifiées. Ces mutations sont qualifiées d'amplificatrices (« enhancers ») si elles rendent le phénotype de départ plus sévère, et au contraire de suppressives (« suppressors ») si elles l'atténuent. Un des exemples de crible modificateur les plus importants est celui qui a permis l'identification des composants de la voie de signalisation en aval de Sevenless (Sev), un récepteur à domaine tyrosine kinase (RTK) qui contrôle la différenciation des photorécepteurs R7 de la rétine de drosophile (Simon, 1994). Cette technique de criblage a permis l'identification de nombreux facteurs des différentes voies de signalisation connues à ce jour, entre autre de la voie Ras/MAPK (Karim et al., 1996; Rebay et al., 2000; Therrien et al., 2000), de la voie BMP/Dpp (Chen et al., 1998; Su et al., 2001) ou encore de la voie Notch (Go and Artavanis-Tsakonas, 1998; Mahoney et al., 2006; Xu et al., 1990).

#### 1.2.4.3.1.3 Crible de clones mitotiques (*clonal screen*)

Le crible de clones mitotiques consiste à analyser les clones dans lesquels les cellules sont homozygotes pour le chromosome mutagénisé alors que le reste de l'organisme est hétérozygote. Les rayons X étaient anciennement utilisés pour générer ces clones puisqu'ils

induisent une recombinaison mitotique entre deux chromosomes homologues. Cette technique était alors utilisée avec succès pour réaliser des cribles génétiques de mutations liées au chromosome X, qui donnent un phénotype dans des clones de la lignée germinale. Plus récemment, le système de recombinaison dirigée est devenu une technique de choix bien plus efficace permettant de générer des clones dans 90% des mouches et de cibler un tissu en particulier. Cette technique utilise les propriétés de la recombinase Flp codée par le plasmide 2 $\mu$  de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui reconnaît une séquence cible sur l'ADN appelé sites FRT, sites qui ont été insérés dans le génome de la drosophile. Ainsi, le système Flp/FRT permet la recombinaison entre deux sites cibles FRT suite à l'induction de l'expression de la Flp (Golic and Lindquist, 1989; Xu and Rubin, 1993). Afin de pouvoir identifier des mutations qui seraient létales au stade embryonnaire précoce, l'expression de la Flp peut être mise sous le contrôle d'un promoteur inductible à la chaleur permettant ainsi son expression directement dans les disques imaginaux au stade larvaire. D'ailleurs le premier crible Flp/FRT a utilisé cette approche afin d'identifier des mutations induisant une prolifération excessive des disques imaginaux et a permis l'identification du gène suppresseur de tumeur *warts* (*wts*, *lats* chez les mammifères), qui encode une kinase de la voie de signalisation Hippo (Xu et al., 1995). De plus, il est possible de restreindre l'expression de la Flp à un tissu spécifique puisqu'il suffit que la recombinase Flp soit sous le contrôle d'un promoteur qui ne s'exprime que dans ce tissu. Le système UAS-Gal4 permet de cibler l'expression d'un gène dans un tissu spécifique (Brand and Perrimon, 1993). Ainsi, des lignées *UAS-FLP* ont été générées pour pouvoir cibler l'expression de la Flp avec n'importe quel promoteur Gal4. La combinaison des systèmes Flp/FRT et UAS-Gal4 a permis de générer des cribles génétiques de clones mitotiques dans différents tissus comme les cellules folliculaires ou l'œil composé (Duffy et al., 1998; Liu and Montell, 1999; Newsome et al., 2000).

Chou et Perrimon ont ingénieusement raffiné le système Flp/FRT pour faciliter la sélection de clones mutants de la lignée germinale et l'ont nommée la technique DFS (« Dominant Female Sterile »). Elle consiste à utiliser la mutation *ovo<sup>D</sup>* qui cause la mort des cellules germinales femelles durant l'ovogénèse permettant ainsi d'éliminer les cellules non recombinées dans un crible Flp/FRT pour des mutations de la lignée germinale (Chou and Perrimon, 1996).

#### **1.2.4.3.2 Crible génétique inverse ou « reverse genetics »**

Contrairement au criblage génétique classique (une méthode de « forward genetics ») qui consiste à identifier un gène inconnu responsable d'un phénotype donné, le criblage génétique inverse (« reverse genetics ») est une technique qui utilise comme point de départ un gène dont la séquence est généralement connue, pour ensuite l'associer à un phénotype. Les approches de génétiques indirectes impliquent une perturbation de l'activité du gène afin de visualiser son effet sur le phénotype. En général, il s'agit d'une diminution voire d'une extinction complète de l'expression du gène par des techniques comme l'interférence ARN ou l'édition du génome.

##### **1.2.4.3.2.1 Crible génétique par ARN interférant**

L'interférence ARN ou ARNi est un mécanisme de régulation de l'expression post-transcriptionnelle des gènes, induit par des ARN double brin (ARNdb), qui entraînent la dégradation d'ARNm cibles. Fire et Mello ont obtenu le prix Nobel de médecine en 2006 pour leur travaux publiés en 1998 qui établissent les bases de la technique d'ARNi chez le vers nématode *C. elegans* (Fire et al., 1998). Peu de temps après, cette technique fût introduite chez la drosophile où elle s'est avérée être un outil puissant pour analyser la fonction des gènes (Kennerdell and Carthew, 1998; Misquitta and Paterson, 1999). Une fois dans le cytoplasme, l'ARNdb est coupé en petits fragments d'ARN interférants de 20 à 25 nucléotides (« siRNAs »), qui agissent sous forme simple brin pour s'hybrider à la séquence d'ARN messenger (ARNm) cible pour conduire soit à sa dégradation ou soit à la répression de sa traduction (Heigwer et al., 2018). Chez la drosophile, il est possible d'introduire les ARNdb de différentes façons. La méthode la plus simple est de travailler avec des cellules en culture où les ARNdb sont ajoutés directement dans le milieu de culture (Clemens et al., 2000). Toutefois, il est également possible d'utiliser l'ARNi dans l'organisme soit par microinjection des ARNdb dans l'embryon soit en utilisant le système d'expression binaire UAS/Gal4 (Kennerdell and Carthew, 2000). L'avantage du système d'expression est de pouvoir étudier la fonction d'un gène dans des tissus spécifiques et dans différentes phases du développement. Avec la connaissance du génome de drosophile, de nombreuses collections d'ARNdb et de lignées transgéniques UAS-ARNi couvrant la majorité du génome ont pu voir le jour (Boutros

et al., 2004; Dietzl et al., 2007; Ni et al., 2011). Ainsi, l'ARNi est devenu au cours des dernières années un outil de choix pour réaliser des cribles génétiques à haut débit afin de caractériser simultanément la fonction de plusieurs gènes et ce aussi bien dans des cellules en culture que dans des organismes modèles.

Toutefois, cette technique présente également quelques désavantages. Entre autre, l'ARNi n'induit pas l'équivalent d'une perte de fonction complète du gène ciblé (Perkins et al., 2015), or, dans certains cas, l'expression résiduelle du gène peut être suffisante pour remplir sa fonction. De plus, l'ARNi peut causer des effets de déplétion non spécifiques (dits « off-target effects ») menant à l'identification de résultats faux positifs.

#### **1.2.4.3.2.2 Crible génétique par édition du génome (« genome editing »)**

L'édition du génome est une technique de génie génétique qui repose sur l'utilisation d'endonucléases de restriction pour modifier de façon spécifique le génome. Les nucléases ou « ciseaux moléculaires » sont utilisées pour couper l'ADN double brin à un endroit ciblé afin d'insérer, remplacer ou encore enlever un fragment d'ADN. Le bris double brin est ensuite réparé par recombinaison homologue ou par la jonction d'extrémités non homologues (Maeder and Gersbach, 2016; Takata et al., 1998). Différentes nucléases ont été créées artificiellement en fusionnant des domaines de liaison à l'ADN optimisés pour reconnaître une séquence d'ADN cible avec le site catalytique de nucléases. Les nucléases à doigt de zinc (« ZFN, Zinc Finger Nucleases ») ou encore les nucléases effectrices de type activateur de transcription (« TALEN, Transcription Activator-Like Effector Nucleases ») en sont des exemples et ont été utilisées avec succès chez la drosophile (Beumer and Carroll, 2014; Gaj et al., 2013). Cependant, l'arrivée du système CRISPR/Cas9 a complètement révolutionné le domaine du génie génétique et est monté très rapidement en popularité de part sa simplicité et son coût plus abordable. Le système CRISPR/Cas9 (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat ») de type II provient de la bactérie *Streptococcus pyogenes* où il sert de mécanisme de défense contre les virus ou ADN exogène en combinant l'activité d'une endonucléase avec un ARN guide (gARN). La modification de cet ARN guide permet de pouvoir cibler n'importe quel gène d'intérêt où l'endonucléase va aller induire un bris double

brin. La réparation de ce bris par jonction d'extrémités non homologues entrave le gène ciblé en créant des insertions ou délétions alors que la réparation par recombinaison homologue permet de modifier de façon précise la séquence de ce gène (Bassett and Liu, 2014; Gratz et al., 2013). Contrairement à l'effet des ARNi qui est transitoire, les transformations induites dans le génome sont stables et peuvent être transmises aux générations suivantes.

Grâce à l'optimisation du système CRISPR/Cas9 pour son utilisation chez la drosophile, il est maintenant rendu possible de générer tout type de mutations allant de la mutation nulle au gain de fonction, dans les quelques 14 700 gènes annotés de son génome (Gratz et al., 2015; Kane et al., 2017). D'ailleurs, différents laboratoires combinent actuellement leurs efforts afin de générer une collection de gARNs permettant de perturber la fonction des gènes *in vivo*. Au-delà, de son utilité pour générer des mutations perte de fonction, la technique de CRISPR/Cas9 peut également être utilisée d'une myriade de façon pour adresser différentes questions de biologie fondamentale (Bier et al., 2018). Une avancée spectaculaire dans le domaine du génie génétique!

Les techniques de génétiques directes et inverses sont deux approches complémentaires, l'une s'avère sans nul doute être très efficace pour l'identification de nouveaux facteurs alors que l'autre permet de déterminer efficacement la fonction de ces facteurs. Chaque technique de criblage présente ses propres forces et faiblesses et les outils génétiques sont en constante évolution afin de rendre ces techniques toujours plus efficaces et surmonter leurs faiblesses. Prenons des exemples de limitations de la génétique directe qui sont entre autres l'évaluation du phénotype de manière qualitative ou encore les difficultés de couvrir le génome de façon systématique. Pour ce qui est de l'évaluation du phénotype, des techniques d'évaluation qualitatives ont été mises au point afin d'éviter d'éventuels biais dus à une interprétation subjective mais aussi de faciliter l'analyse des phénotypes (Iyer et al., 2016). Ensuite, les agents mutagènes n'agissent pas tout à fait de manière aléatoire mais concentrent plutôt leurs effets sur des régions particulières de l'ADN induisant un biais mutationnel envers certains gènes (Bentley et al., 2000; Spradling et al., 1999; St Johnston, 2002). Cependant, avec les techniques de génie génétique et le génome séquencé, il est maintenant possible de générer des mutations de façon systématique dans tout le génome.



### 1.2.5 Le modèle AML1-ETO chez la drosophile

La translocation t(8 ; 21) (q22 ; q22), associée à environ 15 % des LMA, affecte le gène *RUNX1/AML1*, un facteur essentiel à la formation et à la différenciation des CSH. Cette translocation génère la protéine de fusion AML1-ETO qui contient la partie amino-terminale de AML1 fusionnée à la protéine nucléaire ETO quasiment dans son entièreté. Il a été proposé qu'AML1-ETO agit principalement en réprimant constitutivement les gènes cibles d'AML1. L'expression d'AML1-ETO dans des modèles cellulaires et chez la souris promeut la production excessive de progéniteurs hématopoïétiques et inhibe la différenciation myéloïde (Elagib and Goldfarb, 2007). Afin d'identifier les facteurs qui modulent l'activité de AML1-ETO, deux groupes ont développé en parallèle un modèle hétérologue d'étude chez la drosophile, qu'ils ont utilisé par la suite pour conduire des cribles génétiques.

L'équipe du Dr. Waltzer, à Toulouse, a utilisé le système d'expression binaire UAS/Gal4 sous le contrôle des séquences régulatrices du facteur de type RUNX, *Lz*, pour exprimer la fusion humaine AML1-ETO dans les hémocytes de la drosophile. Ils montrent alors que l'expression d'AML1-ETO induit un phénotype préleucémique caractérisé par l'inhibition de la différenciation en cellules à cristaux et l'accumulation en circulation de progéniteurs *Lz*<sup>+</sup> au stade larvaire (Osman et al., 2009). Ces mouches n'atteignent pas le stade adulte et meurent toutes au stade pupal. Ils ont donc utilisé ce phénotype pour cribler environ 1 500 gènes ciblés par interférence de l'ARN et ont identifié une dizaine de suppresseurs de la létalité induits par AML1-ETO dont une calpaïne, *calpainB* (*calpB*) qui est une protéase dépendante du Ca<sup>2+</sup>. Ils confirment par la suite que la diminution des niveaux de *calpB* par ARNdb restaure le phénotype induit par AML1-ETO au stade larvaire et diminue les niveaux d'expression d'AML1-ETO. De plus, ils montrent que l'inhibition des calpaïnes réduit fortement la croissance et la clonogénicité de cellules dérivées d'un patient atteint d'une LMA avec la translocation t(8 ; 21) (q22 ; q22) en plus de diminuer les niveaux d'expression d'AML1-ETO. Cette étude suggère que les calpaïnes stabilisent AML1-ETO et par conséquent contribue à son activité oncogénique (Osman et al., 2009). Le gène *pontin/RUVBL1* a également été identifié comme suppresseur de l'activité de AML1-ETO. Pontine et son partenaire reptine/RUVBL2 sont des protéines conservées de la famille AAA<sup>+</sup> (« adenosine triphosphatase associated with diverse cellular activities ») impliquées dans des

complexes de remodelage de la chromatine. Breig *et al.* montrent qu'AML1-ETO active l'expression de PONTIN et REPTIN qui semblent impliquer dans la progression du cycle cellulaire dans les cellules leucémiques humaines exprimant AML1-ETO. Leur travaux suggèrent que la surexpression de PONTIN participe à l'activité oncogénique d'AML1-ETO (Breig et al., 2014).

L'équipe du Dr. Banerjee, à Los Angeles, a exprimé la protéine de fusion humaine AML1-ETO dans les précurseurs hématopoïétiques chez la drosophile en utilisant le système UAS-Gal4 sous le contrôle des séquences promotrices d'*hemolectine (hml)*, un facteur exprimé à la fin de l'embryogenèse et dans tous les stades larvaires dans les hémocytes circulants et la majorité des précurseurs. Ils montrent qu'AML1-ETO induit la prolifération des hémocytes circulants due à une augmentation de précurseurs immatures qui n'expriment aucun marqueur de différenciation dans les larves. Ils remarquent aussi que les hémocytes sont plus petits et adoptent une forme plus ronde que les hémocytes de type sauvage. AML1-ETO induit l'expression de *Wg* et la formation de ROS. Après avoir confirmé que le phénotype observé chez la drosophile était bien spécifique et que les caractéristiques essentielles de la protéine en tant que facteur de transcription étaient conservées, ils ont utilisé ce modèle pour réaliser un crible génétique modificateur dominant avec 231 délétions. Ils ont identifié la voie de signalisation à l'ecdysone comme modulateur de l'activité d'AML1-ETO. L'inactivation de l'isoforme B1 du récepteur à l'ecdysone (*EcR-B1*) ou de *Foxo* ou encore de sa cible directe *SOD2* (« *superoxide dismutase-2* ») supprime le phénotype induit par AML1-ETO en diminuant la quantité de ROS (Sinenko et al., 2010).

Ces études démontrent que la drosophile s'avère être un outil complémentaire aux modèles développés chez la souris dans l'identification de gènes dont les homologues humains régulent l'activité de protéines de fusion telles qu'AML1-ETO dans les leucémies.

## **1.3 Objectifs de la thèse**

### **1.3.1 Problématique**

Comme mentionné dans l'introduction, bien que la survie globale des patients atteints de LMA se soit améliorée, elle reste d'à peine 30 % après 5 ans post-traitement et le pronostic vital reste très défavorable chez les patients plus âgés. De plus, les LMA sont des maladies très hétérogènes sur le plan biologique d'où la nécessité de thérapies ciblées. Cependant, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques nécessite en premier lieu une compréhension plus approfondie de la pathogenèse des LMA au niveau moléculaire. Mon projet de recherche s'inscrivait dans ce cadre. Bien que la translocation NA9 soit rare dans les LMA, elle reste associée à un pronostic très défavorable et est utilisée comme prototype dans la compréhension moléculaire des fusions oncogéniques impliquant à la fois la nucléoporine NUP98 et les protéines HOX. HOXA9 étant d'un intérêt tout particulier puisqu'elle est dérégulée dans plus de 50 % des LMA (Collins and Hess, 2016a, b).

### **1.3.2 Hypothèses**

Les protéines NUP98 et HOXA9 étant conservées chez la drosophile, nous avons émis l'hypothèse que cet organisme pourrait être un outil d'intérêt dans la compréhension moléculaire de l'activité de la fusion NA9.

### **1.3.3 Objectif général**

Similairement aux modèles hétérologues AML1-ETO présentés dans la dernière partie de l'introduction, l'objectif général de ce projet était de développer un modèle hétérologue chez la drosophile exprimant l'oncoprotéine humaine NA9 et par la suite d'utiliser ce modèle comme base pour générer un crible génétique qui permettrait l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans l'activité oncogénique de NA9.

### **1.3.4 Objectifs spécifiques**

*Objectif 1* : Développer et caractériser un modèle hétérologue NA9 dans le système hématopoïétique de la mouche (Chapitre 2)

*Objectif 2* : Développer et caractériser un modèle hétérologue exprimant NA9 dans l'œil de la mouche (Chapitre 3)

*Objectif 3* : Identifier et caractériser de nouveaux facteurs impliqués dans l'activité oncogénique de NA9 à travers un crible génétique modificateur dominant dans l'œil de la mouche (Chapitre 3)

## 2 Human NUP98-HOXA9 promotes hyperplastic growth of hematopoietic tissues in *Drosophila*

Caroline Baril<sup>1,\*</sup>, Gwenaëlle Gavory<sup>1,\*</sup>, Gawa Bidla<sup>1,\*</sup>, Helene Knævelsrud<sup>1</sup>, Guy Sauvageau<sup>1,2</sup>, and Marc Therrien<sup>1,3,§</sup>

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer

Université de Montréal. C.P. 6128, Succursale Centre-Ville. Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>2</sup>Département de médecine, Université de Montréal

<sup>3</sup>Département de pathologie et de biologie cellulaire, Université de Montréal

\*These authors contributed equally to this work

§To whom correspondence should be addressed

Tel.: (514) 343-7837

Fax.: (514) 343-6843

Email : [marc.therrien@umontreal.ca](mailto:marc.therrien@umontreal.ca)

Running title: NUP98-HOXA9 induces leukemia-like phenotypes in *Drosophila*.

Published in *Developmental biology* in January 2017

Baril, C., Gavory, G., Bidla, G., Knaevelsrud, H., Sauvageau, G., and Therrien, M. (2017). Human NUP98-HOXA9 promotes hyperplastic growth of hematopoietic tissues in *Drosophila*. *Developmental biology* 421, 16-26.

L'objectif du projet était d'utiliser la drosophile afin d'étudier l'activité de la fusion humaine NA9 au niveau fonctionnel. Dans cet article, nous présentons la caractérisation du phénotype induit par l'expression de la fusion humaine NA9 au cours de l'hématopoïèse larvaire.

### **Contribution détaillée de l'auteur :**

Contributions expérimentales : La plupart des expériences ont été réalisées conjointement avec CB. Production de l'ensemble des données de qPCR.

Contribution au manuscrit : Élaboration du manuscrit, rédaction de certaines sections du matériel et méthodes, commentaires et suggestions sur l'article. Montage des figures.

### **Contributions détaillées des co-auteurs :**

Le projet a initialement été élaboré par GB, GS et MT. GB a fait l'observation initiale du phénotype d'hyperplasie de la GL induit par NA9. CB a rédigé en grande partie le manuscrit. HK a produit les données de quantification du nombre d'hémocytes circulants dans la figure S3 (G-H). CB a conçu et produit les données expérimentales sur l'essai de phagocytose (figure S4). GB et HK ont donné leurs commentaires sur l'article et suggéré des modifications. MT a contribué à la fois à l'élaboration et à la supervision des travaux de recherche ainsi qu'à la rédaction de l'article.

## 2.1 Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a complex malignancy with poor prognosis. Several genetic lesions can lead to the disease. One of these corresponds to the *NUP98-HOXA9* (*NA9*) translocation that fuses sequences encoding the N-terminal part of NUP98 to those encoding the DNA-binding domain of HOXA9. Despite several studies, the mechanism underlying NA9 ability to induce leukemia is still unclear. To bridge this gap, we sought to functionally dissect NA9 activity using *Drosophila*. For this, we generated transgenic NA9 fly lines and expressed the oncoprotein during larval hematopoiesis. This markedly enhanced cell proliferation and tissue growth, but did not alter cell fate specification. Moreover, reminiscent to NA9 activity in mammals, strong cooperation was observed between NA9 and the MEIS homolog HTH. Genetic characterization of NA9-induced phenotypes suggested interference with PVR (Flt1-4 RTK homolog) signaling, which is similar to functional interactions observed in mammals between Flt3 and HOXA9 in leukemia. Finally, NA9 expression was also found to induce non-cell autonomous effects, raising the possibility that its leukemia-inducing activity also relies on this property. Together, our work suggests that NA9 ability to induce blood cell expansion is evolutionarily conserved. The amenability of NA9 activity to a genetically-tractable system should facilitate unraveling its molecular underpinnings.

## 2.2 Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is one of the most prevalent and lethal forms of leukemia (Grimwade et al., 2016). It is a remarkably complex malignancy with large phenotypic heterogeneity (Ferrara and Schiffer, 2013). Leukemic cells from AML patients were shown to contain several genetic abnormalities such as chromosomal translocations, inversions, and point mutations, which are now considered to be critical initiating steps in the development of the disease (Grimwade et al., 2016). Besides these lesions, epigenetic dysregulation has also been associated with AML pathogenesis (Wouters and Delwel, 2016).

Homeobox (HOX) genes are master regulators of hematopoiesis as they influence the decision between self-renewal and differentiation (Alharbi et al., 2013). HOX proteins and their cofactors, such as MEIS and PBX proteins, are among the most recurrent targets of AML genetic and epigenetic alterations (De Braekeleer et al., 2014). Their oncogenic potential was demonstrated by their ability to induce leukemia in distinct mammalian systems (Alharbi et al., 2013). For example, HOXA9 transduction of mouse bone marrow cells leads to AML, and leukemia onset is greatly accelerated by MEIS1 co-expression (Kroon et al., 1998). HOX genes are also implicated in rare but recurrent chromosomal translocations with NUP98; a member of the nuclear pore complex (Gough et al., 2011). The prototypical translocation, NUP98-HOXA9 (NA9), fuses the amino-terminal part of NUP98 to the carboxyl-terminal part of HOXA9 (Wellik, 2011). NA9 expression in the murine bone marrow also leads to AML, which in turn is vastly accelerated by MEIS1 co-expression (Iwasaki et al., 2005, Kroon et al., 2001).

Over the last decade *Drosophila* has emerged as a valuable heterologous system to studying diseases affecting human blood cells (Breig et al., 2014, Crozatier and Vincent, 2011, Osman et al., 2009, Reitman et al., 2015, Sinenko et al., 2010). Hematopoiesis in *Drosophila* occurs throughout the life cycle and produces essentially three types of myeloid-like blood cells, namely, plasmatocytes, crystal cells, and lamellocytes (Honti et al., 2014). Plasmatocytes represent over 95% of the differentiated blood cell population in healthy flies. They are macrophage-like cells involved in the phagocytosis of cellular debris and bacteria. Crystal cells account for roughly 5% of the population and implement a melanization process targeting foreign bodies. Finally, lamellocytes are not normally present in healthy larvae, but their differentiation is induced upon immune challenges such as parasitic infection by wasp eggs or following tissue damage. Lamellocytes work together with crystal cells to encapsulate large foreign bodies (Honti et al., 2014). Embryonic hematopoiesis is derived from the head mesoderm anlage, whereas larval hematopoiesis arises in the lymph gland (Holz et al., 2003). This specialized organ derived from the cardiogenic mesoderm is composed of two primary and several secondary lobes aligned along the dorsal vessel (Fig. 1A). The primary lobes consist of a cortical zone containing differentiated hemocytes and a medullary zone with stem-like progenitors (Jung et al., 2005, Krzemien et al., 2010a) (Fig. 1A). A third compartment,



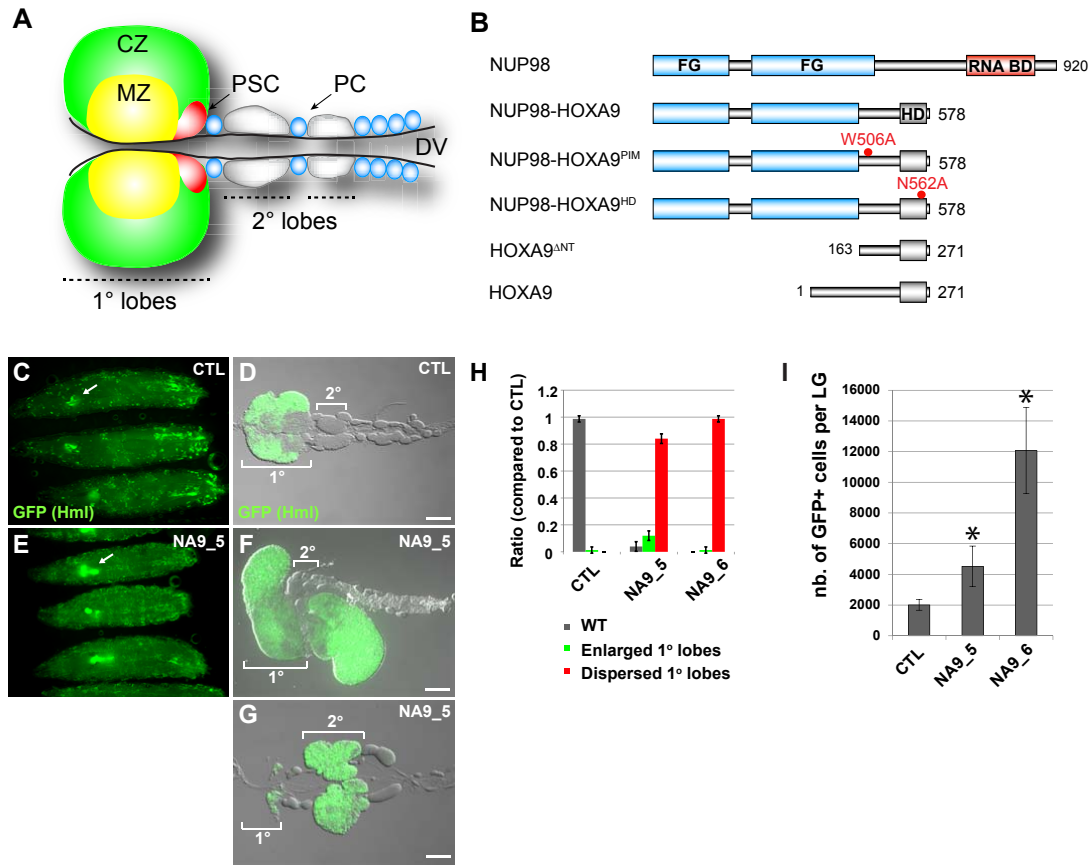
called the posterior signaling center (PSC) consists of a group of approximately 50 cells located at the tip of the primary lobes. The PSC, originally described as the *Drosophila* hematopoietic niche, was demonstrated to be required for progenitor maintenance within the medullary zone and for lamellocytes differentiation upon wasp parasitization (Krzemien et al., 2007, Lebestky et al., 2003, Mandal et al., 2007). However, its role as a niche has recently been challenged (Oyallon et al., 2016, Benmimoun et al., 2016, Benmimoun et al., 2015). Finally, a third wave of hematopoiesis takes place in adults: four blood cell clusters, called hematopoietic hubs, are located on the dorsal side of the adult fly abdomen wherein precursor cells can differentiate as plasmatocytes and crystal cells (Ghosh et al., 2015).

Here, we took advantage of *Drosophila* as a model system to provide new insights on NA9 leukemogenic property. Since both parts of the fusion protein have orthologues in *Drosophila* (Nup98-96 and Abd-b), we reasoned that overexpressing human NA9 in flies may disturb protein networks similar to those affected during mammalian leukemia onset. Markedly, targeted NA9 expression in the cortical zone of the lymph gland as well as in circulating hemocytes led to a highly penetrant expansion of these compartments owing to increased cell proliferation. These findings are reminiscent to myeloproliferative diseases induced by NA9 expression in murine bone marrow cells (Iwasaki et al., 2005, Kroon et al., 2001). Moreover, similar to the ability of MEIS1 to accelerate NA9-mediated leukemia onset (Iwasaki et al., 2005, Kroon et al., 2001), Homothorax (HTH; MEIS homolog) strongly enhanced NA9 phenotypes in the developing lymph gland. Interestingly, NA9 expression in the cortical zone and circulating hemocytes was also accompanied by a non-cell autonomous overgrowth of the PSC. These results suggest that the cortical zone and the circulating hemocytes communicate with the PSC and influence its development. Finally, NA9-induced phenotypes were consistent with altered PVR signaling; a PDGF/VEGF RTK mostly homologous to mammalian Flt1-4. In agreement with this, experimentally-increased PVR signaling completely suppressed NA9-mediated phenotypes in the lymph gland. This latter finding indicates that, as in mammals, NA9 expression in flies modulate signaling events elicited by a Flt-like RTK. In summary, our *Drosophila* NA9 model recapitulates several features found in related murine models and therefore constitutes a relevant and genetically tractable system for deciphering the molecular events underlying NA9-dependent leukemia.

## 2.3 Results

### 2.3.1 NUP98-HOXA9 expression induces lymph gland hyperplasia

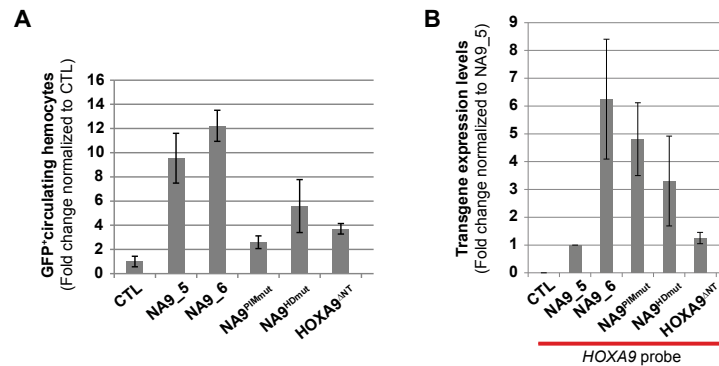
To determine the impact of NUP98-HOXA9 (NA9) on *Drosophila* hematopoiesis, we used *hemolectin* $\Delta$  (*hml* $\Delta$ )-*Gal4* (Goto et al., 2003, Sinenko and Mathey-Prevot, 2004) to drive the expression of a human cDNA construct (Fig. 1B) in the cortical zone (CZ) of developing lymph glands and in circulating hemocytes. Interestingly, visual inspection of whole third instar larvae revealed a fully penetrant enlargement of NA9-expressing lymph glands (Fig. 1, compare C and E). In addition, a  $\sim$  10-fold increase in the number of GFP<sup>+</sup> circulating hemocytes was observed (Fig. S1). The ability of NA9 expression to induce overgrowth does not appear to be a general phenomenon as expression of the translocation during eye (*eyeless*-*Gal4*) or wing (MS1096-*Gal4*) imaginal disc development did not trigger tissue overgrowth (Fig. S2). Control and NA9-expressing lymph glands were then isolated and further characterized. While few occurrences of primary lobe overgrowth were observed in NA9-expressing lymph glands (Fig. 1, compare D and F; quantification in 1H), a majority showed primary lobe disruption accompanied by secondary lobe enlargement owing to the onset of *hml* $\Delta$ -*Gal4* expression in this latter compartment (Fig. 1, compare D and G; quantification in 1H). Similar phenotypes were observed for two independent transgenic lines, namely, line 5 and line 6 (Figs. 1H and S1). Next, to quantitatively assess the lymph gland expansion phenotype induced by NA9 expression, we used Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis and determined the mean number of *hml* $\Delta$ -*Gal4* driven GFP<sup>+</sup> cells per lymph gland (see Materials and Methods). Both NA9 lines significantly augmented the number of GFP<sup>+</sup> cells (Fig. 1I) and, consistent with its higher transgene expression levels (Fig. S1), line 6 led to a greater increase than line 5. Taken together, these results showed that NA9 induces overgrowth of hematopoietic tissues in *Drosophila*.



**Figure 2.1. NA9 expression induces lymph gland overgrowth.**

(A) Schematic representation of third instar larval lymph gland. Position of the cortical zone (CZ), medullary zone (MZ), posterior signaling center (PSC), pericardial cells (PC), and dorsal vessel (DV) is shown. (B) Schematic of the distinct NUP98-HOXA9 constructs used in this study. The Nup98 protein contains phenylalanine/glycine-rich (FG) repeats and an RNA binding domain, while the HOX protein contains a homeodomain (HD). (C, E) Wide field images of wandering third instar larvae. Arrows point to a lymph gland labeled by GFP fluorescence under the control of the *HmlD-Gal4* driver. (D, F, G) Dissected lymph glands (the position of primary [1°] and secondary [2°] lobes is indicated) of the following genotypes: (C, D) *HmlD-Gal4; UAS-GFP* (CTL) and (E-G) *HmlD-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 5* (NA9\_5). Scale bars represent 100  $\mu$ m. (H) Proportion of larvae with enlarged or dispersed 1° lobes of the indicated genotypes. The results for two independent NA9 lines (NA\_5 and NA\_6) are shown. (I) Quantification of the number of GFP<sup>+</sup> cells per lymph gland by FACS

analysis. Statistically significant (\*) differences ( $p < 0.002$ ; Student's *t*-test) were observed relative to CTL.

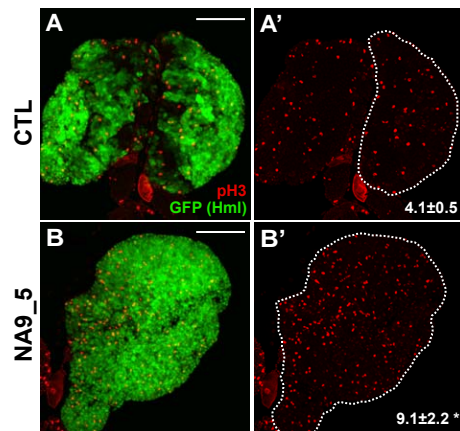


**Figure 2.S1. NA9 expression increases the number of circulating hemocytes.**

(A) Wandering third instar larvae of the indicated genotypes were bled and the number of GFP<sup>+</sup> circulating hemocytes was quantified. (B) Levels of *NA9* transgene expression in the lymph gland were evaluated by qPCR using a *HOXA9*-specific Taqman intron-spanning probe.

### 2.3.2 NUP98-HOXA9 induces hemocyte proliferation and affects the balance between progenitors and differentiated hemocytes

Given the enlargement of the NA9-expressing lymph glands, we addressed whether the phenotype correlated with an increased mitotic index. For this, we determined the number of positive cells for the G2-M marker phospho-histone H3 (pH3). Similar to what was reported previously (Krzemien et al., 2010b), approximately 4% of the cells exhibited pH3<sup>+</sup> signal in the primary lobes of control lymph glands isolated from wandering third instar larvae (Fig. 2A). This number rose by ~ 2-fold in lymph gland primary lobes of NA9\_5 transgenic animals. Similar findings were obtained with NA9\_6 enlarged secondary lobes (not shown; the primary lobes of NA9\_6 could not be assessed as they are almost exclusively disrupted). Thus, it appears that NA9 expression induces lymph gland expansion by promoting hemocyte proliferation.



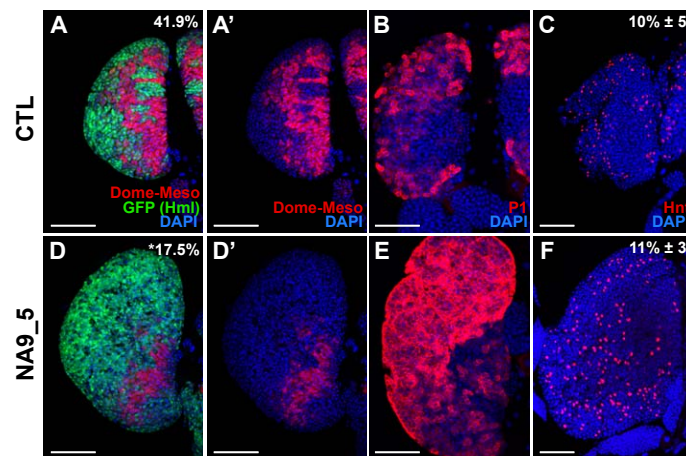
**Figure 2.2. NA9 increases lymph gland mitotic index.**

Immunofluorescence staining of lymph glands from (A, A') *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP* (CTL) and (B, B') *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 5* (NA9\_5) wandering third instar larvae using anti-pH3 antibody. Hml-Gal4 driven GFP fluorescence marks the CZ. Images were acquired by confocal microscopy. To quantify mitotic indices, the number of pH3<sup>+</sup> cells over the number of DAPI<sup>+</sup> cells per primary lobes of control versus NA9-expressing larvae were determined. The percentage of mitotic figures (pH3<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>) per lobe (shown on the bottom right of A' and B') was calculated using the plot applet of the Imaris software. Student's *t*-test: \*  $p < 0.051$  relative to control. Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$ .

We next investigated if the proportion of progenitors and differentiated cells was modified in NA9-enlarged lymph glands. The progenitor-containing medullary zone (MZ) has high JAK/STAT activity and can be visualized using the *Dome-MESO* reporter line where *LacZ* is under the control of an intronic *domeless* regulatory element (Hombria et al., 2005). In non-dispersed NA9-expressing lymph glands derived from line 5, the MZ area was reproducibly reduced by 2.4-fold compared to control (Fig. 3, compare A and D). This result indicated that *hml*-driven NA9 impinges on MZ homeostasis and that part of the CZ overgrowth possibly comes from increased differentiation of MZ progenitors.

Given that *hml* drives NA9 expression in differentiating hemocytes, we evaluated whether hemocyte maturation was affected in third instar larvae. Compared to controls, terminal differentiation of plasmatocytes and crystal cells, highlighted respectively with anti-

P1 (Nimrod C1 antigen) (Kurucz et al., 2007) and Hindsight (Hnt) (Terriente-Felix et al., 2013) antibodies, was not reduced in NA9-expressing lymph glands (Fig. 3, compare B to E, and C to F). Since Hemolectin is an early marker of plasmatocytes differentiation (Goto et al., 2003), our ability to detect Hml<sup>+</sup> cells provides another indication of effective plasmatocyte differentiation. As for control lymph glands, lamellocytes were rarely seen in the NA9\_line 5 background. However, a substantial number was observed in NA9\_line 6, thus suggesting that higher NA9 expression drives lamellocyte differentiation (Fig. S3).

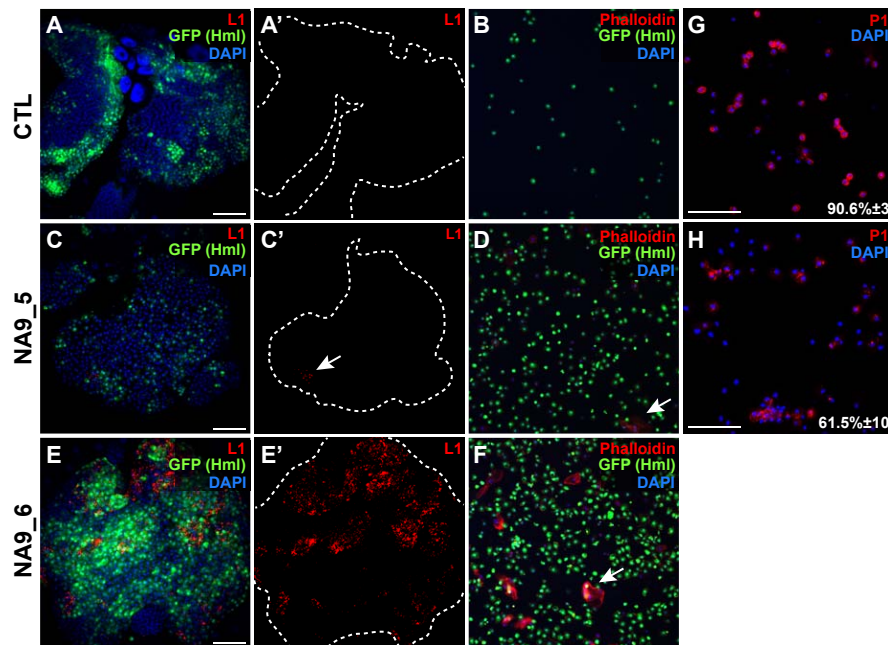


**Figure 2.3. NA9 perturbs the balance between progenitors and differentiated cells in the lymph gland.**

Immunofluorescence staining of third instar lymph glands from wandering larvae using (A, D) anti-LacZ (Dome-Meso) to reveal the MZ; (B, E) anti-P1 to mark plasmatocytes; and (C, F) anti-Hnt to mark crystal cells. Hml-Gal4 driven GFP fluorescence highlights the CZ. Percentage for MZ surface area (A, D) and number of crystal cells (C, F) per lymph gland is indicated. The following genotypes were analyzed: (A-C) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP* as CTL, and (D-F) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 5* (NA9\_5). The R3-*hmlΔ-Gal4, UAS-2xeGFP* line was used for panel B and E as it was demonstrated to be homozygous wild-type for the NimrodC1 gene (Honti et al., 2014). Student's *t*-test: \*  $p < 6.8 \times 10^{-5}$  relative to control. Scale bars represent 50  $\mu$ m.

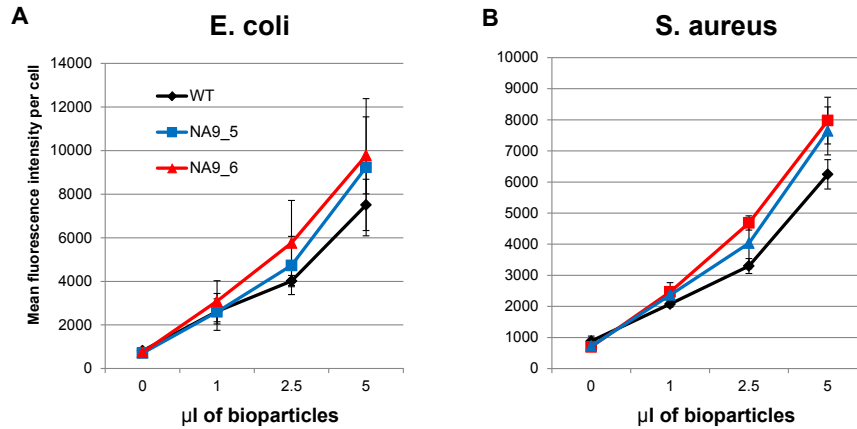
Intriguingly, the proportion of P1<sup>+</sup> circulating hemocytes was reduced by ~ 1.5-fold in NA9-expressing larvae (Fig. S3). Since P1 antibody recognizes an epitope on the Nimrod C1 phagocytic receptor, we assessed the phagocytic activity of NA9-expressing circulating hemocytes. We quantified by FACS the ability of these cells to phagocytose Alexa 488-labeled *E.coli* and *S.aureus* bioparticle conjugates, but found no differences compared with control cells (Fig. S4).

In summary, NA9 expression does not preclude differentiation of larval hemocytes, but increases the proportion of differentiated hemocytes in the CZ at the expense of progenitor cells in the MZ.



**Figure 2.S3. Higher NA9 expression promotes lamellocyte differentiation.**

(A, C, E) Lymph glands from wandering third instar larvae were stained with anti-L1 (lamellocyte marker), Hml (GFP), and DAPI. (B, D, F) Wide field images of circulating hemocytes marked with Phalloidin (Actin), Hml (GFP), and DAPI or (G, H) P1 and DAPI. The genotypes are: (A, B, G) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP* (CTL), (C, D, H) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 5* (NA9\_5), (E, F) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 6* (NA9\_6). Arrows point at specific lamellocytes. Scale bars represent 50 μm.



**Figure 2.S4. Phagocytic activity of circulating hemocytes is not affected by NA9 expression.**

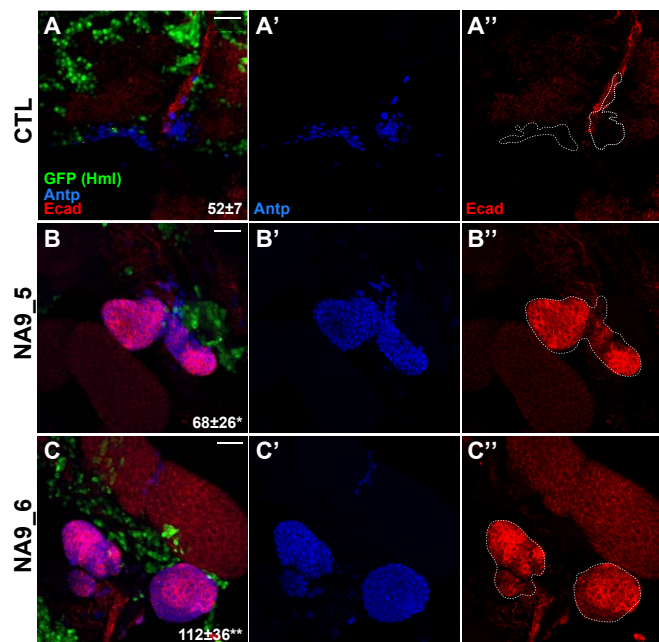
Mean fluorescence intensity (Alexa Fluor 488) per cell from circulating hemocytes of indicated genotypes incubated with increasing amounts of (A) *E. coli*-coupled or (B) *S. aureus*-coupled bioparticle conjugates.

### 2.3.3 NUP98-HOXA9 promotes PSC expansion in a non-cell autonomous manner

Intriguingly, NA9 expression in the CZ and circulating hemocytes markedly affected the size and morphology of the PSC as revealed using two distinct PSC markers, Antennapedia (*Antp*; Fig. 4, compare A to B and C) and Collier (*Col*; Fig. S5). A significant increase in the number of cells per PSC was observed in NA9-expressing lymph glands, which was concomitant with an increase in the number of PSC-localized mitotic figures (Fig. S5). Moreover, in contrast to their appearance as loosely connected cells in control larvae, NA9-expressing larvae displayed rounded and densely packed PSC structures, suggesting enhanced cell-cell contact. Consistent with this phenotype, elevated E-Cadherin (*Ecad*) expression was detected in the PSC (Fig. 4, compare A'' to B'' and C''). Driving *UAS-Ecad* expression selectively in the PSC under *collier-Gal4* driver resulted in rounding of the PSC, but did not lead to enlargement of the lymph gland (Fig. S6). This suggests that the increased *Ecad* level in the PSC is a consequence of NA9 expression in the CZ and circulating hemocytes. To



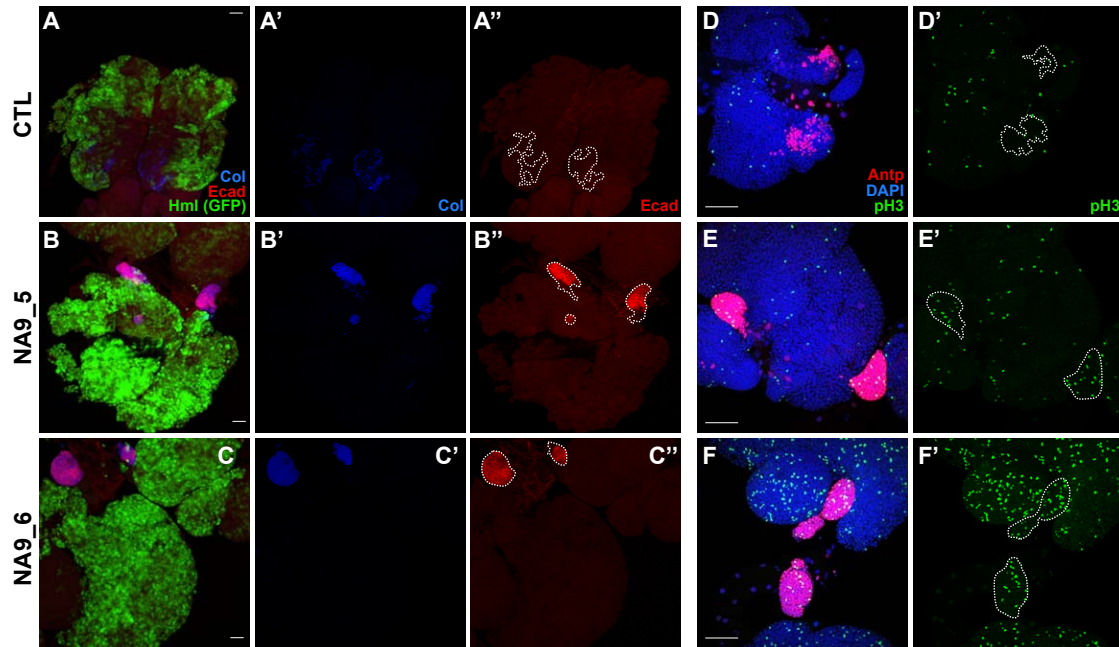
demonstrate the specificity of this phenomenon, we used another hematopoietic-specific driver, *peroxidasin (pxn)-Gal4* (Stofanko et al., 2008). As shown in Fig. S7, *pxn-Gal4; UAS-NA9* led to lymph gland overgrowth and likewise dramatically altered the size, the morphology, and Ecad expression of the PSCs. Markedly, NA9 expression in PSC cells using *collier-Gal4* led to a dramatic overgrowth of the PSCs (Fig. S8), which demonstrated their autonomous responsiveness to NA9 expression in addition to CZ cells and circulating hemocytes. Given this latter result we wondered whether the *hmlA-Gal4* driver also expressed at low levels in PSC cells and thereby explained the observed PSC overgrowth using this driver. To address this question, we conducted lineage-tracing experiments using the G-TRACE tool (Evans et al., 2009). The result was unequivocal. At no time during larval development could we detect Hml-driven expression in PSC cells (Fig. S9). We conclude that NA9 expression in the CZ and/or circulating hemocytes has a genuine non-cell autonomous effect on PSC cells.



**Figure 2.4. NA9 promotes PSC expansion in a non-cell autonomous manner.**

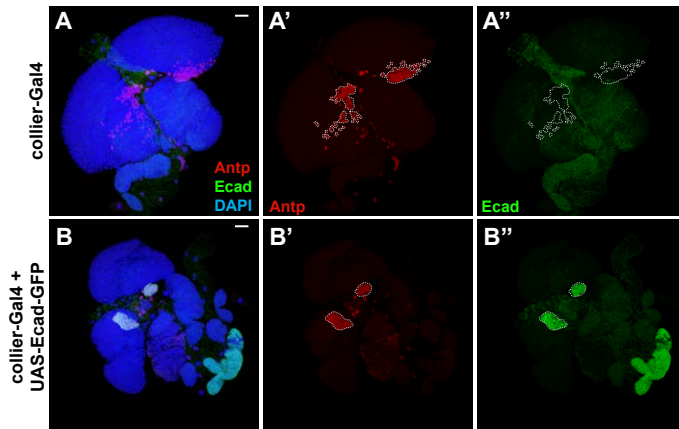
Lymph glands from wandering third instar larvae were stained using anti-Antp to outline the PSC,(Krzemien et al., 2007, Mandal et al., 2007) while anti-E-cadherin (Ecad) was used to reveal adherens junctions. The CZ was highlighted using Hml-Gal4 driven GFP fluorescence.

The following genotypes were analyzed by confocal microscopy: (A, A') *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP* (CTL), (B, B') *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 5* (NA9\_5), (C, C') *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 6* (NA9\_6). Average number of cells per PSC are indicated. Student's *t*-test: \*  $p < 0.038$ , \*\*  $p < 0.006$  relative to CTL. Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ .



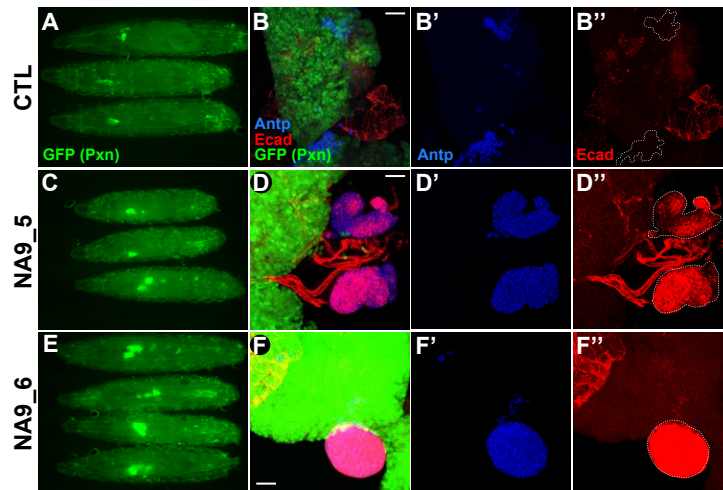
**Figure 2.S5. NA9 expression in the CZ and circulating hemocytes promotes PSC cell proliferation.**

Lymph glands from wandering third instar larvae were stained with (A-C) anti-Collier (Col; PSC), anti-Ecad (Adherens junctions), (D-F) anti-pH3 (mitotic figures), anti-Antp (PSC), and DAPI. *Hml>GFP* (A-C) reveals differentiating hemocytes in the cortical zone / secondary lobes. Genotypes are: (A, D) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP* (CTL), (B, E) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 5* (NA9\_5), (C-F) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 6* (NA9\_6). Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$  for A-C and 50  $\mu\text{m}$  for D-F.



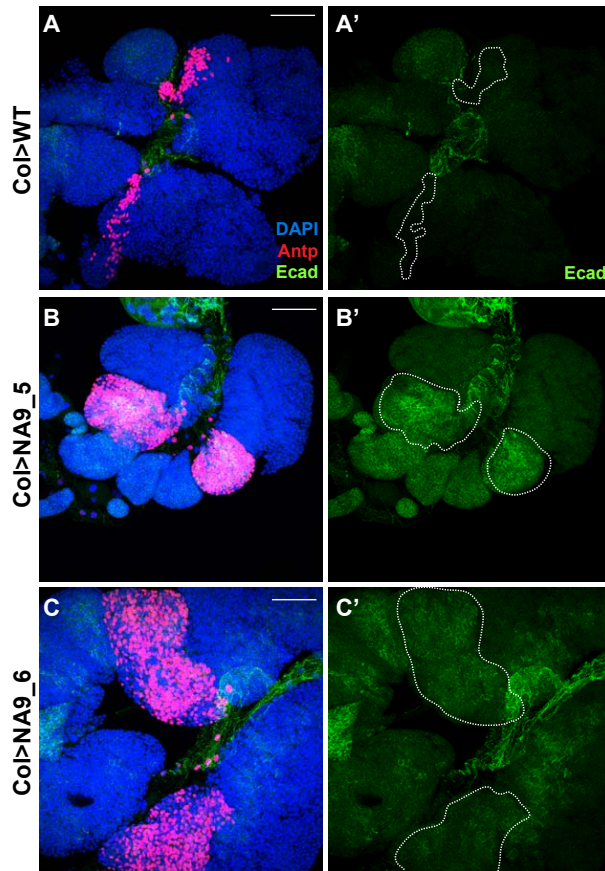
**Figure 2.S6. E-Cadherin expression in PSC cells alters PSC morphology.**

Lymph glands from wandering third instar larvae were stained with anti-Antp, *collier-Gal4* driven Ecad-GFP, and DAPI. The following genotypes were analyzed: (A) *collier-Gal4* (B) *collier-Gal4*, *UAS-Ecad-GFP*. Dotted lines mark the position of the PSCs. Scale bars represent 20  $\mu$ m.



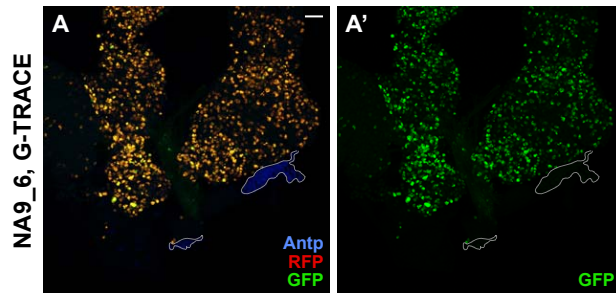
**Figure 2.S7. Peroxidase-Gal4 driven NA9 expression affects PSC size and morphology.**

(A, C, E) Wide field images of wandering third instar larvae and (B, D, F) maximum intensity projection of confocal immunofluorescence images of lymph glands. Genotypes are: (A,B) *pxn-Gal4*, *UAS-GFP* (CTL), (C, D) *pxn-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-NA9* line 5 (NA9\_5), (E, F) *pxn-Gal4*, *UAS-GFP*, *UAS-NA9* line 6 (NA9\_6). Lymph glands were stained with anti-Antp, anti-E-Cadherin (Ecad), and *pxn-Gal4* driven GFP. Dotted lines mark the position of the PSCs. Scale bars represent 20  $\mu$ m.



**Figure 2.S8. Expression of NA9 using collier-Gal4 promotes PSC overgrowth.**

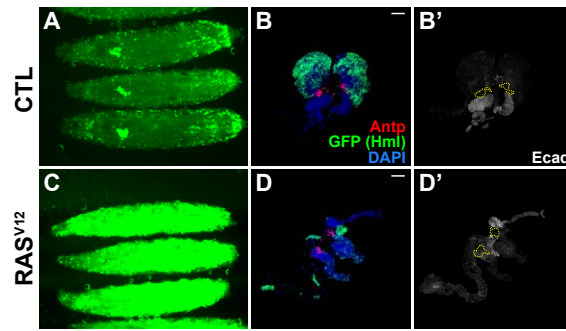
Lymph glands were stained with the PSC marker Antp, adherens junction marker Ecad and DAPI. Genotypes are: (A, A') *collier-Gal4* (B, B') *collier-Gal4, UAS-NA9 line 5*, (C, C') *collier-Gal4, UAS-NA9 line 6*. White dotted lines mark the position of the PSCs. Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2.S9. PSC cells do not express *HmlΔ-Gal4* as revealed by G-TRACE analysis.**

PSCs were revealed using anti-Antp staining, and inspected for RFP (shows real-time *Hml* expression) and GFP (shows lineage-traced expression) signals. (A) *HmlΔ-Gal4*, *UAS-NA9\_line 6*, *G-TRACE*. White dotted lines mark the position of the PSC. Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ .

To verify whether the non-autonomous effect of NA9 on the PSCs could result from primary lobe overgrowth and/or rupture, we tested a constitutively active form of Ras (Ras<sup>V12</sup>) as another means to induce hemocyte over-proliferation (Asha et al., 2003, Sinenko and Mathey-Prevot, 2004). As shown in Fig. S10, Ras<sup>V12</sup> expression in hematopoietic cells led to massive hemocyte overgrowth as well as primary lobe disruption. However, this did not alter the size or morphology of the PSCs, and also did not induce Ecad expression. Together, these results suggest that NA9 expression in the CZ and/or circulating hemocytes specifically leads to a non-cell autonomous effect on the PSC that is not caused by the overgrowth or disruption of the primary lobes.

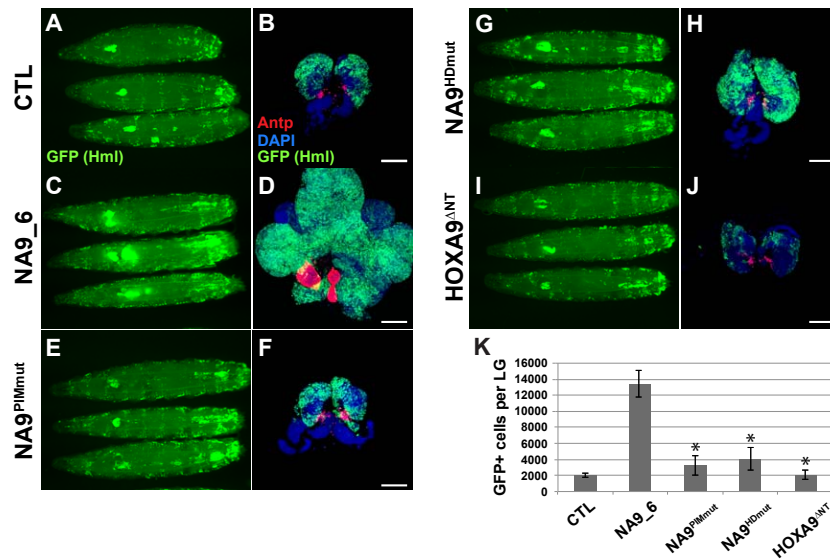


**Figure 2.S10.  $RAS^{V12}$  expression in the CZ does not affect the size or the morphology of the PSC.**

(A, C) Wide field images of wandering third instar larvae and (B, D) maximum intensity projection of confocal immunofluorescence images of lymph glands. Genotypes are: (A, B) *HmlΔ-Gal4, UAS-GFP* (CTL), (C, D) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-Ras<sup>V12</sup>* ( $RAS^{V12}$ ). Lymph glands were stained with anti-Antp, anti-E-Cadherin (Ecad), *HmlΔ-Gal4* driven GFP, and DAPI. Note that *HmlΔ-Gal4* driven  $RAS^{V12}$  expression potentially disrupts primary lobes and massively expands the circulating hemocyte population, yet it does not alter PSC cell number and morphology as well as does not induce Ecad expression in the PSC. Yellow dotted lines mark the position of the PSCs. Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$ .

### **2.3.4 NUP98-HOXA9 activity in the lymph gland depends on the same functional elements as in mammals**

We next evaluated whether known functional areas of the NA9 protein were required to induce the various phenotypes described above. Previous studies in mammals have shown that NA9 activity depends on the combination of the N-terminal NUP98 moiety and the DNA-binding activity of the HOXA9 homeodomain (Kroon et al., 2001, Yassin et al., 2009, Kasper et al., 1999). In addition, the PBX-interacting motif (PIM) located immediately N-terminal to the homeodomain was required for NA9 transforming activity in NIH 3T3 cells (Kasper et al., 1999), but dispensable in murine myeloid progenitors (Calvo et al., 2002).



**Figure 2.5. NA9 structure-function analysis in the *Drosophila* hematopoietic system.**

(A, C, E, G, and I) Wide field fluorescence images of wandering third instar larvae using *hml-Gal4* driven GFP to reveal lymph glands, circulating, and sessile hemocytes. (B, D, F, H, and J) Maximum intensity projection of confocal immunofluorescence images of lymph glands marked with *hml-Gal4* driven GFP (CZ), anti-Antp (PSC), and DAPI (nuclei). The following genotypes are shown: (A, B) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP* (CTL), (C, D) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 6* (NA9\_6) (E, F) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9<sup>PIMmut</sup>* (NA9<sup>PIMmut</sup>) (G, H) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9<sup>HDMut</sup>* (NA9<sup>HDMut</sup>) (I, J) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, HOXA9<sup>ANT</sup>* (HOXA9<sup>ANT</sup>). Scale bars represent 100 μm. (K) Quantification of GFP<sup>+</sup> cells per lymph gland (LG) by FACS analysis. Statistically significant (\*) differences were observed (Student's *t*-test:  $p < 5.1 \times 10^{-4}$ ) for the mutant NA9 constructs relative to NA9\_6.

We therefore tested *NA9* transgenic lines harboring point mutations that obliterate DNA binding (HD<sup>mut</sup>) or PBX interaction (PIM<sup>mut</sup>) as well as a line expressing only the HOXA9 moiety (HOXA9<sup>ANT</sup>) (Fig. 1B). In contrast to NA9, none of these constructs led to primary lobe disruption or PSC overgrowth (Fig. 5). Moreover, quantification of Hml<sup>+</sup> cells expansion by FACS confirmed their impaired activity (Fig. 5K) even though their expression levels were in the same range as NA9 (Fig. S1). Finally, the three mutant constructs were less competent than WT NA9 to increase the number of circulating hemocytes, although residual

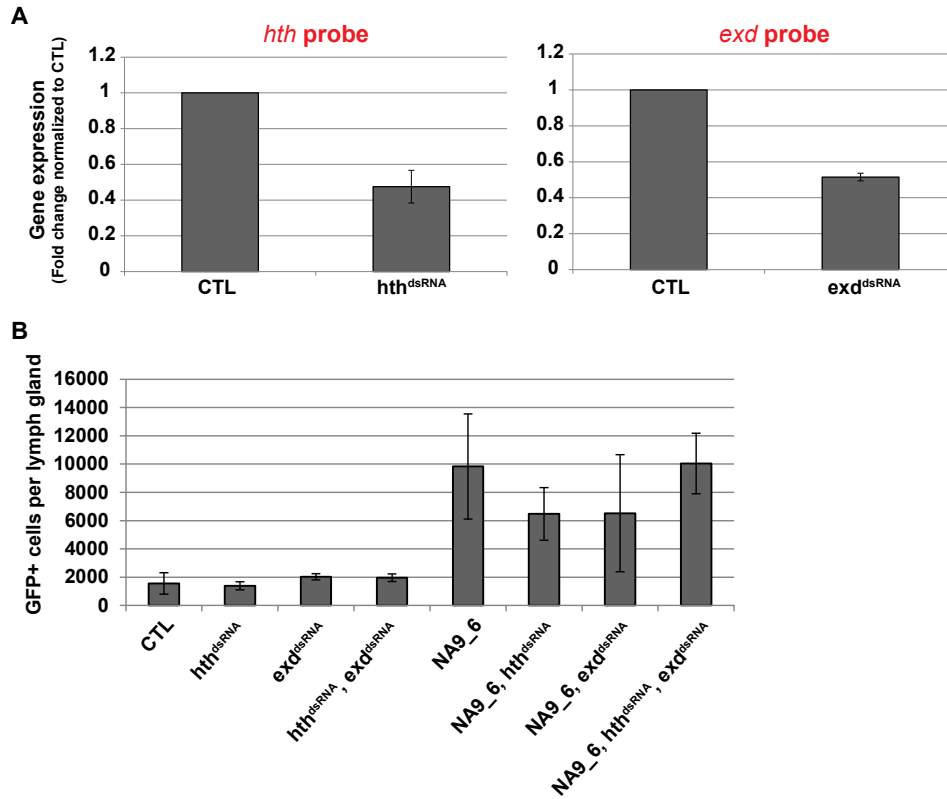
activity was detectable (Fig. S1). Together, these results indicate that NA9-induced phenotypes in the fly hematopoietic system are caused by the same functional elements in NA9 as those delineated in mammals.

### **2.3.5 HTH collaborates with NUP98-HOXA9 to promote lymph gland overgrowth**

HOX DNA binding affinity and selectivity rely on the cofactors, Meis and PBX (Ladam and Sagerstrom, 2013). Hence, we examined whether NA9 phenotypes depended on the endogenous fly orthologs HTH and EXD. To verify this, we co-expressed NA9 and dsRNAs targeting *hth* or *exd* and monitored the effect on the lymph gland. Individual *hth* or *exd* depletion as well as their co-depletion did not reduce NA9 phenotypes, even though the RNAi lines did reduce *hth* and *exd* transcript levels by approximately 50% (Fig. S11). These results suggest that NA9-associated phenotypes do not depend on endogenous *hth* and *exd* cofactors, although residual levels of either factor upon RNAi depletion could be sufficient to maintain NA9 activity.

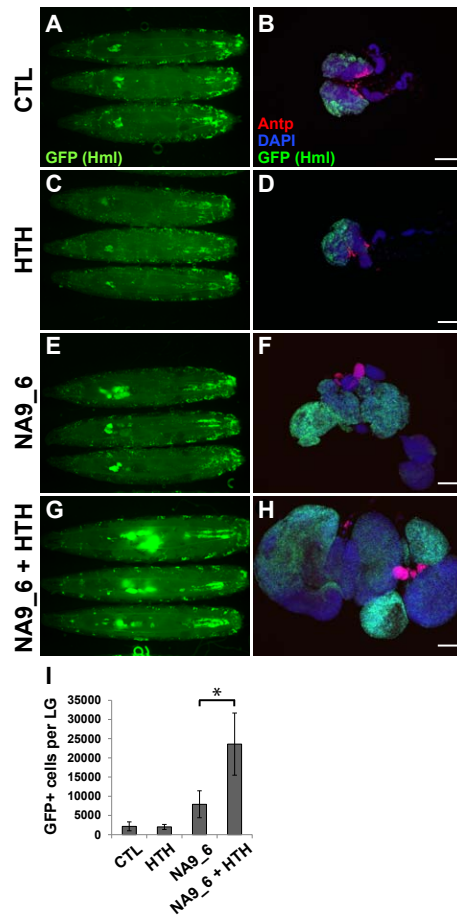
Results from mouse models demonstrated a functional collaboration between HOXA9 and Meis1 proteins (Kroon et al., 1998, Thorsteinsdottir et al., 2001). In addition, Meis1 accelerates leukemia onset when co-expressed with NA9 in mouse hematopoietic cells (Kroon et al., 2001). We thus investigated whether overexpressing HTH would enhance NA9-dependent phenotypes in the lymph gland. Forced expression of HTH alone did not have any hyperplastic phenotypes in the lymph gland and the size of the PSC was similar to that of controls (Fig. 6D), which is reminiscent to the innocuous effect of overexpressing Meis proteins in mouse bone marrow cells (Kroon et al., 1998). However, co-expression of HTH and NA9 resulted in a striking enlargement of the gland (Fig. 6, compare E and G) and quantification of Hml<sup>+</sup> cells per lymph gland revealed a ~ 3 fold increase (Fig. 6I). These results demonstrate, as observed in mammals, the ability of HTH to collaborate with NA9 when co-expressed in the fly hematopoietic system.





**Figure 2.S11. NA9-induced lymph gland expansion is not suppressed by depletion of endogenous HTH and/or EXD.**

(A) qPCR analysis to measure knockdown efficiency of endogenous *hth* and *exd* transcripts by dsRNA. (B) Quantification of GFP+ cells per lymph gland of the indicated genotypes.



**Figure 2.6. HTH collaborates with NA9 in the lymph gland.**

(A, C, E, and G) Wide field images of wandering third instar larvae using *Hml-Gal4* driven GFP to reveal lymph glands, circulating, and sessile hemocytes. (B, D, F, and H) Maximum intensity projection of confocal immunofluorescence images of lymph glands marked with *hml-Gal4* driven GFP (CZ), anti-Antp (PSC), and DAPI (nuclei). The following genotypes are shown: (A, B) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP* (CTL), (C, D) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-HTH* (HTH), (E, F) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 6* (NA9\_6), (G, H) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 6, UAS-HTH* (NA9\_6 + HTH). Scale bars represent 100  $\mu$ m. For these experiments, crosses were set up at 25°C for 90 h, then shifted to 29°C for 48 h prior to processing wandering larvae. (I) Quantification of GFP<sup>+</sup> cells per lymph gland by FACS analysis. A statistically significant (\*) difference (Student's *t*-test: \*  $p < 0.023$ ) was observed between NA\_9 and NA\_9 + HTH.

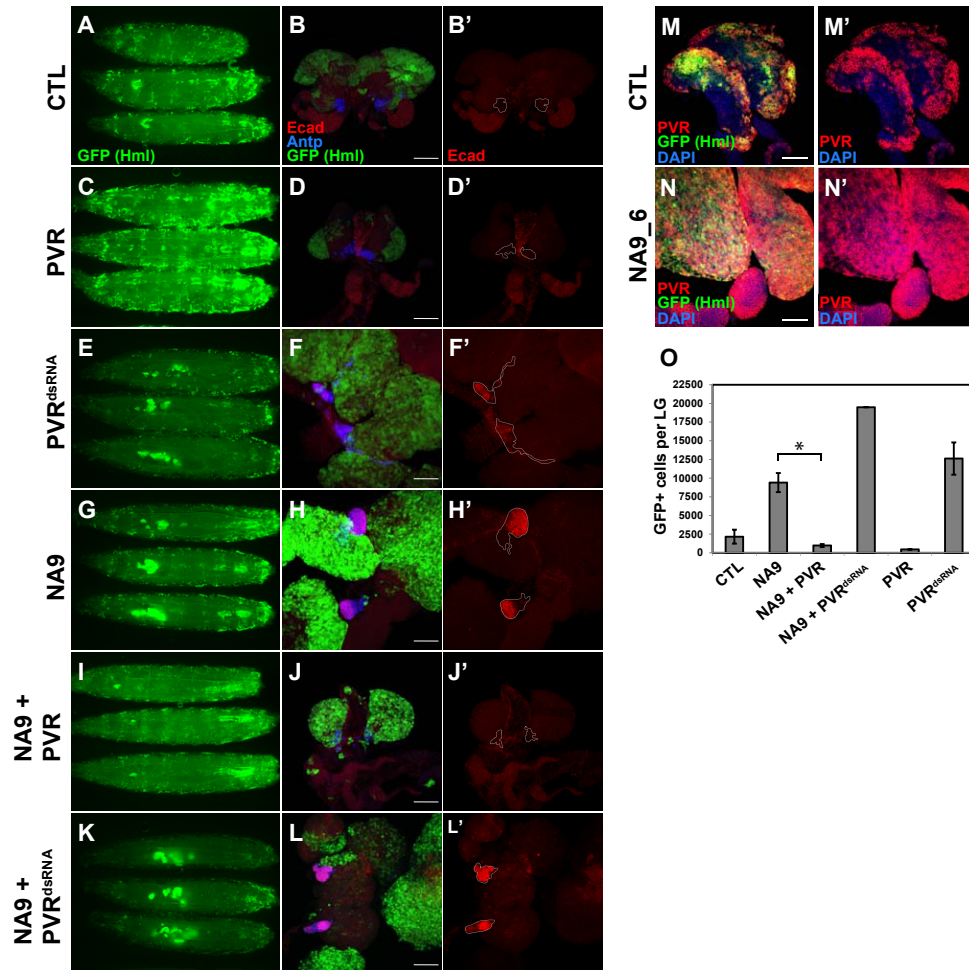
### **2.3.6 NUP98-HOXA9 impairs PVR signaling in the lymph gland**

PVR signalling in the CZ was previously shown to be required for maintaining MZ progenitor quiescence through a non-cell autonomous process (Mondal et al., 2011). As a consequence, loss of PVR activity triggers MZ progenitor cell differentiation into plasmacytes. Intriguingly, this phenomenon resembled the effect of NA9 expression on the gain of plasmacytes and the concomitant loss of MZ progenitors (Fig. 3). We therefore investigated whether NA9-driven phenotypes in the lymph gland could be due to impaired PVR signaling. As previously shown, increased PVR activity reduced the size of the CZ as PVR restricts MZ differentiation (Figs. 7D and 7O). In contrast, reduction of PVR signaling led to a significant gain of differentiated hemocytes, which was accompanied by the enlargement and disruption of the lymph gland (Figs. 7E, 7F, and 7O). Interestingly, the loss of PVR also altered PSC morphology and induced E-cadherin expression in the PSC as observed with NA9 expression (Figs. 7E, 7F, 7G, and 7H). It thus appears that PVR activity controls non-autonomously PSC homeostasis.

If NA9 expression reduces PVR signaling, we reasoned that increased PVR activity may attenuate NA9-associated phenotypes. This is what was observed when NA9 and PVR were co-expressed. Not only it suppressed primary lobe expansion, it also suppressed PSC morphological change and E-cadherin induction (Figs. 7I, 7J, and 7O). Conversely, reducing PVR signaling in the presence of NA9 slightly enhanced CZ expansion and did not further alter PSC morphology (Figs. 7K, 7L, and 7O), suggesting that NA9 expression suppresses PVR signaling to a point that removing PVR function in the context of NA9 expression only has a marginal impact.

Interestingly, *Drosophila* Nup98 was recently found to contribute to PVR expression in the CZ (Mondal et al., 2014). We thus addressed whether the ability of NA9 to perturb PVR signaling is due to an interference with endogenous Nup98 activity on PVR expression. To verify this, we compared PVR protein levels by immunofluorescence between CTL and NA9-expressing lymph glands. However, no difference was detected, thus ruling out the possibility that NA9 merely acted by impeding PVR expression (Fig. 7, compare M and N). Importantly,

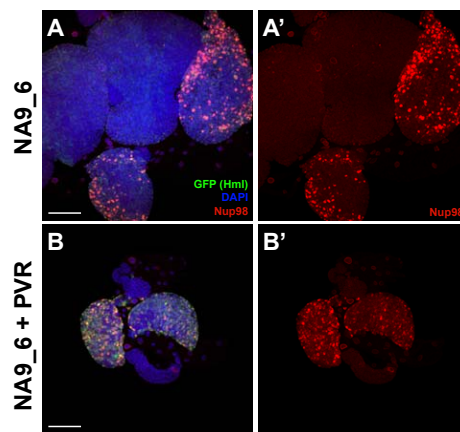
PVR overexpression also had no impact on NA9 expression (Fig. S12). Together, our findings suggest that NA9 expression impedes PVR signaling in the lymph gland at a step downstream of, or in parallel to, PVR.



**Figure 2.7. PVR signalling modifies NA9-dependent phenotypes in the lymph gland.**

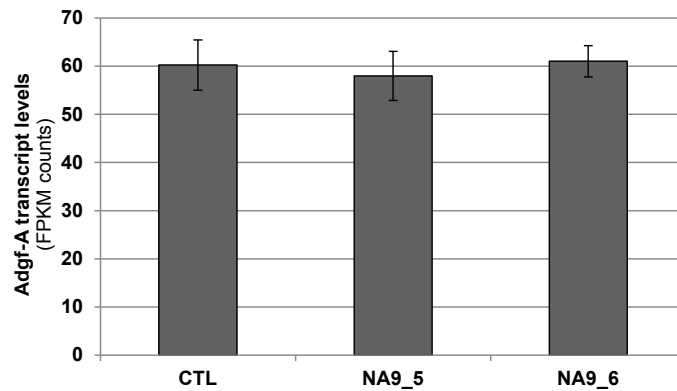
(A, C, E, G, I, and K) Wide field images of wandering third instar larvae. *Hml-Gal4* driven GFP is used to reveal lymph glands, circulating, and sessile hemocytes. (B, D, F, H, J, and L) Maximum intensity projection of confocal immunofluorescence images of lymph glands marked with *hml-Gal4* driven GFP (CZ), anti-Antp (PSC), and DAPI (nuclei). The following genotypes are shown: (A, B) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP* (CTL), (C, D) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-PVR* (PVR), (E, F) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-RNAi PVR* (PVR<sup>dsRNA</sup>), (G, H) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 6* (NA9\_6), (I, J) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-PVR, UAS-*

NA9 line 6 (NA9\_6 + PVR), (K, L) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-RNAi PVR, UAS-NA9 line 6* (NA9\_6 + PVR<sup>dsRNA</sup>). (M, N) Lymph glands of the indicated genotype were stained using anti-PVR and Dapi (nuclei). *Hml-Gal4* driven GFP delineates the CZ. Scale bars represent 50 μm. (O) Quantification of GFP<sup>+</sup> cells per lymph gland (LG). A statistically significant (\*) difference (Student's *t*-test: \*  $p < 3.5 \times 10^{-5}$ ) was observed between NA\_9 and NA\_9 + PVR. For these experiments, crosses were set up at 25°C for 90 h, then shifted to 29°C for 48 h prior to processing wandering larvae.



**Figure 2.S12. PVR overexpression does not impede NA9 expression.**

Confocal images of lymph glands of the indicated genotypes: (A) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 6* (NA9\_6) and (B) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 6, UAS-PVR* (NA9\_6 + PVR). Lymph glands were stained with anti-NUP98, DAPI and *HmlΔ-Gal4* driven GFP. For these experiments, crosses were set up at 25°C for 90 h, then shifted to 29°C for 48 h prior to processing wandering third instar larvae, Scale bars represent 50 μm.



**Figure 2.S13. NA9 expression in the CZ and circulating hemocytes has no impact on Adgf-A transcript levels.**

Transcriptome analyses have been performed on control (HmlD-Gal4; UAS-GFP) versus NA9-expressing (HmlD-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9 line 5 or UAS-NA9 line 6) lymph glands.

## 2.4 Discussion

In this study, we investigated the impact of expressing the human NA9 oncoprotein during *Drosophila* larval hematopoiesis. We found that NA9 transgenic flies share several similarities with previously described mammalian models (Calvo et al., 2002, Forrester et al., 2011, Kasper et al., 1999, Kroon et al., 1998, Chung et al., 2006, Takeda et al., 2006, Iwasaki et al., 2005). Firstly, NA9 induces overgrowth of hematopoietic tissues owing to increased cell proliferation. Secondly, the NUP98 moiety as well as the PIM and HD domains of HOXA9 are required for NA9 activity. Thirdly, the fly MEIS homolog (HTH) strongly collaborates with NA9. Finally, NA9 influences signaling elicited by PVR; a PDGF/VEGF-like RTK related to several mammalian RTKs involved in leukemia (Doepfner et al., 2007). The ability of NA9 to recapitulate in *Drosophila* specific features of its leukemogenic properties in mammals now offers the possibility to tackle their molecular basis by genetic means.

We linked NA9 growth promoting activity in the lymph gland to its ability to interfere with PVR signaling. In *Drosophila*, PVR is critical for several immune-related biological processes. For instance, it regulates hemocyte survival (Bruckner et al., 2004), immune

response to wasp parasitism (Zettervall et al., 2004), immune challenges involving the IMD pathway (Bond and Foley, 2009), embryonic hemocyte migration (Parsons and Foley, 2013), and decision between immune and humoral response through ERK signaling (Tsuzuki et al., 2014). Recently, a role for PVR in lymph gland homeostasis has been discovered. Specifically, PVR activity in the CZ was found to preserve progenitor quiescence and immaturity in the MZ by keeping low extracellular adenosine levels and thereby prevents activation of the Adenosine receptor (Ado-R) in the MZ (Mondal et al., 2011). PVR has been shown to accomplish this through STAT92, which in turn regulates the expression of ADGF-A, a secreted adenosine deaminase produced by the CZ (Mondal et al., 2011). Defective PVR signaling therefore increases adenosine levels leading to Ado-R activation in MZ progenitors, which promotes their differentiation through a PKA-mediated process (Mondal et al., 2011). How does NA9 dampen PVR signaling is currently not known. Recent work as shown that NUP98 controls PVR expression (Mondal et al., 2014). We reasoned that NA9 could interfere with endogenous NUP98 function and perturb PVR expression. However, our data do not support this model (Fig. 7). Alternatively, NA9 activity may antagonize downstream signaling events elicited by PVR. While this remains a possibility, we assessed the impact of NA9 on ADGF-A expression, but did not find any effect compared to control (Fig. S13). It thus suggests that NA9 does not generally impede STAT92 activity, although it may do so on other specific genes that are critical for PVR function on MZ maintenance. Finally, NA9 ability to antagonize PVR function may arise from its activity on a parallel set of factors or pathways whose impact is overridden upon PVR overexpression. For instance, by promoting CZ cell proliferation, NA9 may alter the production of a secreted factor that impinges on MZ cell quiescence. Although the underlying mechanism remains to be elucidated, our data clearly shows that this event requires the key functional elements of the NA9 oncoprotein, including its DNA binding activity, thus suggesting that NA9-dependent phenotypes are in part mediated by a transcriptional event. The finding that the TALE HTH co-factor potently enhanced NA9 activity (Fig. 6) supports this view.

Interestingly, in addition to the influence of the CZ on the MZ, our study suggested that the CZ also modulates non-cell autonomously PSC cell number and morphology either directly or through the MZ. Moreover, it appears that this event also depends on PVR

signaling (Fig. 7). The functional relevance of this CZ-PSC communication is currently not known, but the fact that PSC cells form tight contact specifically among themselves (and no longer appear to send out projections) may alter their ability to secrete growth factors and morphogens, such as Pvf1 and Hh, over long distance and thus restrain their role as signal sending centers.

It is now well established that progenitor cells within the MZ are maintained in part by integrating signals emanating from the CZ (Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2012, Mondal et al., 2011, Mondal et al., 2014, Owusu-Ansah and Banerjee, 2009, Sinenko et al., 2012). However, no studies have reported the communication from the CZ to the PSC. Moreover, scant information is available on signals that regulate PSC cell proliferation. Recently, the Insulin receptor, the Tor pathway, and the Bantam microRNA acting in PSC cells have been found to induce PSC overgrowth, and these events were concomitantly associated with precocious MZ differentiation (Lam et al., 2014, Tokusumi et al., 2012, Benmimoun et al., 2012). In addition, PSC-driven expression of a dominant-negative *thickvein* receptor (BMP signaling) also resulted in an increased number of PSC cells and MZ differentiation (Pennetier et al., 2012). Whether NA9-expressing or PVR-deficient CZ cells secrete factors that affect one of the aforementioned pathways has yet to be verified. Interestingly, overexpression of HOXA9 or HOXA10 in mammalian hematopoietic cells directly induced the expression of the Insulin-like growth factor (Igf1) and Fibroblast growth factor 2 (Fgf2), which are then secreted and act in an autocrine manner on HOX-expressing cells (Shah et al., 2012, Steger et al., 2015). It is therefore possible that, as in mammals, NA9-expressing *Drosophila* hemocytes from the CZ secrete mitogenic factors that have an immediate impact on PSC cells.



## 2.5 Materials and methods

### 2.5.1 Fly stocks

*HmlΔ-Gal4,UAS-2XeGFP* (BL-30140), *MS1096-Gal4* (BL-8860), *eyeless-Gal4* (BL-5534) flies were obtained from the Bloomington Stock Center. *UAS-hth* (Pai et al., 1998), *DomeMESO* (Hombria et al., 2005), *UAS-PVR* (Duchek et al., 2001), *R3-hmlΔ-Gal4*, *UAS-2xeGFP* (Honti et al., 2013), *UAS-Ras<sup>V12</sup>* (Karim and Rubin, 1998), *pxn-Gal4*, *U-GFP* (Stramer et al., 2005), and *collier-Gal4* (Krzemien et al., 2007), have been previously reported. *Pvr* (ID 43459), *hth* (ID 100630), and *exd* (ID 7803) RNAi lines were from VDRC (Dietzl et al., 2007). Crosses were performed on semi-defined medium ([http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly\\_Work/media-recipes/germanfood.htm](http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/germanfood.htm)) supplemented with food coloring agent to visualize gut content. Gut emptying marks transition from wandering to resting third instar larvae. All experiments were performed on wandering third instar larvae. Unless otherwise stated in Fig. legends, crosses were set up at 25°C for 66 h, then shifted to 29°C (to enhance Gal4 activity) and wandering larvae were harvested 72 h later. Larvae were dissected under a UV lamp (Nightsea, GFP filter) to visualize GFP positive lymph glands.

### 2.5.2 Cloning and transgenic flies

*NA9* (Nakamura et al., 1996) and *HOXA9ΔNT* (amino acid 163-271) cDNAs were cloned into the *pUAST* vector (Brand and Perrimon, 1993). The *NA9 HD* (N562A) and *PIM* (W506A) mutant cDNAs were generated by site-directed mutagenesis using QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). Transgenic flies were generated by P-element-mediated germline transformation (Rubin and Spradling, 1982). Two *pUAST* transgenic lines harboring WT *NA9* were used in this study, namely, line 5 (NA\_5) and line 6 (NA\_6). *NA9* transgene expression is ~ 6-fold higher in line 6 compared to line 5 (Figure S1B). Accordingly, even though the same phenotypes are observed between lines 5 and 6, they tend to be stronger in line 6.

### 2.5.3 Immunohistochemistry and microscopy

For larvae imaging, wandering larvae were collected, washed in Phosphate-buffered saline 1X, 1% Triton X-100 (PBT 1%) and anesthetized with ethyl ether for 25 min. Larvae were then aligned on a glass slide covered with double stick tape and immersed in glycerol before addition of a coverslip. Images were taken with an inverted microscope (Leica DM IRB) using a 2.5X objective. Quantification of lymph gland enlargement/dispersion in whole larvae was conducted using a LEICA MZ FLIII fluorescence stereomicroscope.

For immunohistochemistry of lymph glands, larvae were dissected in ESF921 medium (Expression systems) supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub>, fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde (Adams et al., 2000) / Phosphate-buffered saline (PBS) 1X; 0.2% Triton X-100 (PBT 0.2%) on ice and washed three times in PBT 0.2%. The following dilutions and sources for primary antibodies are as follow: anti-LacZ (1/2000; Promega), anti-Hnt (1/100; IG9 DSHB), anti-pH3 Alexa Fluor 647 (1/200; Cell signaling), anti-Antp (1/100; 4C3 DSHB), anti-P1 (Nimrod) (1/300) (Kurucz et al., 2007), L1 (1/100) (Kurucz et al., 2007), anti-Ecad (1/20; DCAD2 DSHB), anti-PVR (1/500) (Rosin et al., 2004) and anti-Nup98 (1/200, Cell Signaling). Lymph glands were incubated with primary antibodies diluted in PBT 0.2% + 5% BSA overnight at 4°C. They were then washed three times in PBT 0.2% and incubated at room temperature for 2h with fluorophore-conjugated secondary antibodies (1/500; Molecular Probes) diluted in PBT 0.2%. Lymph glands were then washed once in PBT 0.2% / 100 ng/ml DAPI, twice in PBT 0.2%, and mounted in Mowiol (Sigma). Imaging was done with a Zeiss LSM700 confocal microscope, equipped with a 40X objective, or with a Zeiss Axio-imager using a 10X objective. Quantification of Hnt<sup>+</sup> or pH3<sup>+</sup> compared to total DAPI<sup>+</sup> cells per lymph gland was done using the Plot applet of Imaris software (Bitplane). Surface applet of Imaris software was used for quantification of CZ area (Bitplane). Percent MZ surface areas were calculated using the following formula: DomeMeso voxels / (DomeMeso voxels + HmlGFP voxels) X 100.

### **2.5.4 Hemocyte staining and counting**

For immunohistochemistry of circulating hemocytes, third instar wandering larvae were gently opened in PBS 1X and the solution was transferred to individual wells of concanavalin A-coated 15 well microscope slides (MP Biomedicals) in triplicates. Hemocytes were left to adhere for 2 h before fixing in 4% PFA, PBS 1X, followed by washes in PBST 0.2% and O/N incubation with P1 antibody (1:100). Hemocytes were then stained with secondary antibody as described for lymph glands. The number of P1-positive hemocytes was quantified using Photoshop (Adobe).

For hemocyte counts, single wandering third instar larvae were bled in ESF921 (Expression systems) and transferred to individual wells of glass-bottom 384 well plates (Greiner  $\mu$ -clear plate). The hemocytes were left to adhere for 1 h before fixation in 4% PFA, PBS 1X, followed by three washes in PBT 0.2%. Nuclei and actin cytoskeleton were respectively stained using DAPI and Phalloidin-Alexa555 (Invitrogen). Mowiol was added to each well before automated imaging was conducted on an Operetta (PerkinElmer) high-content microscope equipped with a 20X objective. GFP<sup>+</sup> hemocytes were quantified using the Harmony software (PerkinElmer) by averaging 10 images per larva X three larvae per genotype conducted in duplicate.

### **2.5.5 qPCR and transcriptome analysis**

For qPCR and transcriptome analyses, 15 lymph glands per genotype (in triplicate) were dissected and total RNA was extracted using the RNeasy Micro kit (Qiagen) according to the vendor recommended procedure. For qPCR analyses, reverse transcription was performed on 250 ng of total RNA using the High capacity reverse transcription kit from Applied Biosystems. Universal Probe Library design center (Avet-Rochex et al.) was used to design Taqman qPCR assays. Reactions were performed with the TaqMan® Real-Time PCR Master Mix and analysed with the ViiA™ 7 Real-Time PCR System. For transcriptome analyses, RNA-seq libraries were prepared from 200 ng of RNA using the Kapa stranded mRNA-seq Kit (KAPA Biosystems). Sequencing was performed using an Illumina HiSeq2000 using

TruSeq SBS v3 chemistry. Sequences were trimmed for sequencing adapters and then aligned to the reference *Drosophila melanogaster* dm6 genome using Tophat version 2.0.7. An additional sequence for the NA9 open reading frame was added to the reference genome. Using Cufflinks version 2.2.1, expression values were estimated for genes and transcripts defined in RefSeq (as of 2015-03-27) and then normalized across samples using cuffnorm.

### **2.5.6 FACS analysis**

To quantify lymph gland size by FACS, 15 glands were dissected and put immediately in 100  $\mu$ l of Trypsin 1X (No phenol red; Life technologies) solution diluted in PBS 1X. Samples were incubated for 15 min at 25°C and then pipetted up and down 30 times through a 200  $\mu$ l siliconized tip. Trypsin was neutralized by adding 300  $\mu$ l of 2% FBS in PBS 1X. Cell suspensions were filtered using a FACS tube with a cell-strainer cap (Falcon). The percentage of GFP<sup>+</sup> cells was determined by FACS (BD FACSCanto II) and the total number of cells per sample was quantified by counting cells on a hemocytometer. The number of GFP<sup>+</sup> cells per lymph gland was determined as follows: % GFP<sup>+</sup> cells X Total number of cell per sample / 15 lymph glands.

### **2.5.7 Phagocytic assay**

To evaluate phagocytic activity of larval circulating hemocytes, 15 larvae were washed in PBT 1%, transferred to PBS 1X and then dried on a Kimwipes®. Cleaned larvae were bled in 110  $\mu$ l of ESF921 medium and circulating hemocytes were counted using a hemocytometer. Equivalent number of hemocytes per sample and per genotype was incubated with 1  $\mu$ l, 2.5  $\mu$ l and 5  $\mu$ l of Alexa-488 labeled *E. Coli* and *S. Aureus* bioparticles (Life Technologies) at room temperature for 20 min. Fluorescence of extracellular bioparticles was quenched with 50  $\mu$ l of 4% Trypan blue and put immediately on ice. Before sample analysis by FACS (BD FACSCanto II), 300  $\mu$ l of PBS 1X + 2% FBS was added and samples were filtered using FACS tube with a cell-strainer cap. The mean fluorescence intensity per cell was used as a parameter to calculate phagocytic activity. This protocol was adapted from previous work.<sup>4</sup>

For bioparticle preparation, 2 mg of bioparticle powder were vortexed in 2 ml of PBS 1X for 1 min and then passed 40 times through a 26-gauge needle. 20 µl aliquots were stored at -80°C for later use.

## 2.6 Acknowledgements

We thank the Bloomington and VDRC stock centers for fly stocks. We are also grateful to I. Ando, U. Banerjee, M. Crozatier, P. Martin, P. Rorth, B.Z. Shilo, Y. H. Sun, and M. P. Zeidler for providing various stocks and reagents. We thank members of the laboratory for critical reading of the manuscript. G.G. is recipient of a Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQ-S) studentship. H.K. is recipient of the Norwegian Research Council fellowship 221552\F20. This work was supported by funds from the Canadian Institutes for Health Research (MOP93654) to M.T.

## 2.7 References

- ALHARBI, R. A., PETTENGELL, R., PANDHA, H. S. & MORGAN, R. 2013. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*, 27, 1000-8.
- ASHA, H., NAGY, I., KOVACS, G., STETSON, D., ANDO, I. & DEAROLF, C. R. 2003. Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics*, 163, 203-15.
- BENMIMOUN, B., HAENLIN, M. & WALTZER, L. 2016. Blood cell progenitor maintenance: Collier barks out of the niche. *Fly (Austin)*, 0.
- BENMIMOUN, B., POLESELLO, C., HAENLIN, M. & WALTZER, L. 2015. The EBF transcription factor Collier directly promotes *Drosophila* blood cell progenitor maintenance independently of the niche. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 9052-7.
- BENMIMOUN, B., POLESELLO, C., WALTZER, L. & HAENLIN, M. 2012. Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in *Drosophila*. *Development*, 139, 1713-7.

- BOND, D. & FOLEY, E. 2009. A quantitative RNAi screen for JNK modifiers identifies Pvr as a novel regulator of Drosophila immune signaling. *PLoS Pathog*, 5, e1000655.
- BREIG, O., BRAS, S., MARTINEZ SORIA, N., OSMAN, D., HEIDENREICH, O., HAENLIN, M. & WALTZER, L. 2014. Pontin is a critical regulator for AML1-ETO-induced leukemia. *Leukemia*, 28, 1271-9.
- BRUCKNER, K., KOCKEL, L., DUCHEK, P., LUQUE, C. M., RORTH, P. & PERRIMON, N. 2004. The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in Drosophila. *Dev Cell*, 7, 73-84.
- CALVO, K. R., SYKES, D. B., PASILLAS, M. P. & KAMPS, M. P. 2002. Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene*, 21, 4247-56.
- CHUNG, K. Y., MORRONE, G., SCHURINGA, J. J., PLASILOVA, M., SHIEH, J. H., ZHANG, Y., ZHOU, P. & MOORE, M. A. 2006. Enforced expression of NUP98-HOXA9 in human CD34(+) cells enhances stem cell proliferation. *Cancer Res*, 66, 11781-91.
- CROZATIER, M. & VINCENT, A. 2011. Drosophila: a model for studying genetic and molecular aspects of haematopoiesis and associated leukaemias. *Dis Model Mech*, 4, 439-45.
- DE BRAEKELEER, E., DOUET-GUILBERT, N., BASINKO, A., LE BRIS, M. J., MOREL, F. & DE BRAEKELEER, M. 2014. Hox gene dysregulation in acute myeloid leukemia. *Future Oncol*, 10, 475-95.
- DIETZL, G., CHEN, D., SCHNORRER, F., SU, K. C., BARINOVA, Y., FELLNER, M., GASSER, B., KINSEY, K., OPPEL, S., SCHEIBLAUER, S., COUTO, A., MARRA, V., KELEMAN, K. & DICKSON, B. J. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila. *Nature*, 448, 151-6.
- DOEPFNER, K. T., BOLLER, D. & ARCARO, A. 2007. Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 63, 215-30.
- DRAGOJLOVIC-MUNTHER, M. & MARTINEZ-AGOSTO, J. A. 2012. Multifaceted roles of PTEN and TSC orchestrate growth and differentiation of Drosophila blood progenitors. *Development*, 139, 3752-63.

- DUCHEK, P., SOMOGYI, K., JEKELY, G., BECCARI, S. & RORTH, P. 2001. Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell*, 107, 17-26.
- EVANS, C.J., OLSON, J.M., NGO, K.T., KIM, E., LEE, N.E., KUOY, E., PATANANAN, A.N., SITZ, D., TRAN, P., DO, M.T., et al. 2009. G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nature methods*, 6, 603-605.
- FERRARA, F. & SCHIFFER, C. A. 2013. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*, 381, 484-95.
- FORRESTER, A. M., GRABHER, C., MCBRIDE, E. R., BOYD, E. R., VIGERSTAD, M. H., EDGAR, A., KAI, F. B., DA'AS, S. I., PAYNE, E., LOOK, A. T. & BERMAN, J. N. 2011. NUP98-HOXA9-transgenic zebrafish develop a myeloproliferative neoplasm and provide new insight into mechanisms of myeloid leukaemogenesis. *Br J Haematol*, 155, 167-81.
- GHOSH, S., SINGH, A., MANDAL, S. & MANDAL, L. 2015. Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. *Dev Cell*, 33, 478-88.
- GOTO, A., KADOWAKI, T. & KITAGAWA, Y. 2003. *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol*, 264, 582-91.
- GOUGH, S. M., SLAPE, C. I. & APLAN, P. D. 2011. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood*, 118, 6247-57.
- GRIMWADE, D., IVEY, A. & HUNTLY, B. J. 2016. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*, 127, 29-41.
- HOLZ, A., BOSSINGER, B., STRASSER, T., JANNING, W. & KLAPPER, R. 2003. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development*, 130, 4955-62.
- HOMBRIA, J. C., BROWN, S., HADER, S. & ZEIDLER, M. P. 2005. Characterisation of Upd2, a *Drosophila* JAK/STAT pathway ligand. *Dev Biol*, 288, 420-33.
- HONTI, V., CINEGE, G., CSORDAS, G., KURUCZ, E., ZSAMBOKI, J., EVANS, C. J., BANERJEE, U. & ANDO, I. 2013. Variation of NimC1 expression in *Drosophila* stocks and transgenic strains. *Fly (Austin)*, 7, 263-6.

- HONTI, V., CSORDAS, G., KURUCZ, E., MARKUS, R. & ANDO, I. 2014. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: Hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev Comp Immunol*, 42, 47-56.
- IWASAKI, M., KUWATA, T., YAMAZAKI, Y., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G., OSATO, M., ITO, Y., KROON, E., SAUVAGEAU, G. & NAKAMURA, T. 2005. Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model. *Blood*, 105, 784-93.
- JUNG, S. H., EVANS, C. J., UEMURA, C. & BANERJEE, U. 2005. The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development*, 132, 2521-33.
- KARIM, F. D. & RUBIN, G. M. 1998. Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues. *Development*, 125, 1-9.
- KASPER, L. H., BRINDLE, P. K., SCHNABEL, C. A., PRITCHARD, C. E., CLEARY, M. L. & VAN DEURSEN, J. M. 1999. CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol*, 19, 764-76.
- KROON, E., KROSL, J., THORSTEINSDOTTIR, U., BABAN, S., BUCHBERG, A. M. & SAUVAGEAU, G. 1998. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J*, 17, 3714-25.
- KROON, E., THORSTEINSDOTTIR, U., MAYOTTE, N., NAKAMURA, T. & SAUVAGEAU, G. 2001. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J*, 20, 350-61.
- KRZEMIEN, J., CROZATIER, M. & VINCENT, A. 2010a. Ontogeny of the *Drosophila* larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism. *Int J Dev Biol*, 54, 1117-25.
- KRZEMIEN, J., DUBOIS, L., MAKKI, R., MEISTER, M., VINCENT, A. & CROZATIER, M. 2007. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature*, 446, 325-8.
- KRZEMIEN, J., OYALLON, J., CROZATIER, M. & VINCENT, A. 2010b. Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Dev Biol*, 346, 310-9.



- KURUCZ, E., MARKUS, R., ZSAMBOKI, J., FOLKL-MEDZIHRADESKY, K., DARULA, Z., VILMOS, P., UDVARDY, A., KRAUSZ, I., LUKACSOVICH, T., GATEFF, E., ZETTERVALL, C. J., HULTMARK, D. & ANDO, I. 2007. Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr Biol*, 17, 649-54.
- LADAM, F. & SAGERSTROM, C. G. 2013. Hox regulation of transcription: More complex(es). *Dev Dyn*.
- LAM, V., TOKUSUMI, T., TOKUSUMI, Y. & SCHULZ, R. A. 2014. bantam miRNA is important for *Drosophila* blood cell homeostasis and a regulator of proliferation in the hematopoietic progenitor niche. *Biochem Biophys Res Commun*.
- LEBESTKY, T., JUNG, S. H. & BANERJEE, U. 2003. A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev*, 17, 348-53.
- MANDAL, L., MARTINEZ-AGOSTO, J. A., EVANS, C. J., HARTENSTEIN, V. & BANERJEE, U. 2007. A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature*, 446, 320-4.
- MONDAL, B. C., MUKHERJEE, T., MANDAL, L., EVANS, C. J., SINENKO, S. A., MARTINEZ-AGOSTO, J. A. & BANERJEE, U. 2011. Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell*, 147, 1589-600.
- MONDAL, B. C., SHIM, J., EVANS, C. J. & BANERJEE, U. 2014. Pvr expression regulators in equilibrium signal control and maintenance of *Drosophila* blood progenitors. *Elife*, 3, e03626.
- OSMAN, D., GOBERT, V., PONTAN, F., HEIDENREICH, O., HAENLIN, M. & WALTZER, L. 2009. A *Drosophila* model identifies calpains as modulators of the human leukemogenic fusion protein AML1-ETO. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 12043-8.
- OWUSU-ANSAH, E. & BANERJEE, U. 2009. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, 461, 537-41.
- OYALLON, J., VANZO, N., KRZEMIEN, J., MORIN-POULARD, I., VINCENT, A. & CROZATIER, M. 2016. Two Independent Functions of Collier/Early B Cell Factor in the Control of *Drosophila* Blood Cell Homeostasis. *PLoS One*, 11, e0148978.

- PAI, C. Y., KUO, T. S., JAW, T. J., KURANT, E., CHEN, C. T., BESSARAB, D. A., SALZBERG, A. & SUN, Y. H. 1998. The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev*, 12, 435-46.
- PARSONS, B. & FOLEY, E. 2013. The *Drosophila* platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor-receptor related (Pvr) protein ligands Pvf2 and Pvf3 control hemocyte viability and invasive migration. *J Biol Chem*, 288, 20173-83.
- PENNETIER, D., OYALLON, J., MORIN-POULARD, I., DEJEAN, S., VINCENT, A. & CROZATIER, M. 2012. Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 3389-94.
- REITMAN, Z. J., SINENKO, S. A., SPANA, E. P. & YAN, H. 2015. Genetic dissection of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutants and D-2-hydroxyglutarate in *Drosophila*. *Blood*, 125, 336-45.
- ROSIN, D., SCHEJTER, E., VOLK, T. & SHILO, B. Z. 2004. Apical accumulation of the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor ligands provides a mechanism for triggering localized actin polymerization. *Development*, 131, 1939-48.
- SHAH, C. A., BEI, L., WANG, H., PLATANIAS, L. C. & EKLUND, E. A. 2012. HoxA10 protein regulates transcription of gene encoding fibroblast growth factor 2 (FGF2) in myeloid cells. *J Biol Chem*, 287, 18230-48.
- SINENKO, S. A., HUNG, T., MOROZ, T., TRAN, Q. M., SIDHU, S., CHENEY, M. D., SPECK, N. A. & BANERJEE, U. 2010. Genetic manipulation of AML1-ETO-induced expansion of hematopoietic precursors in a *Drosophila* model. *Blood*, 116, 4612-20.
- SINENKO, S. A. & MATHEY-PREVOT, B. 2004. Increased expression of *Drosophila* tetraspanin, Tsp68C, suppresses the abnormal proliferation of ytr-deficient and Ras/Raf-activated hemocytes. *Oncogene*, 23, 9120-8.
- SINENKO, S. A., SHIM, J. & BANERJEE, U. 2012. Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*. *EMBO Rep*, 13, 83-9.
- STEGER, J., FULLER, E., GARCIA-CUELLAR, M. P., HETZNER, K. & SLANY, R. K. 2015. Insulin-like growth factor 1 is a direct HOXA9 target important for hematopoietic transformation. *Leukemia*, 29, 901-8.

- STOFANKO, M., KWON, S. Y. & BADENHORST, P. 2008. A misexpression screen to identify regulators of *Drosophila* larval hemocyte development. *Genetics*, 180, 253-67.
- STRAMER, B., WOOD, W., GALKO, M. J., REDD, M. J., JACINTO, A., PARKHURST, S. M. & MARTIN, P. 2005. Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J Cell Biol*, 168, 567-73.
- TAKEDA, A., GOOLSBY, C. & YASEEN, N. R. 2006. NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells. *Cancer Res*, 66, 6628-37.
- TERRIENTE-FELIX, A., LI, J., COLLINS, S., MULLIGAN, A., REEKIE, I., BERNARD, F., KREJCI, A. & BRAY, S. 2013. Notch cooperates with Lozenge/Runx to lock haemocytes into a differentiation programme. *Development*, 140, 926-37.
- THORSTEINSDOTTIR, U., KROON, E., JEROME, L., BLASI, F. & SAUVAGEAU, G. 2001. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*, 21, 224-34.
- TOKUSUMI, Y., TOKUSUMI, T., SHOUE, D. A. & SCHULZ, R. A. 2012. Gene regulatory networks controlling hematopoietic progenitor niche cell production and differentiation in the *Drosophila* lymph gland. *PLoS One*, 7, e41604.
- TSUZUKI, S., MATSUMOTO, H., FURIHATA, S., RYUDA, M., TANAKA, H., SUNG, E. J., BIRD, G. S., ZHOU, Y., SHEARS, S. B. & HAYAKAWA, Y. 2014. Switching between humoral and cellular immune responses in *Drosophila* is guided by the cytokine GBP. *Nat Commun*, 5, 4628.
- WELLIK, D. M. 2011. Hox genes and kidney development. *Pediatr Nephrol*, 26, 1559-65.
- WOUTERS, B. J. & DELWEL, R. 2016. Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*, 127, 42-52.
- YASSIN, E. R., SARMA, N. J., ABDUL-NABI, A. M., DOMBROWSKI, J., HAN, Y., TAKEDA, A. & YASEEN, N. R. 2009. Dissection of the transformation of primary human hematopoietic cells by the oncogene NUP98-HOXA9. *PLoS One*, 4, e6719.
- ZETTERVALL, C. J., ANDERL, I., WILLIAMS, M. J., PALMER, R., KURUCZ, E., ANDO, I. & HULTMARK, D. 2004. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14192-7.

### **3 A screen for modifiers of human NUP98-HOXA9 in *Drosophila* reveals its impact on epigenetic regulation**

Gwenaëlle Gavory<sup>1,\*</sup>, Caroline Baril<sup>1,\*</sup>, Gino Laberge<sup>1,\*</sup>, Gawa Bidla<sup>1</sup>, Surapong Koonpaew<sup>1</sup>, Thomas Sonea<sup>1</sup>, Guy Sauvageau<sup>1,2</sup>, and Marc Therrien<sup>1,3,§</sup>

<sup>1</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer

Université de Montréal. C.P. 6128, Succursale Centre-Ville. Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>2</sup>Département de médecine, Université de Montréal

<sup>3</sup>Département de pathologie et de biologie cellulaire, Université de Montréal

\*These authors contributed equally to this work

§To whom correspondence should be addressed

Tel.: (514) 343-7837

Fax.: (514) 343-6843

Email : [marc.therrien@umontreal.ca](mailto:marc.therrien@umontreal.ca)

Running title: A genetic screen for modifiers of NUP98-HOXA9 in *Drosophila*

Manuscript to be submitted shortly

L'objectif du projet était d'utiliser la drosophile afin d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction de l'oncoprotéine NA9. L'idée principale était d'utiliser l'œil de la mouche comme outil pour générer un crible génétique modificateur. Dans un premier temps, il était nécessaire d'avoir un phénotype NA9 spécifique qui servirait de base pour le crible. La première partie du papier présente la caractérisation du phénotype induit par l'expression de NA9 au cours du développement de l'œil alors que la seconde présente le crible et ses résultats.

### **Contribution détaillée de l'auteur :**

Contributions expérimentales : Conception et production des données de la figure 3 pour quantifier l'effet de tous les allèles identifiés dans le crible. Production de l'ensemble des données de qPCR. La majorité des expériences ont été réalisées conjointement avec CB.

Contribution au manuscrit : Élaboration et rédaction du manuscrit. Montage et assemblage des figures.

### **Contributions détaillées des co-auteurs :**

Le projet a initialement été élaboré par GL, GB, SK et MT. L'expérience de criblage a par ailleurs été réalisée par GL, GB et SK. Les données expérimentales contenues dans les figures 1 et S1 ont été fournies par GL. Les données de la figure S2 sur la voie Hippo ont été fournies par SK. La majorité des expériences ont été réalisées conjointement avec CB. CB a testé l'effet des allèles sur le promoteur *ey-Gal4* (figure S4). GG a assisté CB à l'élaboration et la collecte des données d'immunofluorescence de la figure S6. CB a participé au montage des figures. CB et MT ont donné leurs commentaires sur le manuscrit et suggéré des modifications. MT a contribué à la fois à l'élaboration et à la supervision des travaux de recherche ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

### 3.1 Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a blood disorder characterized by the accumulation of immature myeloid blasts in the bone marrow and blood. Several cytogenetic abnormalities have been associated with AML. Among these is the *NUP98-HOXA9* (*NA9*) translocation that fuses the FG-repeat segment of nucleoporin NUP98 to the homeodomain of the transcription factor HOXA9. Despite multiple studies, the mechanisms underlying NA9-induced leukemia remains poorly defined. We recently showed that human NA9 is active in *Drosophila*. Here, we conducted a screen for genetic modifiers of NA9 in the fly eye to identify functional modulators potentially relevant in AML. We delineated 29 complementation groups of mutations that dominantly altered NA9 activity, including some that correspond to genes with mammalian homologs known to influence NA9 activity, thus validating the approach. Interestingly, the modifiers encompassed a diversity of functional categories, such as chromatin remodeling, nuclear export, cell polarity, and translation. Moreover, by characterizing one group of enhancers, namely *Enhancer of Polycomb* (*E(Pc)*), we discovered that NA9 expression promotes the transdetermination of eye cells into wing cells, which indicates a role in epigenetic reprogramming. Together, this work identifies a variety of modulators of NA9 function suggesting that NA9 expression has diverse cellular effects, including epigenetic alteration.

### 3.2 Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common form of acute leukemia affecting adults, with an increasing incidence with age (Shysh et al., 2017; Yamamoto and Goodman, 2008). It is a heterogeneous clonal disorder characterized by a block in myeloid differentiation and an uncontrolled proliferation of abnormal myeloid progenitors that accumulate in the bone marrow and blood. Cytogenetic abnormalities including chromosomal translocations, inversions, and point mutations in key genes are considered to be critical initiating steps in the pathogenesis of AML (Grimwade et al., 2016). Due to advances in genomics, an increasing number of patients can now be categorized into clinicopathological subgroups on the basis of their underlying molecular genetic defects (Roboz, 2011).

Homeobox (HOX) genes are homeodomain-containing transcription factors that are master regulators of development and differentiation (body patterning along the antero-posterior axis and roles in hematopoiesis). HOX genes are highly expressed in the most primitive HSCs and progenitors, while their expression is almost absent in differentiated bone marrow cells (Pineault et al., 2002; Sauvageau et al., 1994). To increase their DNA-binding affinity and specificity, HOX proteins bind DNA cooperatively with co-factors of the TALE (three amino acid loop extension) family of homeodomain proteins (Knoepfler and Kamps, 1995; Shen et al., 1997; Shen et al., 1999). Numerous studies have shown that *HOX* genes can promote the development of AML by forming chimeric fusions with other genes or by their misexpression often associated with overexpression of their cofactors MEIS and PBX (Alharbi et al., 2013). For example, mice with *HOXA9*-transduced primary bone marrow cells develops AML within 130 days post-transplantation and co-expression with *MEIS1* reduces the leukemia onset to 60 days (Kroon et al., 1998).

NUP98, a member of the nuclear pore family, is one of the most frequent fusion partners of HOX proteins in leukemia (Alharbi et al., 2013). The prototypical translocation NUP98-HOXA9 (NA9) fuses the N-terminal FG-rich repeat portion of NUP98 with the C-terminal part of HOXA9 that comprises a PBX-Interacting Motif (PIM) and the homeodomain (Borrow et al., 1996; Nakamura et al., 1996). Mice transplanted with bone marrow cells expressing *NA9* acquire a myeloproliferative disease (MPD) and eventually succumb to AML after a long latency. As for *HOXA9*, *NA9*-induced leukemia onset is also greatly accelerated by *MEIS1* co-expression and likewise promotes the proliferation of undifferentiated murine hematopoietic progenitors (Calvo et al., 2002; Kroon et al., 2001)

Mechanistic insights into NA9 activity was originally gained by conducting structure-function analysis studies in mammalian cell-based assays and murine models of AML (Bai et al., 2006; Kasper et al., 1999). These studies revealed that NA9 works as an aberrant transcription factor whereby the homeodomain binds to DNA while the NUP98 moiety serves as a transcription activation domain. NUP98 FG repeats appear to confer transcriptional activity in part through interaction with the histone deacetylase HDAC1 as well as the transcriptional co-activators CREB-binding protein (CBP) and p300 (Bai et al., 2006; Kasper et al., 1999). Moreover, NA9 was found to interfere with nucleocytoplasmic trafficking by sequestering the nuclear export factors RAE1, Exportin1 (XPO1), and TAP through

interaction with the GLEBS domain and FG repeats of the NUP98 portion (Dogan et al., 2011; Oka et al., 2016; Salsi et al., 2016; Salsi et al., 2014; Takeda et al., 2010). More recently, MLL1 was shown to contribute to NA9 oncogenicity by recruiting it to the *HOXA/B* locus via an interaction with the FG repeats, thereby leading to induction of *HOXA/B* gene expression (Shima et al., 2017; Xu et al., 2016).

The fruit fly *Drosophila melanogaster* is a powerful model system. Providing a wide range of genetic, cellular and molecular biology tools, it has been widely exploited for elucidating basic biological processes. In the last three decades, owing to the high conservation of biological pathways and the fact that 75% of human disease genes have orthologs in flies, multiple fly models have emerged to study various human diseases (Bier, 2005). As it is not required for viability and fertility, the fly compound eye is a system of choice for biological investigations. Emerging from an epithelium known as the eye-antennal imaginal disc, this tissue is a highly organized structure of approximately 750 ommatidia comprised of a repeating unit of 20 cells arranged in hexagonal arrays (Waddington and Perry, 1960). This organ is eminently amenable to genetic investigations and has revealed over the years countless signaling mechanisms and developmental processes that are frequently conserved across metazoans.

The molecular events involved in the leukemogenic activity of *NUP98-HOXA9* (*NA9*) in humans remain poorly understood. Since closely related NUP98 and HOXA9 homologs are present in *Drosophila* (NUP98 and Abd-A/B), we reasoned that over-expression of the human *NA9* in fly eyes may disrupt protein networks related to those affected in mammalian cells. We previously showed that expression of a human *NA9* cDNA in the lymph gland of *Drosophila* larvae triggers an enlargement of the primary lobes owing to the premature differentiation of hemocyte progenitors followed by their proliferation (Baril et al., 2017). Characterization of NA9 activity in this context revealed a requirement for the same functional elements of the oncoprotein as those originally delineated using mammalian models (Calvo et al., 2002; Kasper et al., 1999; Kroon et al., 2001; Yassin et al., 2009) (and see below). We concluded that *Drosophila* can be advantageously exploited to decipher the mechanism of action of NA9 and thus could provide relevant information with respect to its leukemogenic properties (Baril et al., 2017).



Here, we show that expression of human NA9 during *Drosophila* eye development induces a specific phenotype that relies on the same functional elements of the oncoprotein as those originally described in mammals and in the *Drosophila* lymph gland. We took advantage of this phenotype to conduct a dominant modifier screen to isolate novel modulators of NA9 activity. This effort uncovered 29 complementation groups of alleles as dominant modifiers. Among these, three genes (*Rael*, *emb* and *hth*) were found to have mammalian homologs (*RAE1*, *XPO1* and *MEIS1/2*) previously reported to influence NA9 leukemogenic activity (Dogan et al., 2011; Funasaka et al., 2011; Kroon et al., 2001; Oka et al., 2016; Takeda et al., 2010). Interestingly, the screen uncovered a diversity of modifiers, such as genes involved in chromatin remodeling, nuclear export, cell polarity, cytoskeletal organization and translation, which suggested that NA9 alters a multiplicity of cellular processes. Unexpectedly, by characterizing one group of enhancers, namely *Enhancer of Polycomb (E(Pc))*, which encodes a member of the NuA4/Tip60 chromatin remodeling complex, we found that NA9 expression induces cells within the dorsal compartment of the eye imaginal disc to adopt the wing fate. This phenomenon, called eye-to-wing transdetermination, was exacerbated by depleting *E(Pc)* as well as other subunits of the Tip60 complex. This observation strongly suggests that NA9 interferes with epigenetic regulation. We also demonstrated that *E(Pc)* modulates the hyperplastic activity of NA9 in the lymph gland, thus connecting NA9 and the Tip60 complex in another cell decision event. Our results suggest that NA9 impacts various biological processes in flies, including epigenetic regulation, which together might be linked to its leukemogenic potential.

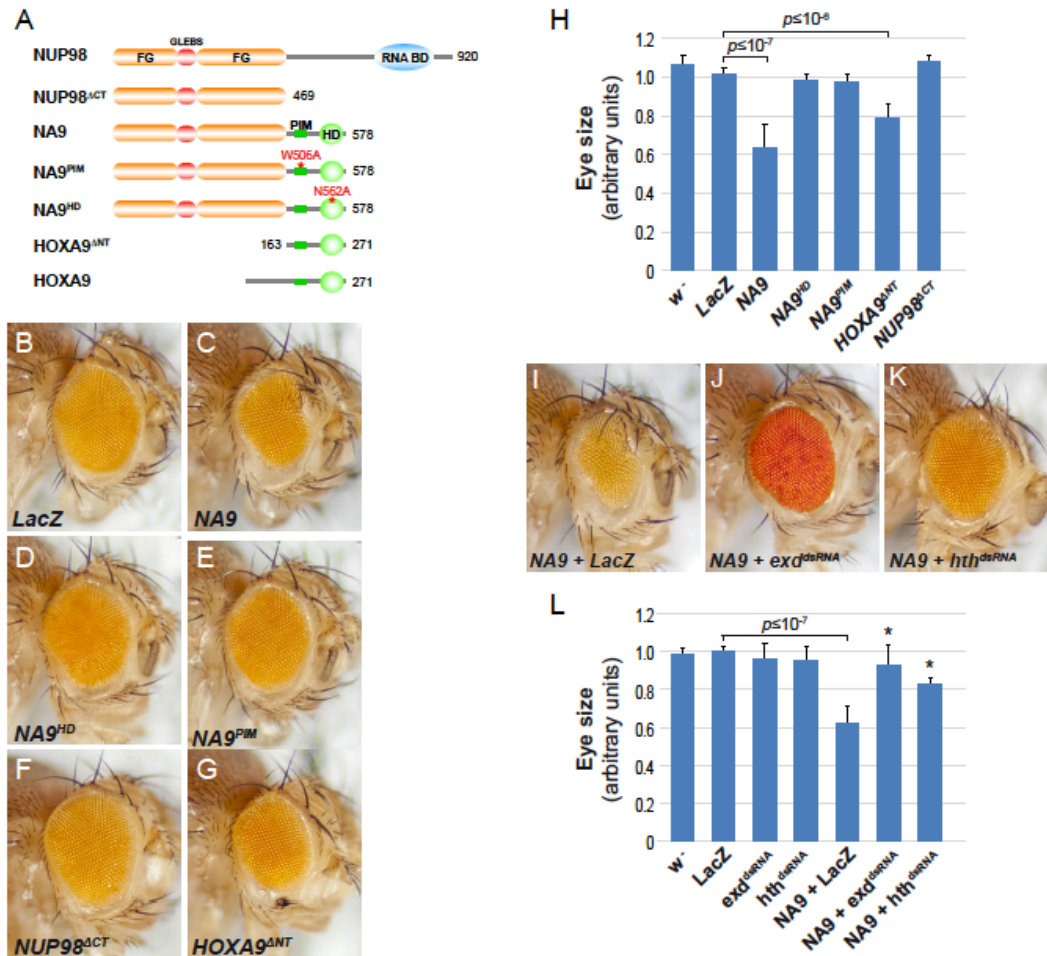
## 3.3 Results

### 3.3.1 Expression of NA9 disrupts eye development in an *exd* and *hth* dependent manner

To gain insights into NA9 function, we sought to identify modulators of its activity by conducting a genetic screen for dominant modifiers of a NA9-induced phenotype. We reasoned that this approach should enable the isolation of heterozygous mutations in genes encoding factors that promote or, conversely, oppose NA9 activity. To facilitate the procedure, we looked for NA9-mediated developmental perturbations observable in adult flies that did not overtly compromise viability or fertility. To this end, we used an *eyeless (ey)-Gal4* driver to specifically target the expression of a *UAS-NA9* construct during eye development, which is a non-vital organ in laboratory conditions. This resulted in a “small eye” phenotype characterized by an expansion of the antero-dorsal and ventral head cuticles at the expense of the eye field (Figure 1A-C).

We next assessed the specificity of the NA9 eye phenotype to confirm that the underlying basis is related to known properties of the NA9 oncoprotein. Studies in mammals have shown that NA9 leukemogenic activity depends on the FG-rich repeats of NUP98 and the DNA-binding activity of the HOXA9 homeodomain (Kasper et al., 1999; Kroon et al., 2001; Yassin et al., 2009). The PBX-interacting motif (PIM) included within the C-terminal portion of HOXA9 was also shown to be required for the transforming activity of NA9 in NIH 3T3 fibroblasts (Calvo et al., 2002; Kasper et al., 1999). We recently reported that the same functional elements were required to elicit lymph gland overgrowth in fly larvae, thus suggesting a mechanistic basis similar to that of mammalian cells (Baril et al., 2017). To determine whether this also holds true in the eye, we tested the activity of a panel of *UAS-NA9* variants (Figure 1A and Figure S1) driven by *ey-Gal4*. As shown in Figure 1B-F and quantified in Figure 1H, deletion of the HOXA9 moiety (NUP98<sup>CT</sup>) or impairment of either the DNA-binding domain (NA9<sup>HD</sup>) or the PIM motif (NA9<sup>PIM</sup>) abolished the phenotype. In contrast, while deletion of the NUP98 moiety (HOXA9<sup>NT</sup>) fully prevented the expansion of the antero-dorsal cuticle expansion, it still led to eye size reduction (Figure 1G), albeit less effectively than the full NA9 protein (Figure 1H). Together, this data indicates that the NA9

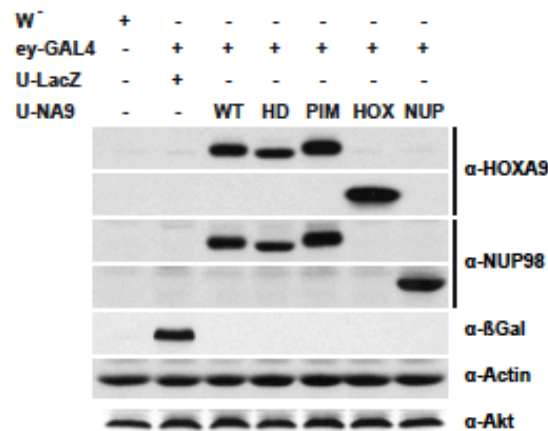
eye phenotype depends on the known functional elements of the oncoprotein. It also suggests that the isolated HOXA9 moiety impacts, but to a lesser degree, eye development independently of the N-terminal NUP98 portion.



**Figure 3.1. NUP98-HOXA9 disrupts eye development in an *exd* and *hth* dependent manner.**

(A) Schematic representation of the NUP98-HOXA9 variants used in this study. The *W506A* mutation in the PIM domain (Pbx interaction motif) prevents binding of the HOX cofactor Pbx. The *N562A* mutation in the HD domain (Homeodomain) disrupts DNA-binding. (B-G) Widefield images of adult *Drosophila* eyes overexpressing the different NA9 variants with the *ey-Gal4* driver. Genotypes are: (B) *ey-Gal4; UAS-LacZ*, (C) *ey-Gal4/ UAS-NA9*, (D) *ey-Gal4/*

*UAS-NA9<sup>W506A</sup>* (*NA9<sup>PIM</sup>*), (E) *ey-Gal4; UAS-NA9<sup>N562A</sup>* (*NA9<sup>HD</sup>*), (F) *ey-Gal4; UAS-NUP98<sup>ACT</sup>* (*NUP98<sup>ACT</sup>*), (G) *ey-Gal4/ UAS-HOXA9<sup>ANT</sup>* (*HOXA9<sup>ANT</sup>*). (H) Quantification of eye size of the indicated genotypes. Error bars represent Standard Deviation (SD) from at least 10 independent eyes for each genotype. \* indicates a p-value < 10<sup>-6</sup>, when the corresponding samples were compared to *ey-GAL4, UAS-NA9* (Student's t test). (I-K) Widefield images of adult *Drosophila* eyes. Genotypes are: (I) *ey-Gal4/ UAS-NA9; UAS-LacZ*, (J) *ey-Gal4/ UAS-NA9; UAS-exd<sup>dsRNA</sup>* (*NA9 + exd<sup>dsRNA</sup>*), (K) *ey-Gal4/ UAS-NA9; UAS-hth<sup>dsRNA</sup>* (*NA9 + hth<sup>dsRNA</sup>*). (L) Quantification of eye size for the indicated genotype. Error bars represent Standard Deviation (SD) from at least 10 independent eyes for each indicated genotype. \* indicates a p-value < 10<sup>-4</sup> when the corresponding samples were compared to *ey-GAL4/ UAS-NA9; UAS-LacZ* (Student's t test).

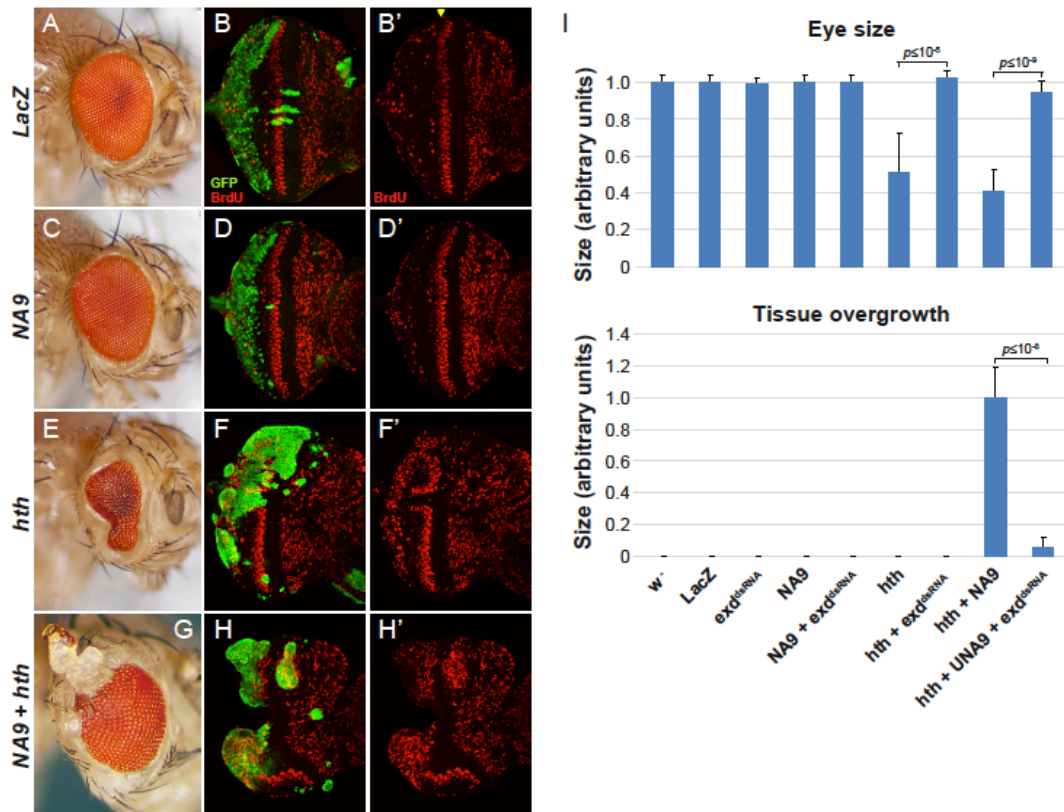


**Figure 3.S1. NA9 variants are globally equally expressed in whole larval cell extracts.**

Western-blot for monitoring protein expression of the NA9 variants in whole larval cell extracts. The *ey-Gal4* driver was used to drive the overexpression of *UAS-LacZ* (row 2) and the different NA9 variants: *UAS-NA9<sup>WT</sup>* (row 3), *UAS-NA9<sup>HD</sup>* (row 4), *UAS-NA9<sup>PIM</sup>* (row 5), *UAS-HOXA9<sup>ANT</sup>* (row 6) and *UAS-NUP98<sup>ACT</sup>* (row 7). The expression levels of the variants were monitored with an antibody against HOXA9 and NUP98. Actin and Akt levels were used as loading controls.

HOXA9-dependent leukemia has been shown to require the activity of the TALE transcription factors PBX and MEIS (Garcia-Cuellar et al., 2015; Kroon et al., 1998; Li et al., 2013; Thorsteinsdottir et al., 1999). We wondered whether the eye phenotype also relied on the two respective TALE orthologues in flies, namely, Extradenticle (EXD) and Homothorax (HTH). To test this possibility, we assessed the consequence of knocking down *exd* and *hth* transcripts by RNAi. As shown in Figure 1I-L, their individual depletion strongly suppressed the NA9 eye phenotype, but had no effect on eye size when tested alone. These results demonstrate that NA9 activity in the eye depends on the endogenous HOX co-factors EXD and HTH.

Another observation made in mammalian leukemia models is the ability of TALE co-factors to accelerate AML onset when co-expressed along with HOXA9 (Kroon et al., 1998; Li et al., 2013; Thorne and Milne, 2015). Likewise, we previously reported that co-expression of NA9 and HTH in the developing lymph gland synergistically promotes tissue overgrowth (Baril et al., 2017). We next examined whether a similar collaboration occurs in the eye. The expression of *hth* was largely lethal when driven using *ey-Gal4*. To circumvent this limitation, we used the “Flp-out” system to clonally express *Gal4* and *UAS*-dependent constructs thereby confining expression to fewer cells (Struhl and Basler, 1993). Eye-specific expression was achieved using an *ey-flp* transgenic line that produces clones mostly in the posterior part of the eye disc. With this system, clonal expression of a single copy of the *NA9* transgene had no discernable impact on the adult eye (Figure 2A,C, and I). In contrast, clonal *hth* expression significantly reduced eye size, which could be reverted by co-expressing an *exd* RNAi, which indicated the involvement of endogenous EXD (Figure 2E,I). Markedly, clonal co-expression of *NA9* and *hth* induced prominent cuticular outgrowths with high penetrance in the posterior region of the adult eye, which could be also prevented by knocking down endogenous *exd* transcripts (Figure 2G,I). These results demonstrate the ability of NA9 and HTH to cooperate in an EXD-dependent manner. Taken together, the above findings recapitulate key observations made in mammalian cells and hence support the notion that the NA9-induced eye phenotype is a valid experimental paradigm to identify relevant modulators of NA9.



**Figure 3.2. NUP98-HOXA9 collaborates with HTH during eye development.**

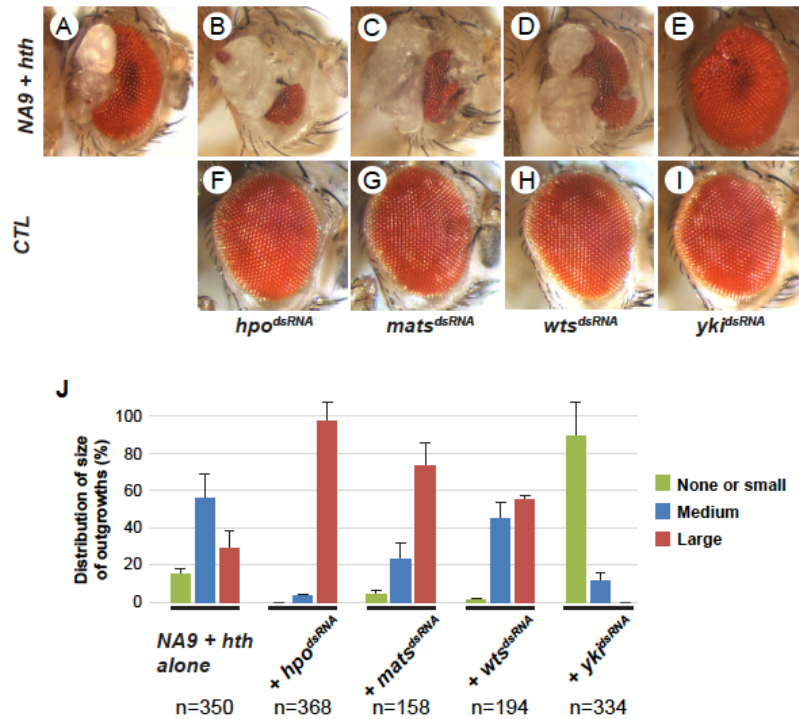
(A-L) Flip/FRT clones marked with GFP were analysed at larval and adult stages. Genotypes are: *ey-flp; Act5C > CD8 > GAL4, UAS-GFP; FO* + the following UAS-constructs: (A-B') *UAS-LacZ*, (C-D') *UAS-NA9*, (E-F') *UAS-GFP-hth* or (G-H') *UAS-NA9, UAS-GFP-hth*; (A, C, E, G) Widefield images of adult *Drosophila* eyes for the indicated genotypes; (B, B', D, D', F, F', H, H') Proliferation assay in eye-antennal discs using BrdU incorporation; (M) Quantification of eye size and tissue overgrowth for the indicated genotypes. Error bars represent SDs from at least 10 independent eyes for each genotype. \* indicates a p-value < 10<sup>-4</sup> when the corresponding samples were compared to *UAS-NA9* (Student's t test).

### 3.3.2 Hippo signaling modulates the NA9-HTH collaboration

During normal eye development, HTH is expressed in the anterior (undifferentiated) part of the eye imaginal disc where it promotes cell proliferation and represses factors involved in eye development (Bessa et al., 2002; Pai et al., 1998). Its expression is repressed immediately ahead and posterior to the morphogenetic furrow (MF) by Dpp signaling to enable the differentiation of cells composing the eye field (Lopes and Casares, 2010). Previous work has shown that ectopic expression of *hth* posterior to the MF is sufficient to drive cell proliferation and that this activity depends on the transcription factors Eyeless (EY) and Teashirt (TSH) as well as on the Hippo pathway via a physical interaction between HTH and the transcriptional co-activator Yorkie (YKI; the orthologue of mammalian YAP/TAZ proteins) (Peng et al., 2009; Zhang et al., 2011). As reported previously, significant cell proliferation (BrdU labeling) was observed in *hth*-expressing clones situated in the posterior part of the eye disc where differentiating cells are normally arrested in the G1 phase of the cell cycle (compare Figure 2B,F). While *hth*-driven hyperplasia was noticeable in eye discs, this never led to head structure outgrowths in adult flies, but only to reduced eye size or no eye phenotypes (not shown) as if *hth*-induced eye disc overgrowths were eliminated during metamorphosis. In contrast, while NA9 and HTH co-expressing cells also exhibited eye disc hyperplasia accompanied by strong BrdU incorporation, their combined activity led to significant cuticular overgrowths in the adults. The underlying reason for this difference is currently not known. Nonetheless, we wondered whether the tumor-like protrusions observed in the adults were also under the influence of Hippo signaling.

The Hippo pathway is known to restrict cell proliferation and cell survival by negatively regulating the activity of YKI, a key transcriptional co-activator that positively controls a set of pro-proliferative and pro-survival target genes (Pan, 2010). We examined the potential influence of Hippo signaling on NA9/HTH activity by individually depleting core components of this pathway in clones co-expressing NA9 and HTH. As shown in Figure S2, depletion of *hpo*, *mats* and *wts* transcripts, which encode three key components of a kinase cascade that inactivate YKI, strongly enhanced the NA9/HTH-induced tissue protrusions. Conversely, *yki* RNAi completely abrogated NA9/HTH-induced outgrowths. Clonal expression of each

dsRNA alone had no effect (Figure S2). These results indicate that Hippo signaling indeed influences NA9/HTH activity in this system.



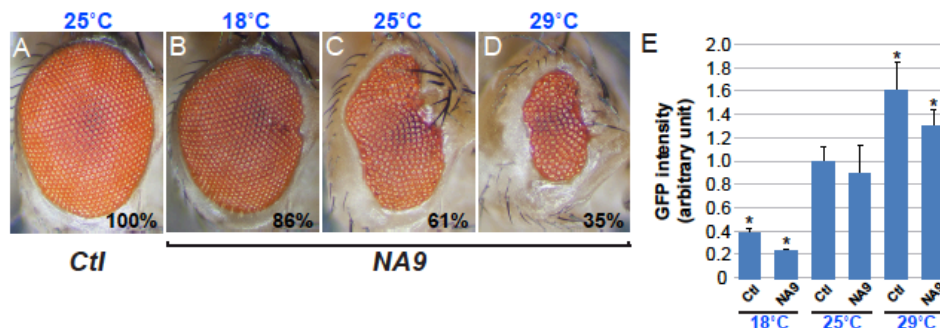
**Figure 3.S2. The NA9-HTH collaboration phenotype depends on the Hippo signalling pathway.**

(A-I) Flip/FRT clones were analysed at adult stages. Genotypes are: *ey-flp; Act5C > CD8 > Gal4, UAS-GFP; FO* + the following UAS-constructs: (A) *UAS-NA9, UAS-GFP-hth* (NA9 + hth), (B) *UAS-NA9, UAS-GFP-hth, UAS-hpo<sup>dsRNA</sup>*, (C) *UAS-NA9, UAS-GFP-hth, UAS-mats<sup>dsRNA</sup>*, (D) *UAS-NA9, UAS-GFP-hth, UAS-wts<sup>dsRNA</sup>*, (E) *UAS-NA9, UAS-hth, UAS-yki<sup>dsRNA</sup>*, (F) *UAS-hpo<sup>dsRNA</sup>*, (G) *UAS-mats<sup>dsRNA</sup>*, (H) *UAS-wts<sup>dsRNA</sup>*, (I) *UAS-yki<sup>dsRNA</sup>*. (J) Phenotype quantification for the indicated genotypes according to its strength. Error bars represent Standard Deviation (SD) from at least 3 independent experiments. “n” indicates the total number of eyes analyzed.



### 3.3.3 Identification of dominant modifiers of NA9 activity

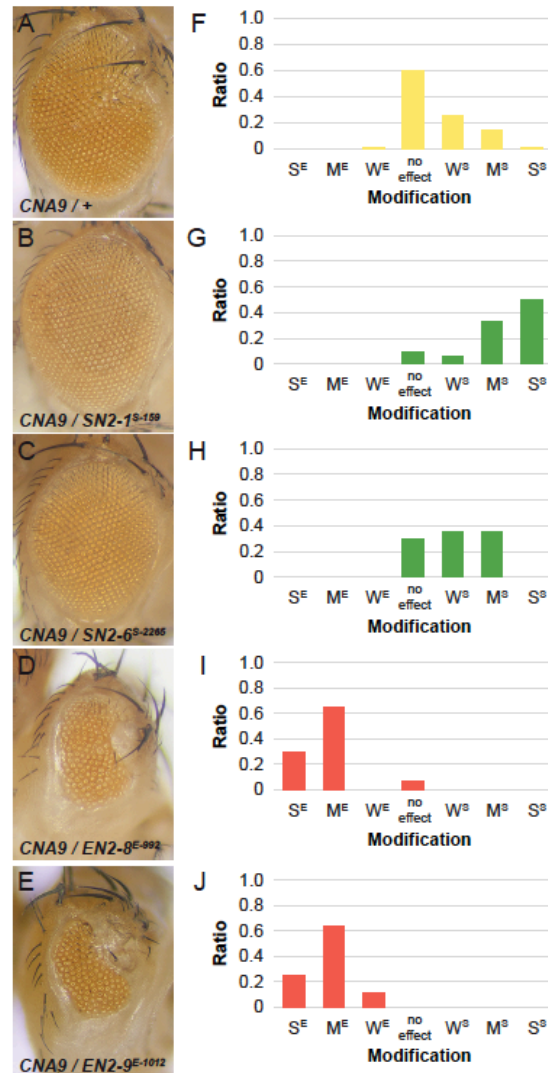
The strength of the NA9 eye phenotype is dosage-sensitive (Figure S3A-E). This observation suggested its suitability as a “readout” to detect second-site mutations that impinge on NA9 activity. Accordingly, specific RNAi lines were identified as potent suppressors or enhancers of the NA9 eye phenotype (Figure 1 and Figure S2). Based on these premises, we conducted an unbiased genetic screen to isolate heterozygous mutations acting as dominant modifiers of NA9. The underlying principle is that a 2-fold reduction of a gene product that modulates NA9 activity, owing to a heterozygous mutation in that gene, should alter the sensitized NA9-mediated eye phenotype. Briefly, the screen was performed by crossing ethyl methanesulfonate (EMS)-mutagenized isogenic (chr. II and III) *white*<sup>-</sup> males to *w*<sup>-</sup> females carrying an *ey-NA9* transgene inserted either on the *CyO* (*CNA9* flies) or *TM3* (*TNA9* flies) balancers. Approximately 100,000 adult F1 progeny were scored for suppressed or enhanced “small eye” phenotypes compared to the parental *NA9*-expressing stock. Only recessive lethal alleles linked to chromosome II or III were kept. Balanced lines were then grouped by complementation tests, which uncovered a total of 29 complementation groups of two or more alleles falling into 16 groups of *Suppressors of NA9* (*SN*) and 13 groups of *Enhancers of NA9* (*EN*) (Tables 1 and 2). Representative examples are shown in Figure 3.



**Figure 3.S3. The strength of the NA9 eye phenotype is dosage sensitive.**

(A-D) Widefield images of adult *Drosophila* eyes of the following genotypes: (A) *ey-Gal4; UAS-GFP* and (B-D) *ey-Gal4, UAS-NA9; UAS-GFP* (B) at 18°C, (C) at 25°C and (D) at 29°C. (E) Quantification of GFP intensity in eye discs of the following genotypes: *ey-Gal4; UAS-*

*GFP* (WT) and *ey-Gal4*, *UAS-NA9*; *UAS-GFP* (NA9). At higher permissive temperature, the NA9 transgene is highly expressed (E) and gives a strongest phenotype (D).

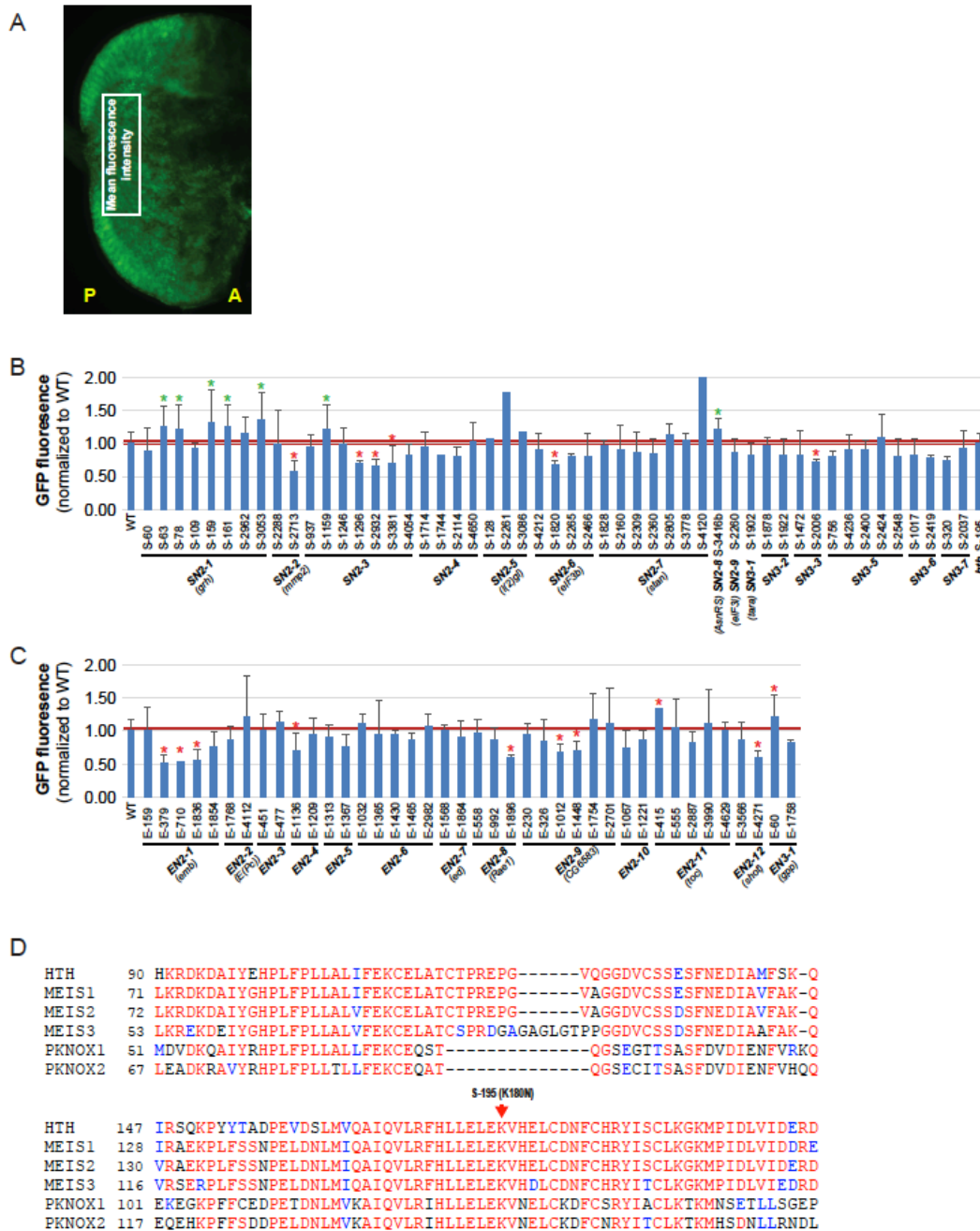


**Figure 3.3. Representative examples of alleles identified in the NA9-dependent screen**

(A-E) Widefield images of adult *Drosophila* eyes and corresponding (F-J) quantification of the phenotype for the following genotypes: (A, F) *CNA9* (*Cyo*, *ey-NA9*), (B, G) *CNA9*/*SN2-1<sup>S-159</sup>*, (C, H) *CNA9*/*SN2-6<sup>S-2265</sup>*, (D, I) *CNA9*/*EN2-8<sup>E-992</sup>*, (E, J) *CNA9*/*EN2-9<sup>E-1012</sup>*. The *CNA9* control as well as two examples of suppressor and enhancer alleles are illustrated respectively, in yellow, green and red.

In addition to genuine modifiers, it is possible that mutations in genes that impinge on the expression level of the NA9 transgene also alter the phenotype and thus be mistakenly identified as NA9 modifiers. To identify such putative false positives, we crossed alleles for each group to flies expressing a *UAS-GFP* construct driven by *ey-Gal4*, which uses a similar *eyeless*-dependent expression system as the one employed in the screen. We then dissected third instar eye imaginal discs and quantified GFP fluorescence intensity as a proxy for transgene expression level (Figure S4A). Although mildly, significant GFP fluorescence variations was noted for some alleles. However, no single group of suppressors or enhancers consistently altered GFP expression (Figure S4B-C). Moreover, for those alleles that modified GFP expression, it did not correlate with their strength at modifying the NA9 phenotype (Annex 2). These results suggest that the NA9 modifiers do not merely act by influencing NA9 transgene expression.

Since the NA9 eye phenotype depended on endogenous EXD and HTH (Figure 1I-K), we reasoned that *exd* and *hth* mutant alleles might have been recovered in the screen. However, the *exd* locus is on the X chromosome and thus those alleles would not have been kept. With respect to *hth*, which is on the third chromosome, none of the groups of modifiers linked to that chromosome corresponded to *hth* mutations as assessed by complementation tests. Interestingly, multiple single hits have also been isolated in the screen and from those balanced on the third chromosome, one single hit suppressor (*S-195*) was found to be allelic to *hth* (Table 1). To confirm allelism, we isolated the genomic DNA of the *hth*<sup>*S-195*</sup> allele and sequenced the exons of the *hth* locus. This approach identified a single nucleotide change creating the K180N missense mutation in the *hth* open-reading frame. The K180 residue is evolutionarily conserved across MEIS-related proteins and falls within a highly conserved area (Figure 4A and Figure S4D) that has previously been shown to act as a PBX/EXD-interaction region (Knoepfler et al., 1997). This result further confirms the role of HTH in mediating the NA9 phenotype and provided unbiased evidence for the ability of the screen to identify functionally relevant modifiers.



**Figure 3.S4. No modifier group consistently alters the NA9 transgene expression.**

(A) Eye primordium of a third instar larval eye/antennal disc with the expression pattern of the *eyless-Gal4* promoter highlighted by GFP fluorescence. The mean fluorescence intensity in the white square is determined for each indicated alleles in a *ey-Gal4,UAS-GFP* (WT) background and the normalized ratio to WT is represented in (B and C) for suppressors and

enhancers, respectively. Error bars represent Standard Deviation (SD) from at least 3 independent experiments. The green and red stars highlight respectively, a statistical increase or decrease in GFP fluorescence intensity. (D) Evolutionary conserved PBX/EXD-interaction region across MEIS-related homeobox proteins. A: anterior, P: posterior.

Groups	Gene	Cytological position	nb. of alleles	Human orthologs
<b>Chromosome II</b>				
SN2-1	<i>grh</i>	54E10-F1	11	GRHL1
SN2-2	<i>mmp2</i>	45F6-46A1	2	MMP17/25
SN2-3		30E1-30E4	6	
SN2-4			4	
SN2-5	<i>l(2)gl</i>	21A5	4	LLGL1
SN2-6	<i>elF3b</i>	54C3	4	EIF3B
SN2-7	<i>stan</i>	47B6-B7	8	CELSR2
SN2-8	<i>AsnRS</i>	37C5	4	NARS
SN2-9	<i>elF3i</i>	25B5	2	EIF3I
EN2-1	<i>emb</i>	29C1-C3	5	XPO1
EN2-2	<i>E(Pc)</i>	47F13-F14	2	EPC1/2
EN2-3			2	
EN2-4			3	
EN2-5			2	
EN2-6			5	
EN2-7	<i>ed</i>	24D4-D6	2	KIRREL1/2/3
EN2-8	<i>Rae1</i>	57F6	3	RAE1
EN2-9	<i>CG6583</i>	33D2	7	Ly6-like <sup>1</sup>
EN2-10			2	
EN2-11	<i>toc</i>	23D1-D2	6	MTUS2
EN2-12	<i>shot</i>	50C6-C9	6	DST/MACF1
<b>Chromosome III</b>				
SN3-1	<i>tara</i>	89B8-B9	2	SERTAD1/2
SN3-2			2	
SN3-3			4	
SN3-4		77C6-77E1	4	
SN3-5		69B4-69C4	5	
SN3-6		90F4-90F4	2	
SN3-7			2	
EN3-1	<i>gpp</i>	83E7	3	DOT1L
	<i>hth</i> <sup>2</sup>	86C1-C3	1	MEIS1

<sup>1</sup> Structural homolog of the Ly6 protein family

<sup>2</sup> Single hit

**Table 3.I. Groups of dominant modifiers of NA9 phenotype on the second and third chromosomes.**

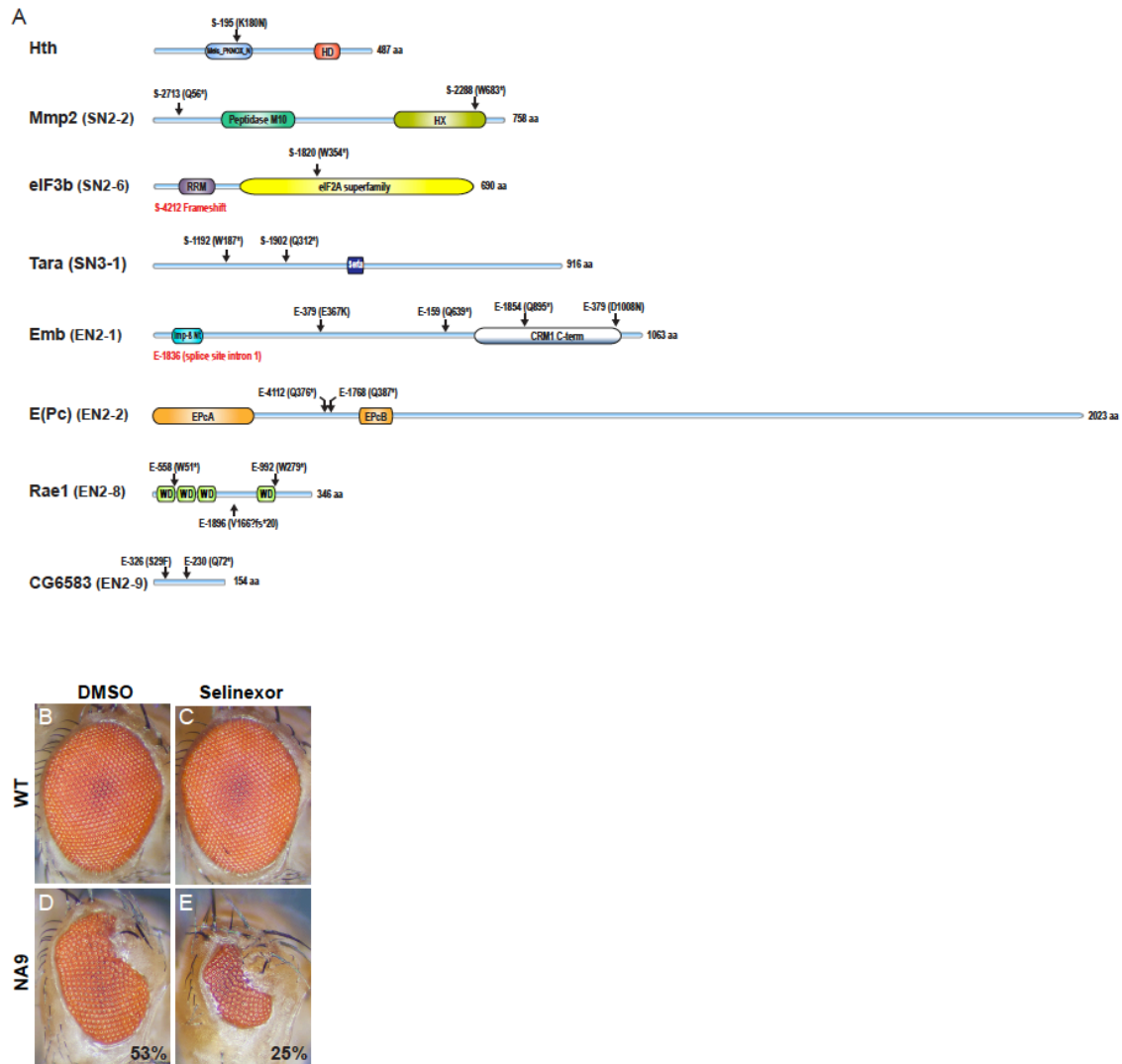
In this table, modifiers are classified following their chromosome location II or III. For each complementation groups of modifiers, are mentioned: the number of alleles, the location on the chromosome or the corresponding gene when identified, a brief summary of gene function and its human ortholog. Complementation groups are depicted as following: SN2- for a suppressor or EN2- for an enhancer on the chromosome II and SN3- for a suppressor or EN3- for an enhancer on the chromosome III.

To define the molecular identity of the groups of NA9 modifiers, we initially mapped them to specific chromosomal locations using the DrosDel deficiency kit collection encompassing chromosomes 2 and 3. From this effort, a total of 20 groups could be readily assigned a specific cytological position based on complementation tests (Table 1). Of these, 8 groups of suppressors and 8 groups of enhancers were then linked to a specific gene following complementation tests with *P-element* insertions or other genetic lesions falling within the areas covered by the deficiencies (Table 1). Among the genes linked to suppressor groups, three are involved in translational control (*eIF3b*, *eIF3i*, and *AsnRS*), two in planar cell polarity (*l(2)gl* and *stan*), and the three others are respectively involved in epithelial morphogenesis (*grh*), tissue invasion (*mmp2*), and E2F activity (*tara*). With respect to the enhancers, we recovered two genes involved in nuclear export (*emb* and *Rae1*), two in epigenetic regulation (*E(Pc)* and *gpp*), while the remainders are respectively involved in cell adhesion (*ed*), cytoskeletal organization (*shot*), mitotic spindle organization (*toc*), and a Ly6 homolog (*CG6583*) of unknown function.

Interestingly, mammalian counterparts for a number of the identified modifiers have previously been linked to NA9 function. For example, a recent study has reported that multiple subunits of the translation initiation factor eIF3 associates specifically with HOXA9, thus suggesting a role in translation (Shestakova et al., 2017). The mammalian homolog of Grappa (GPP), DOT1L has repeatedly been linked to MLL and NUP98-NSD fusion proteins in AML (Deshpande et al., 2014). Perhaps the most convincing cases are *embargoed* (*emb*) and *Rae1*, which respectively encode homologs of the nuclear exportin XPO1 and the RNA-export protein RAE1. These two factors have been shown to respectively interact physically with the

FG repeats and the GLEBS domain of the NUP98 N-terminal region (Dogan et al., 2011; Funasaka et al., 2011; Oka et al., 2016; Takeda et al., 2010; Xu and Powers, 2010). A number of studies have also reported the impact of XPO1 and RAE1 on the leukemogenic activity of NA9 (Funasaka et al., 2011; Oka et al., 2016). In particular, NA9 was suggested to disrupt XPO1 activity and thereby increases the transcriptional activity of a number of transcription factors owing to their uncontrolled accumulation in the nucleus (Dogan et al., 2011; Takeda et al., 2010). Expression of NA9 during eye development might have a similar effect and thus reducing the dose of EMB or RAE1 in eye cells owing to heterozygous mutations might exacerbate their impairment by NA9 expression. Consistent with this interpretation we noted that low doses of selinexor, a selective XPO1 inhibitor, considerably enhanced the NA9 eye phenotype, while it had no effect on WT eyes (Figure 4B).

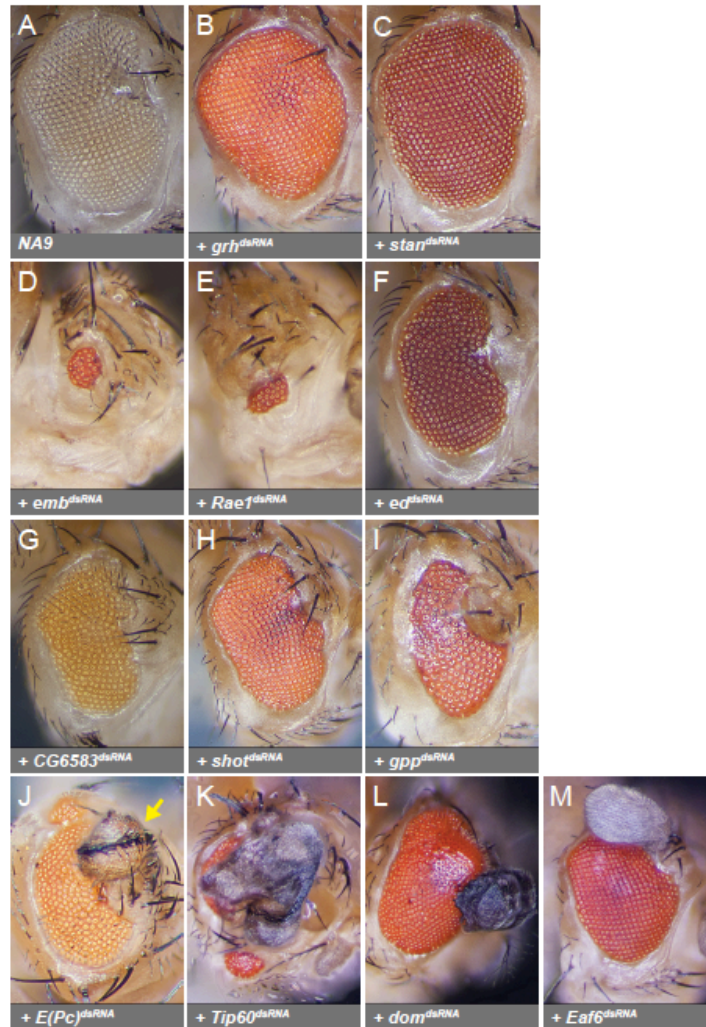
As further evidence of allelism between the modifier groups and specific genes, point mutations were uncovered to date in seven of the candidate genes thus confirming their identity (Figure 4A). A majority of the molecular lesions correspond to premature stop codons (11 out of 15), which suggests that most are loss-of-function alleles. To verify this idea, we tested the effect of depleting by RNAi several of the inferred gene products on the NA9 phenotype. While most dsRNA lines displayed no or mild eye phenotypes when expressed on their own, they all modified the NA9 phenotype as expected (Figure 5 and S5). Specifically, depletion of two suppressor genes, *grh* and *stan*, potently suppressed the NA9 eye phenotype (Figure 5, compare A to B-C). In contrast, depletion of seven enhancer genes, *emb*, *Rae1*, *E(Pc)*, *ed*, *CG6583*, *shot*, and *gpp*, consistently enhanced the NA9 phenotype (Figure 5, compare A to D-J). RNAi-mediated knockdowns were validated either by immunostaining or qPCR analysis (Figure S6). These findings are consistent with the idea that most of the isolated alleles are loss-of-functions. Furthermore, they provide an independent demonstration that the identified genes are *bona fide* modifiers of NA9 activity.



**Figure 3.4. Point mutations identified in eight candidate genes are illustrated. Low doses treatment with the XPO1 inhibitor Selinexor enhance the NA9 phenotype.**

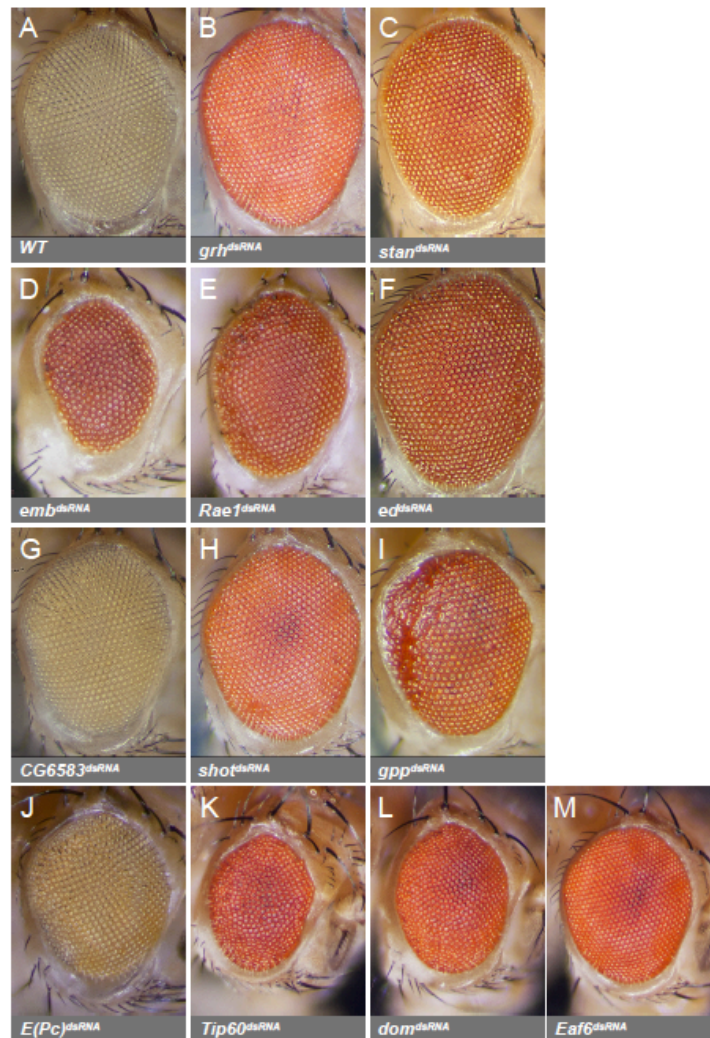
(A) Domain composition of proteins encoded by eight genes identified in the NA9-dependent screen is shown. The position of the resulting amino acid lesions for each sequenced allele is shown on the protein schematics. (B-E) Widefield images of adult *Drosophila* eyes for the following genotypes: (B, C) *ey-Gal4* (WT) and (D, E) *ey-Gal4*, *UAS-NA9* (NA9) treated with DMSO (B and D) or 6,25  $\mu$ M of Selinexor (C and E). Eye size is indicated in percentage compared to WT.





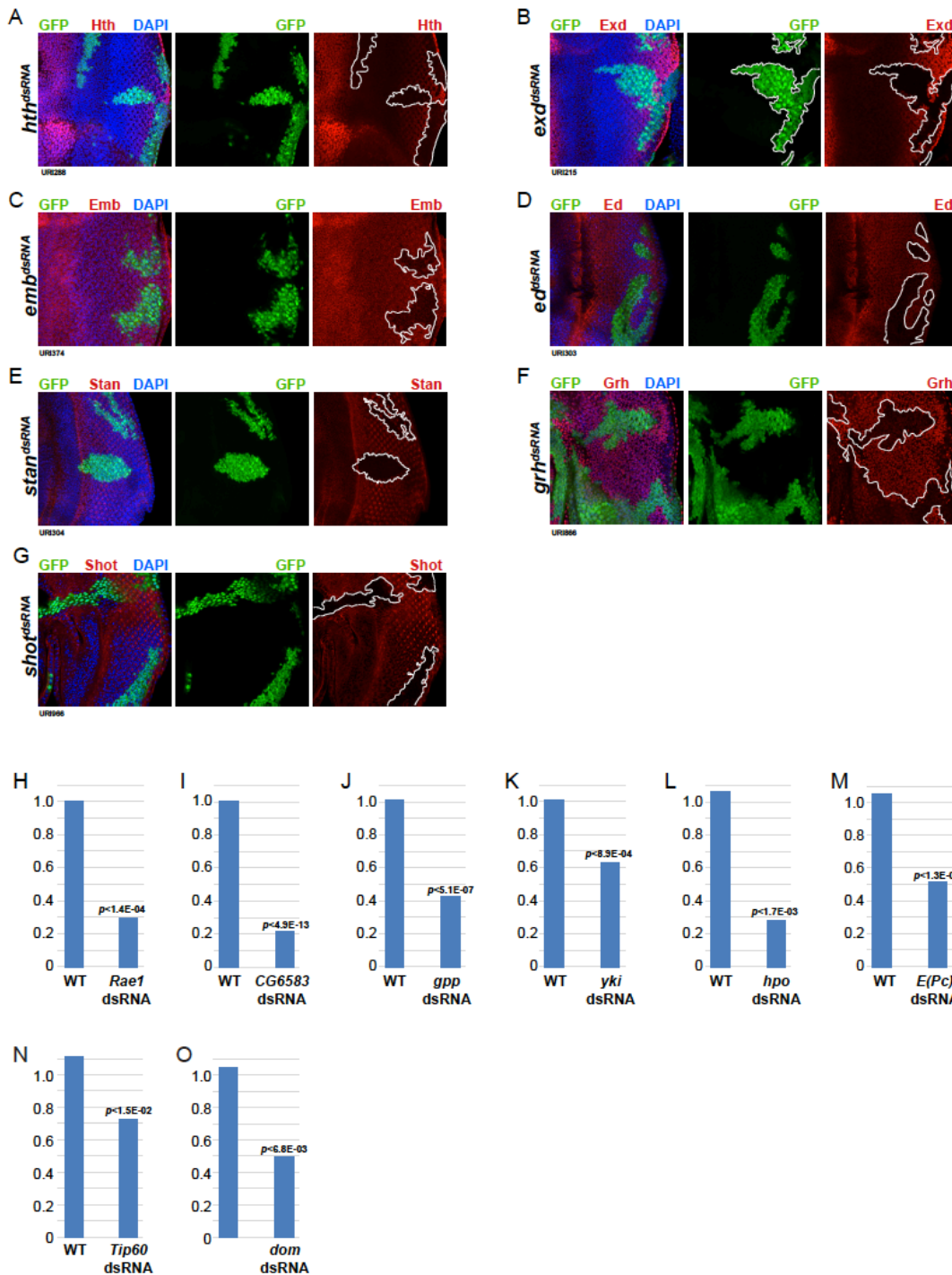
**Figure 3.5. Depletion of nine candidate genes modulates the NA9 phenotype consistently with the alleles effect. The NuA4/Tip60 complex contributes to the NA9 phenotype.**

(A-M) Widefield images of adult *Drosophila* eyes for the following genotypes: (A) *ey-Gal4, UAS-NA9/+ (NA9)*, (B-C) depletion of two suppressor genes of NA9 activity: *ey-Gal4, UAS-NA9/grh<sup>dsRNA</sup>* (B), *ey-Gal4, UAS-NA9/stan<sup>dsRNA</sup>* (C), (D-J) depletion of seven genes enhancing NA9 activity: *ey-Gal4, UAS-NA9/emb<sup>dsRNA</sup>* (D), *ey-Gal4, UAS-NA9/Rael<sup>dsRNA</sup>* (E), *ey-Gal4, UAS-NA9/ed<sup>dsRNA</sup>* (F), *ey-Gal4, UAS-NA9/CG6583<sup>dsRNA</sup>* (G), *ey-Gal4, UAS-NA9/shot<sup>dsRNA</sup>* (H), *ey-Gal4, UAS-NA9/gpp<sup>dsRNA</sup>* (I), *ey-Gal4, UAS-NA9/E(Pc)<sup>dsRNA</sup>* (J), (K-M) depletion of three NuA4/Tip60 complex subunits: *ey-Gal4, UAS-NA9; UAS-Tip60<sup>dsRNA</sup>* (K), *ey-Gal4, UAS-NA9; UAS-dom<sup>dsRNA</sup>* (L), *ey-Gal4, UAS-NA9; UAS-Eaf6<sup>dsRNA</sup>* (M).



**Figure 3.S5. Depletion of candidate genes and NuA4/Tip60 complex subunits does not induce major phenotype in the eye.**

(A-M) Widefield images of adult *Drosophila* eyes for the following genotypes: (A) *ey-Gal4* (*WT*), (B) *ey-Gal4/ grh<sup>dsRNA</sup>*, (C) *ey-Gal4/ stan<sup>dsRNA</sup>*, (D) *ey-Gal4/ emb<sup>dsRNA</sup>*, (E) *ey-Gal4/ Rae1<sup>dsRNA</sup>*, (F) *ey-Gal4/ ed<sup>dsRNA</sup>*, (G) *ey-Gal4/ CG6583<sup>dsRNA</sup>*, (H) *ey-Gal4/ shot<sup>dsRNA</sup>*, (I) *ey-Gal4/ gpp<sup>dsRNA</sup>*, (J) *ey-Gal4/ E(Pc)<sup>dsRNA</sup>*, (K) *ey-Gal4; UAS-Tip60<sup>dsRNA</sup>*, (L) *ey-Gal4; UAS-dom<sup>dsRNA</sup>*, (M) *ey-Gal4; UAS-Eaf6<sup>dsRNA</sup>*.



**Figure 3.S6. Immunofluorescence and qPCR assays to assess RNAi specificity.**

(A-G) Maximum intensity projection of confocal immunofluorescence images of eye discs. Heat-shock flipout clones marked by GFP expressing the following RNAi: (A) *hth*<sup>dsRNA</sup>, (B) *exd*<sup>dsRNA</sup>, (C) *emb*<sup>dsRNA</sup>, (D) *ed*<sup>dsRNA</sup>, (E) *stan*<sup>dsRNA</sup>, (F) *grh*<sup>dsRNA</sup> and (G) *shot*<sup>dsRNA</sup> were

generated. Eye discs were stained with the respected antibody to assess RNAi specificity. (H-O) qPCR analysis with RNA extracted from eye discs (I-L, N, O) or lymph glands (M) for the indicated genes using the probes listed in Supplementary excel sheet. The mean RQ values for at least three independent experiments are represented for the indicated genotype to confirm RNAi specificity.

### 3.3.4 NA9 expression induces eye-to-wing transdetermination

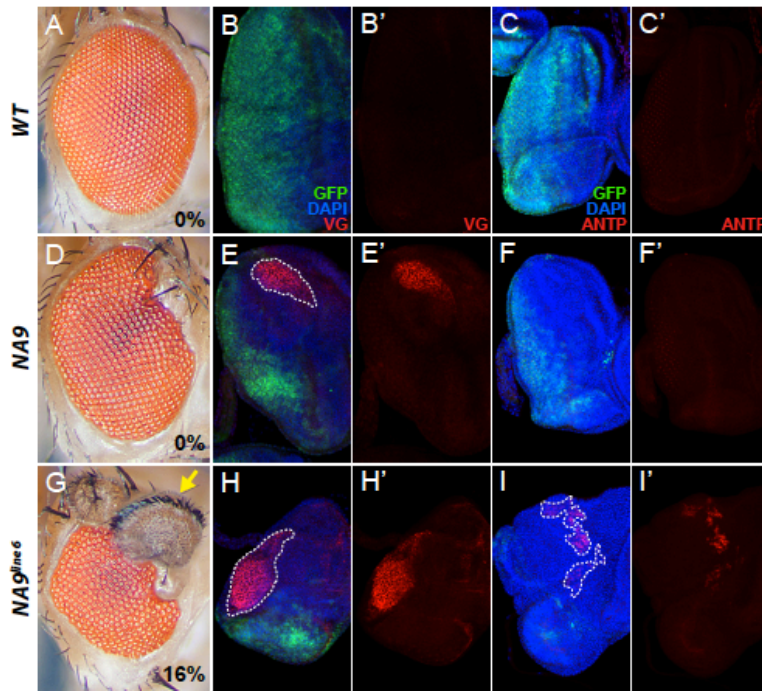
When tested by RNAi, the seven enhancers mentioned above varied significantly in their ability to modify the NA9 phenotype. Indeed, knockdowns of *emb* and *Rae1* resulted in a dramatic reduction of eye size accompanied by an overall reduced head capsule (Figure 5D and E). In contrast, knockdowns of *ed*, *CG6583*, *shot*, and *gpp* led to a slight, but reproducible cuticular overgrowth in the antero-dorsal region of the eye (Figure 5F-I). Finally, depletion of *E(Pc)* markedly caused the formation of wing structures. Although these observations were made using RNAi-based knockdowns and thus possibly do not reflect the full extent of the effects of null alleles, they nonetheless suggest that the enhancers differ in their mechanism of action.

We were intrigued by the ability of *NA9* to induce the formation of wing-like structures in the eye upon *E(Pc)* dsRNA co-expression, while neither constructs had this effect when expressed alone (Figures 5A, S5J, and data not shown). Enhancer of Polycomb or E(Pc) is part of a multi-subunit complex called the NuA4/Tip60 histone acetyltransferase (HAT) complex that acts as a histone H4 and H2A acetyltransferase to control gene expression and genome stability through chromatin remodeling (Boudreault et al., 2003; Doyon and Cote, 2004; Galarneau et al., 2000; Wang et al., 2018). To determine whether the effect seen by *E(Pc)* depletion reflects its role through the Tip60 complex, we tested the effect of knocking down other Tip60 subunits in the presence of NA9 expression. As shown in Figure 5K-M, depletion of *Tip60*, *dom*, and *Eaf6*, systematically produced ectopic wing structures in the NA9-expressing eyes. In contrast, they had negligible effect on eye development and did not produce wing material when expressed alone (Figure S5K-M). Together, these findings

suggest that *NA9* expression reprograms eye development towards the wing fate and that the Tip60 complex works against this phenomenon.

We previously reported the generation of a second *UAS-NA9* transgenic line, called line 6, which expressed the *NA9* transgene at levels ~ 6-fold higher than the reference line used thus far in this study (also referred to as line 5 in (Baril et al., 2017)). Remarkably, when expressed with *ey-Gal4*, *NA9<sup>line6</sup>* produced ectopic wing material in the eyes of 16% of the progeny (compare Figures 6A, D, and G). This data indicated that *NA9* expression is sufficient by itself to partly reprogram eye development towards the wing fate. Consistent with this conclusion, we found that *NA9*-expressing third instar eye-antennal imaginal discs invariably exhibited Vestigial (VG) expression (a wing determination factor (Kim et al., 1996)) in the dorsal compartment of the eye disc (Figures 6E and H).

It remained unclear why only *NA9<sup>line6</sup>* produced ectopic wing material while both *NA9* transgenic lines ectopically induced Vg expression in eye imaginal discs (Figure 6). One possibility could be due to their differential expression levels of the *NA9* transgene. It has been previously reported that overexpression of the HOX factor Antennapedia (ANTP) in the eye induces ectopic wing formation in a NOTCH-dependent manner (Kim et al., 1996; Kurata et al., 2000; Prince et al., 2008). Given that HOX-mediated leukemia onset entails the de-repression of HOX loci (Alharbi et al., 2013; De Braekeleer et al., 2014; Rice and Licht, 2007), we wondered whether *NA9* expression in the fly eye acts similarly and de-represses the *Antp* locus, thereby contributing to fate change. Consistent with this model, expression of *NA9<sup>line6</sup>* in the eye indeed promoted ectopic *Antp* expression in a subset of eye-antennal imaginal discs. However, *Antp* expression was never seen with the reference *NA9* line (Figures 6 F and I). Together, these observations suggest that *NA9* expression during eye development promotes the expression of a distinct set of wing determination genes that differs according to the *NA9* expression levels and that this phenomenon possibly explains the variable penetrance of ectopic wing material observed in *NA9*-expressing adult fly eyes.

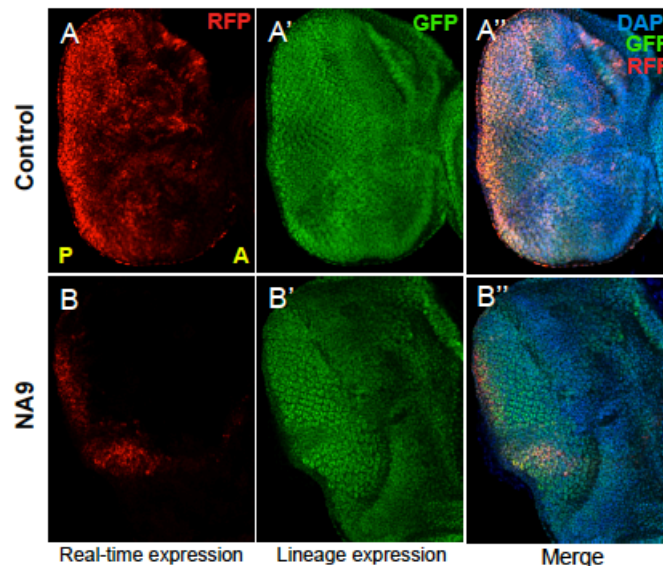


**Figure 3.6. NA9 induces ectopic expression of ANTP and the wing selector factor VG consistently with the eye-to-wing transdetermination phenotype observed.**

(A, D, G) Widefield images of adult *Drosophila* eyes for the following genotypes: (A) *ey-Gal4, UAS-GFP*, (D) *ey-Gal4, UAS-GFP, UAS-NA9*, (G) *ey-Gal4, UAS-GFP, UAS-NA9<sup>line6</sup>*. The percentage indicates the proportion of eyes presenting ectopic wing formation. (B-I') Maximum intensity projections of confocal immunofluorescence images of eye/antennal discs stained with antibodies against Vg (B, B', E, E', H, H') or Antp (C, C', F, F', I, I'). Genotypes are: (B-C') *ey-Gal4, UAS-GFP*, (E-F') *ey-Gal4, UAS-GFP, UAS-NA9*, (H-I') *ey-Gal4, UAS-GFP, UAS-NA9<sup>line6</sup>*.

Notably, we found that in the presence of NA9, the *ey-Gal4* driver was invariably silenced in the dorsal compartment of the eye disc (Figures 6E and H as examples), which is the area that encompasses VG expression. We reasoned that this could be due to the fact that this area of the disc has been redirected towards the wing fate and therefore can no longer support the expression of the eye-specific *ey-Gal4* driver. To demonstrate that this area of the disc previously expressed the NA9 transgene under the *ey-Gal4* driver, we conducted a lineage tracing experiment using the G-trace system (Evans et al., 2009). This genetic tool enables the

marking of cells that expressed a given *Gal4* driver (lineage expression; EGFP-labeled) at any time point prior to tissue harvest as well as cells that currently express the same *Gal4* driver (real-time expression; RFP-labeled). Compared to a WT eye disc, the “real-time” activity of the *ey-Gal4* driver was found to be restricted mostly to the postero-ventral side of the eye disc in the presence of *NA9* expression (Figure S7A and B). However, lineage expression of the *ey-Gal4* driver clearly indicated expression across the disc irrespective of the presence or not of the *NA9* transgene (compare A' and B'). We thus concluded that the *NA9* transgene under the *ey-Gal4* driver was indeed expressed at some point in time in the posterior compartment of the presumptive eye field during eye development, but that its expression has been silenced possibly due to an eye to wing fate change.



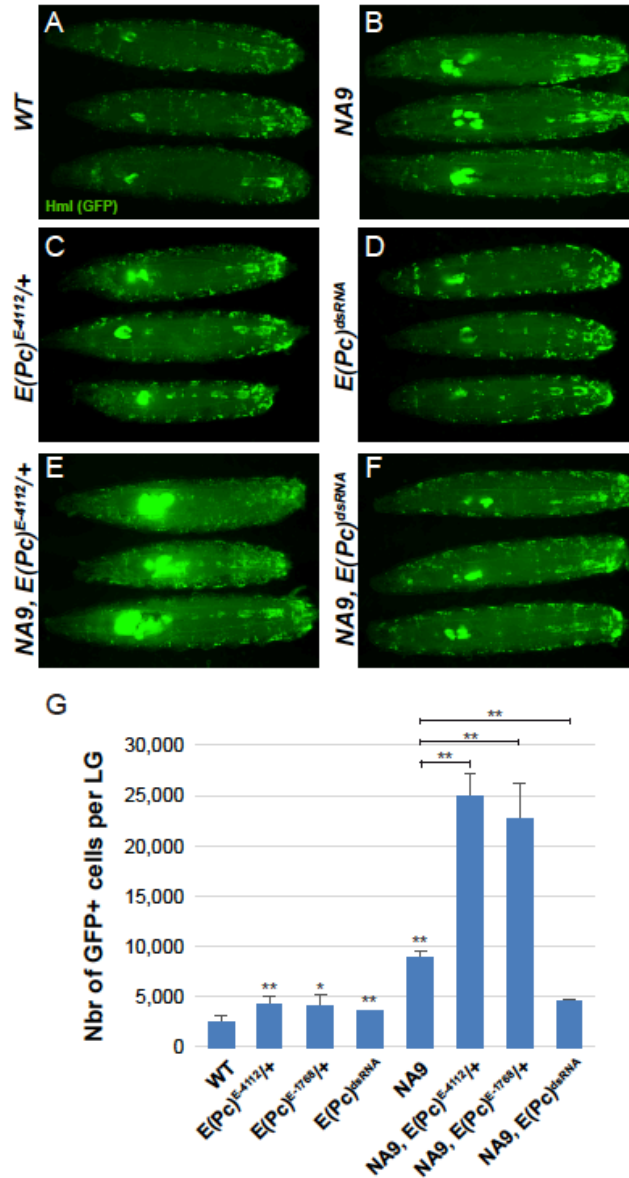
**Figure 3.S7. The *ey-Gal4* driver and *NA9* are expressed across the eye field in the eye-antennal disc at some point during the development as revealed by lineage tracing analysis.**

(A-B'') Maximum intensity projection of confocal images of a third instar larval eye disc of the following genotype: (A-A'') *ey-Gal4*, *G-TRACE*, (B-B'') *ey-Gal4*, *UAS-NA9*, *G-TRACE*. RFP and GFP signals reveal respectively real-time *ey* expression (A and B) and lineage-traced expression (A' and B'). A: anterior, P: posterior.

### 3.3.5 E(Pc) modulates the hyperplastic activity of NA9 in the lymph gland

Given the role of NA9 in leukemia, we sought to test whether there is a functional connection between NA9 and E(Pc) in the fly blood system. To address this question, we turned to the hemocyte (myeloid-like cell) producing organ of *Drosophila* larvae, called the lymph gland (Yu et al., 2018). This structure comprises a series of paired lobes aligned along the dorsal vessel where the primary lobes consist of a cortical zone composed of mature hemocytes, a medullary zone with progenitor cells, and the posterior signaling center (PSC) required for lymph gland homeostasis. We previously showed that expression of *NA9* in the cortical zone of the lymph gland led to its hyperplastic expansion (Baril et al., 2017). We thus took advantage of this system to test whether the *E(Pc)* alleles also enhanced NA9 activity in this context. As reported, expression of *NA9* in mature hemocytes of the cortical zone using a *hemolentin (hmlΔ)-Gal4* driver led to a significant increase in the number of GFP<sup>+</sup> cells (Figure 7, compare A and B; quantified in G). Interestingly, a significant increase, although weaker, was also observed for the two *E(Pc)* alleles recovered in the screen when tested as heterozygotes (Figure 7 C and G). This suggests that the tested *E(Pc)* alleles are not simple loss-of-functions or that the *E(Pc)* gene function is haploinsufficient for proper lymph gland development. At any rate, a weak, but significant increase of GFP<sup>+</sup> cells upon *E(Pc)* depletion by RNAi in the cortical zone was also detected (Figure 7D and G), which indicates that E(Pc) activity indeed impinges on the proliferative potential of mature hemocytes in the cortical zone. Markedly, the heterozygous *E(Pc)* alleles dramatically enhanced the number of GFP<sup>+</sup> cells in the presence of *NA9* expression (Figure 7B, C, E, and G). In stark contrast, *E(Pc)* depletion by RNAi behaved oppositely and suppressed NA9 function (Figure 7B, F, G). Together, these results suggest that the *E(Pc)* alleles recovered in the screen are not simple loss-of-function alleles, but in fact behave as gain-of-functions. Moreover, and importantly, the data demonstrates a genetic interaction between *NA9* and *E(Pc)* in another tissue than the eye and thereby further supports a *bona fide* functional relationship between the two activities.





**Figure 3.7. E(Pc) alleles collaborate with NA9 in the hematopoietic system.**

(A-F) Widefield fluorescent images of wandering third instar larvae using *hmlΔ-Gal4* driven GFP to reveal the lymph glands, circulating, and sessile hemocytes of the following genotypes: (A) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP*, (B) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9<sup>line6</sup>* (C) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, E(Pc)<sup>E-4112/+</sup>*, (D) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, E(Pc)<sup>dsRNA</sup>*. (E) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9<sup>line6</sup>, E(Pc)<sup>E-4112/+</sup>*, (F) *HmlΔ-Gal4; UAS-GFP, UAS-NA9<sup>line6</sup>, E(Pc)<sup>dsRNA</sup>*. (G) Quantification of GFP<sup>+</sup> cells per lymph gland by FACS analysis of the indicated genotypes. Error bars represent SD from at least 3 independent experiments for each genotype. \* indicates

a p-value < 0,05 when the corresponding samples were compared to *WT* or *NA9* (Student's t test).

### 3.4 Discussion

In this report, we present the results of an unbiased genetic screen in *Drosophila* designed to identify dominant modifiers of a NA9-dependent eye phenotype. From this genetic screen, a total of 29 complementation groups of modifiers were delineated and of these, 16 have now been associated to a specific gene. Impressively, the identified genes encompass a variety of cellular processes such as nuclear export, epigenetic regulation, cell polarity/epithelial morphogenesis, cytoskeletal organization, and translation, which possibly reflects the wide range of effects NA9 activity has on expressing cells and their microenvironment.

Among the recovered modifiers, we isolated mutations in three genes encoding fly counterparts of factors known to contribute to NA9 activity, namely, the transcription factor HTH, and the nucleo-cytoplasmic transport factors RAE1 and EMB. Indeed, MEIS1, the homologue of HTH, is known to potently accelerate the development of AML in NA9-expressing mice (Kroon et al., 2001) and has been identified as a common integration site in BXH2 mice expressing NA9 (Iwasaki et al., 2005). Several mutations have also been isolated in the genes encoding RAE1 and EMB (XPO1 in mammals). Both proteins have been shown to contribute to NA9 activity by interfering with the nucleo-cytoplasmic transport through their association with the GLEBS domain or FG / GLFG motifs of NA9, respectively (Dogán et al., 2011; Funasaka et al., 2011; Oka et al., 2016; Takeda et al., 2010; Xu and Powers, 2010). Interestingly, our work represents the first genetic study that identifies RAE1 and EMB as functional collaborators of NA9 and thereby supports their importance in the leukemogenic activity of NA9. Together, these results confirm the ability of our approach to identify relevant genes with respect to NA9 activity.

#### *A role in epigenetic regulation*

Recent studies in mammals unveiled a role for NA9 in epigenetic remodelling of the chromatin. Indeed, NA9 was shown to collaborate with well-known epigenetic factors and

transcriptional regulators such as MLL, p300 or HDAC1 to modulate target gene expression (Rio-Machin et al., 2017; Shima et al., 2017; Xu et al., 2016). In line with these findings, our NA9-dependent screen identified three chromatin remodelling factors: the Tip60 complex member E(Pc), the H3K79 methyltransferase Grappa (Gpp), the SERTAD protein Taranis (Tara) and the CP2 transcription factor Grainyhead (GRH). Interestingly, EPC1/2 and DOT1L, the human homologs of E(Pc) and Gpp, respectively, have been previously reported as oncogenic co-factors in Mixed-Lineage Leukemia (MLL)-rearranged leukemia in mammals (Chen and Armstrong, 2015; Huang et al., 2014). In addition, GRHL2 was reported to modulate the activity of the HAT p300 (Pifer et al., 2016) and to physically associate with the histone methyltransferases MLL3 and MLL4 in epithelial cells (MacFawn et al., 2018). Since MLL has been reported to physically interact with NA9 and to be required for its leukemogenic activity, it is tempting to speculate that the functional interactions of NA9 with EPC1/2, DOT1L and GRHL occur through MLL (Shima et al., 2017; Xu et al., 2016).

### ***A role in cell polarity***

Surprisingly, the NA9-dependent screen also identified several genes encoding cell polarity factors such as the Scribble complex protein L(2)GL (Cao et al., 2015), the seven-pass transmembrane cadherin STAN/FMI (Chae et al., 1999) and the immunoglobulin domain-containing cell adhesion molecule (CAM) Echinoid (ED) (Wei et al., 2005). Interestingly, the protein level of STAN is tightly regulated by ED and GRH in *Drosophila* tissues. Indeed, in *Drosophila* wing cells, GRH participates in tissue polarity by controlling the expression levels of STAN (Lee and Adler, 2004). Moreover, ED has been shown to regulate STAN endocytosis in interommatidial cells of the *Drosophila* eye in order to control the proper rotation of ommatidial clusters (Ho et al., 2010). Thus, the activity of GRH, STAN and ED appears to be interconnected and this potentially explains why mutations in these three genes have been recovered in the NA9 screen. We do not currently know the molecular mechanism linking NA9 to polarity proteins. However, interaction of FMI/CELSR2 and Frizzled-8 appears to be required in the hematopoietic niche for the maintenance of quiescent long-term HSCs (Sugimura et al., 2012). In addition, recent data suggests the involvement of the Scribble complex members in the regulation of HSC biology with a potential implication in AML (Heidel et al., 2013; Heidel and Ellis, 2018).

### ***A role in cytoskeletal/ basement membrane organization***

Correlating with a role for NA9 in cell fate plasticity, we recovered mutations in two genes related to microtubule network and cytoskeleton organization: *shot* (a.k.a. *kakapo*), which encodes a spectraplakkin (Applewhite et al., 2010) and *toc* encoding a mitotic microtubule-associated protein (MAP) (Debec et al., 2001; Mirouse et al., 2005). Indeed, modulation of the cytoskeletal organization and basement membrane can impact on tissue morphogenesis and cell fate specification and vice versa (Chan et al., 2017). Interestingly, we have also identified the matrix metalloproteinase Mmp2, an extracellular protease responsible for extracellular matrix (ECM) degradation, which was previously found upregulated during imaginal disc regeneration by microarray analysis (Klebes et al., 2005). Its mammalian homolog MMP17 (MT4-MMP) is strongly expressed in myeloid cell lines and in AML samples suggesting a contribution in the pathogenesis and a potential involvement in NA9 leukemogenic activity (Shirvaikar et al., 2007).

### ***A role in translation***

Finally, the screen also recovered mutant alleles of genes related to translation: such as *eIF3b* and *eIF3i* encoding two subunits of the eIF3 translation initiation complex and the asparaginyl-tRNA-synthetase, *AsnRS*. Interestingly, HOXA9 has been previously reported to associate with multiple subunits of the translation initiation factor eIF3 complex (Shestakova et al., 2017). Additionally, several subunits of translation initiation complexes were shown to be implicated in AML, such as eIF4E and different subunits of the eIF3 complex (eIF3B, eIF3D, eIF3K, etc.) (Assouline et al., 2009; Hariri et al., 2013; Li et al., 2016; Liu et al., 2018). Together, these findings strengthen the idea that modulation of translation could be another way through which NA9 promotes AML development.

### ***The eye-to-wing transdetermination***

Transdetermination (TD) is the ability to switch from a cell fate to another (Gehring, 1966; McClure and Schubiger, 2007) and can be initiated in imaginal disc “weak points”, which are small patches of cells associated with a greater potential to TD (Hadorn, 1978). These “weak points” may provide a more permissive environment or contain cells easily reprogrammable (Johnston and Schubiger, 1996; Maves and Schubiger, 1998, 2003; McClure and Schubiger,

2007; Salzer and Kumar, 2010). The developmental program that determines cell fate and appendage identity in imaginal discs is initiated and maintained by transcription factors known as selector genes (Mann and Morata, 2000). TD events generally occurs when a given selector gene is expressed in a tissue where it is not normally expressed. For example, ectopic expression of the wing selector gene *vestigial* alone or in combination with its DNA-binding partner *scalloped* (*sd*) in the eye disc, is sufficient to induce the formation of ectopic wings in the eye (Halder and Carroll, 2001; Katsuyama et al., 2005; Kim et al., 1996; Williams et al., 1991). Another way to induce TD is to impinge on the activity of epigenetic factors (Katsuyama et al., 2005; Klebes et al., 2005; Lee et al., 2005; Masuko et al., 2018; Zhu et al., 2018). For example, the Polycomb protein (Pc) is required to maintain eye fate in *Drosophila*. Indeed, Pc knockdown promotes eye to wing TD and induces ectopic expression of VG and *Antp* locus de-repression in eye imaginal disc cells (Zhu et al., 2018).

Interestingly, high expression of NA9 (NA9<sup>line6</sup>) reproducibly induced ectopic wing formation in the antero-dorsal part of the eye accompanied by ectopic expression of VG and ANTP (Figure 6). In addition, we demonstrated that knockdown of different Tip60 complex subunits (i.e. E(Pc), the HAT TIP60 and the ATPase DOMINO) exacerbated the eye to wing TD events. As recently proposed by Zhu and co-workers, Tip60 complex probably collaborates with the eye selector Pax6 (*ey* and *toy*) genes to block the capacity of the developing *Drosophila* eye to adopt alternative fate choices (Zhu et al., 2018), while on the contrary, NA9 promotes a fate switch. How NA9 promotes this eye-to-wing fate switch remains to be determined.

### ***A stem cell connection?***

A number of *in vivo* genetic studies provide evidence that human oncogenes possess the capacity to epigenetically and/or transcriptionally reprogram healthy stem or progenitor cells towards specific tumor cell fates (Gonzalez-Herrero et al., 2018). For example, MLL-AF9 can confer self-renewal property to committed granulocyte-macrophage progenitors by activating a stem-like program (Krivtsov et al., 2006; Somervaille and Cleary, 2006), whereas, *BCR-ABLp210* oncogene reprograms hematopoietic stem/progenitor cells to leukemic stem cells (LSCs) (Perez-Caro et al., 2009). In light of this, the oncogenic potential of NA9 may reside in

its capacity to rewrite the epigenetic and transcriptional map of healthy HSCs to establish LSCs with a specific pathological program.

## 3.5 Materials and methods

### 3.5.1 Fly stocks

*Ey-Gal4* (BL#5534 and BL#5535), *HmlΔ-Gal4*, *UAS-2XeGFP* (BL#30140), *UAS-LacZ* (BL#8529), *dom<sup>3</sup>* (BL#9260) flies were obtained from the Bloomington Stock Center (BL). *UAS-GFP-hth* is a generous gift from R.S. Mann (Casares and Mann, 1998) and *G-TRACE* from S. Ghosh. RNAi lines used are the following one: *UAS-dom-RNAi* (BL#40914), *UAS-Eaf6-RNAi* (BL#33905), *UAS-gpp-RNAi* (BL#34842), *UAS-Grh-RNAi* (BL#28820), *UAS-shot-RNAi* (BL#28336), *UAS-Tip60-RNAi* (BL#28563), *UAS-CG6583-RNAi* (VDRC#11746), *UAS-ed-RNAi* (VDRC#104279), *UAS-exd-RNAi* (VDRC#100259), *UAS-emb-RNAi* (VDRC#103767), *UAS-mats-RNAi* (VDRC#108080), *UAS-Rae1-RNAi* (VDRC#29302), *UAS-stan-RNAi* (VDRC#107993), *UAS-Yki-RNAi* (VDRC#40497), *UAS-Hpo-RNAi* (VDRC#104169), *UAS-wts-RNAi* (VDRC#9928) and *UAS-hth-RNAi* (NIG#17117R-2) and *UAS-E(Pc)-RNAi* (NIG#7776R-2) lines were from the National Institute of Genetics (NIG). The effectiveness of the listed RNAi is shown on supplementary figure S6 except for *wts* and *mats* RNAi which have been previously validated in published studies (Rauskolb et al., 2014; Sun et al., 2015).

### 3.5.2 Cloning and transgenic flies

*NA9* was cloned downstream to the *ey-hsp70* enhancer-promoter cassette pCasper vector to generate the transgenic *ey-NA9* line used for screening. *NA9* (Nakamura et al., 1996), *NUP98<sup>ACT</sup>* (amino acids 1-469) and *HOXA9<sup>ANT</sup>* (amino acids 163-271) cDNAs were cloned into the *pUAST* vector (Brand and Perrimon, 1993). The *NA9<sup>HD</sup>* (N562A) and *NA9<sup>PIM</sup>* (W506A) mutant cDNAs were generated by site-directed mutagenesis using QuikChange II

Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). Transgenic flies were generated by P-element-mediated germline transformation (Brand and Perrimon, 1993).

### 3.5.3 *Drosophila* maintenance

Crosses were performed on semi-defined medium supplemented with food coloring agent to visualize gut content ([http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly\\_Work/media-recipes/germanfood.htm](http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/germanfood.htm)). Gut emptying marks transition from wandering to resting 3<sup>rd</sup> instar larvae. All dissections were performed on wandering 3<sup>rd</sup> instar larvae. For eye-antennal disc dissection, crosses were set up at 25°C for 66 h, then shifted to 29°C (to enhance *Gal4* activity) and wandering larvae were harvested 72 h later.

To study adult flies, crosses were also performed on semi-defined medium ([http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly\\_Work/media-recipes/germanfood.htm](http://flystocks.bio.indiana.edu/Fly_Work/media-recipes/germanfood.htm)) at 25°C.

### 3.5.4 *Drosophila* maintenance and mutagenesis for the screen

For the screen, fly culture and crosses were performed according to standard procedures. For the mutagenesis, *w*<sup>-</sup> males isogenized for the second and the third chromosomes were treated with a 25 mM ethyl methanesulfonate (EMS), 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% sucrose solution. Mutagenized males were then mated with either *CyO*, *P[w<sup>+</sup>,ey-Nup98-HoxA9]* (*CNA9*)/*Adv* or *TM3*, *P[w<sup>+</sup>,ey-Nup98-HoxA9]* (*TNA9*)/*e*, *ftz*, *ry* virgin females. The F1 *CNA9* or *TNA9* progeny were scored using a stereomicroscope, for alteration in eye shape and size compared to the F0 females.

### 3.5.5 Complementation tests, mapping and sequencing

Allelism was assessed by complementation tests based on recessive lethality. And complementation groups were then mapped using the 3.1 version of DrosDel deficiency kit collection encompassing chromosomes 2 and 3 available at Bloomington. When possible, genetic identification of these groups was determined by complementation tests using alleles. Sequencing of some of the identified loci was performed to ascertain their molecular identity.

### 3.5.6 Quantification of modifier effect on NA9 phenotype

Modulation of the NA9 phenotype was quantitatively scored for approximately 30 to 50 flies for each loci. According to the modulation strength of the NA9 phenotype, fly eyes were classified into 7 categories: sE for strongly enhanced (almost no eye), E for enhanced, wE for weakly enhanced, NE for no effect (reference point), wS for weakly suppressed, S for suppressed and sS for strongly suppressed (as a WT eye). The *ey-NA9* phenotype tends to be weaker for some flies, so the reference point NE is set to the most frequent phenotype in the population of *ey-NA9* expressing flies. For each loci, the normalized number of flies in each category is represented on a histogram (Annex 2). In the histogram, darker is the green or red color for suppressor and enhancer respectively, strongest is the modulator. Based on this quantification, we calculated a modification score for each loci representing its modulation strength of the NA9 phenotype.

### 3.5.7 Assay on eyeless/Heat shock promoter expression

To monitor the possible effect on the *eyeless/heat shock* promoter, we evaluated the impact of individual heterozygous alleles identified in the screen on the level of GFP expression induced by *ey-Gal4*. To do so, each allele presented in Fig were introduced into to *ey-Gal43-8, UAS-GFP* background. Subsequently, eye discs from wandering L3 larvae (raised at 25°C and in semi-defined medium) were dissected in ESF921 medium (Expression systems) and transferred in Phosphate-buffered saline (PBS) 1X with 5% Bovine Serum Albumine (BSA). Unfixed discs were then mounted in Mowiol (Sigma) and images were taken immediately with an Axio-imager microscope equipped with a 20X objective and a GFP filter (Zeiss). Using Photoshop, we monitored the mean GFP intensity in the posterior region of 5 eye discs per genotype in triplicate and compared it to control eye discs.

### 3.5.8 Dosage sensitivity

To assess the impact of NA9 expression level on the phenotype strength, we used *ey-Gal4; UAS-GFP* line to drive the expression of the transgene *UAS-NA9*. Crosses were set up at



different temperatures 18°C, 25°C and 29°C to modulate the strength of the driver and so the expression level of NA9 reflected by the GFP expression.

### **3.5.9 Western blot**

To prepare whole larvae lysates, 15 third instar larvae were washed in PBS 1X with 0.2% Triton X-100 (PBT 0.2%) one time and one time in PBS. Larvae were squeezed with a small plastic pestle in 200 µl of RIPA lysis buffer (50 mM Tris at pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 µg /ml aprotinin, 10 µg /ml leupeptin) before being incubated 15 min on ice. Debris were removed by centrifugation at 12,000g for 15 min at 4°C.

Lysates were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The following antibodies were used: rabbit anti-HoxA9 (1:2000, AbCam), rabbit anti-NUP98 (1:2000, Cell Signalling), mouse anti-β-Gal (1:5000, DSHB), mouse anti-Actin (1:5000, Chemicon) and rabbit anti-Akt (1:2000, NEB).

### **3.5.10 Drug assay**

Crosses were set up in FACS tube (Falcon #352235) containing 1 ml of semi-defined medium supplemented with either DMSO or 6,25 µM of Selinexor (Selleckchem S7252, 50mM stock solution) at 25°C.

### **3.5.11 Immunohistochemistry and microscopy imaging**

For immunohistochemistry of eye-antennal discs, wandering L3 larvae were dissected in ESF921 medium (Epression systems), fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde (PFA) / PBS 1X and washed three times in PBT 0,2% (PBS 1X, 0, 2% Triton X-100). The dilutions and sources for primary antibodies are as follow: mouse anti-Antp (1:100, 4C3 DSHB), rabbit anti-Vg (1:1000, K. Guss), rabbit anti-hth (1:500), mouse anti-exd (1:100, DSHB), mouse anti-emb (1:1000, V. Tsarouhas), rat anti-ed (1:1000, L. Nilsson), mouse anti-stan (1:100,

DSHB), rabbit anti-grh (1:500, A. Hermann), mouse anti-shot (1:, DSHB). Eye-antennal discs were incubated with primary antibodies diluted in PBT 0,2%, 5% BSA overnight at 4°C. They were then washed three times in PBT 0,2% and incubated at room temperature for 2 hours with fluorophore-conjugated secondary antibodies (1:500, Molecular Probes) diluted in PBT 0,2%. Eye-antennal discs were then washed once in PBT 0.2% with 100 ng/ml DAPI, twice in PBT 0.2% and finally mounted in Mowiol (Sigma). Imaging was done with a Zeiss LSM510 or LSM700 confocal microscopes, equipped with a 40X objective.

For BrdU incorporation, wandering L3 larvae were dissected in ESF921 and incubated with BrdU (1 µg/ml) for 30 minutes, fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde (PFA) / Phosphate-buffered saline (PBS) 1X, washed once in PBT 0.2% with 100 ng/ml DAPI, twice in PBT 0.2% and finally mounted in Mowiol (Sigma). Imaging was done with a Zeiss LSM510 confocal microscope, equipped with a 40X objective.

For adult eye imaging, flies were collected and put at -80°C for 2 hours or more. Eye images were taken under a stereomicroscope (Leica) equipped with a camera (Nikon). Five pictures were taken per eye from the apical to basal focal plan and 3D reconstruction of the eye was made by helicon focus software.

For larvae imaging, wandering larvae were collected, washed in Phosphate-buffered saline 1X, 1% Triton X-100 (PBT 1%) and anesthetised into a chamber saturated with ethyl ether for 25 min. Larvae were then aligned on a glass slide covered with double stick tape and immersed in glycerol before addition of a coverslip. Images were taken with an inverted microscope (Leica DM IRB) using a 2.5X objective.

### **3.5.12 FACS analysis**

For lymph gland dissection, crosses were set up at 25°C for 70 h, then shifted to 29°C (to enhance *Gal4* activity) and wandering larvae were harvested 68 h later. Larvae were dissected under a UV lamp (Nightsea, GFP filter) to visualize GFP positive lymph glands. To quantify lymph gland size by FACS, 15 glands were dissected and put immediately in 100 µl of Trypsin 1X (No phenol red; Life technologies) solution diluted in PBS 1X. Samples were incubated for 15 min at 25°C and then pipetted up and down 30 times through a 200 µl

siliconized tip. Trypsin was neutralized by adding 300 µl of 2% FBS in PBS 1X. Cell suspensions were filtered using a FACS tube with a cell-strainer cap (Falcon). The percentage of GFP<sup>+</sup> cells was determined by FACS (BD FACS Canto II) and the total number of cells per sample was quantified by counting cells on a hemacytometer. The number of GFP<sup>+</sup> cells per lymph gland was calculated as follow: % of GFP<sup>+</sup> cells X Total number of cell per sample / 15 lymph glands.

### **3.5.13 RT-qPCR analysis**

For qPCR analysis, 15 to 20 eye discs or 15 lymph glands were dissected and total RNA was extracted using the RNeasy Micro kit (Qiagen) according to the provider recommended procedure. Reverse transcription was performed on 200 ng of total RNA using the High capacity reverse transcription kit from Applied Biosystems. Universal Probe Library design center (Roche) was used to design Taqman qPCR assays. Reactions were performed with the TaqMan® Real-Time PCR Master Mix and analysed with the ViiA™ 7 Real-Time PCR System. All the primers used for RT-qPCR are listed in the supplementary file 2.

## **3.6 Acknowledgements**

We are especially grateful to S. Gosh, K. Guss, A. Hermann, R.S. Mann, L. Nilsson and V. Tsarouhas for providing fly stocks and reagents. We also thank the Bloomington, National Institute of Genetics (Japan) and VDRC stock centers for fly stocks. G.G. is recipient of a doctoral studentship from “Fonds de recherche du Québec - Santé”. M.T. holds a Canada Research Chair in Intracellular Signalling. This work was supported by funds from a Canadian Institutes for Health Research (CIHR) operating grant (93654) and a Leukemia and Lymphoma Society of Canada (LLSC) grant to M.T.

### 3.7 References

- Alharbi, R.A., Pettengell, R., Pandha, H.S., and Morgan, R. (2013). The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 27, 1000-1008.
- Applewhite, D.A., Grode, K.D., Keller, D., Zadeh, A.D., Slep, K.C., and Rogers, S.L. (2010). The spectraplakins Short stop is an actin-microtubule cross-linker that contributes to organization of the microtubule network. *Molecular biology of the cell* 21, 1714-1724.
- Assouline, S., Culjkovic, B., Cocolakis, E., Rousseau, C., Beslu, N., Amri, A., Caplan, S., Leber, B., Roy, D.C., Miller, W.H., Jr., *et al.* (2009). Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood* 114, 257-260.
- Bai, X.T., Gu, B.W., Yin, T., Niu, C., Xi, X.D., Zhang, J., Chen, Z., and Chen, S.J. (2006). Trans-repressive effect of NUP98-PMX1 on PMX1-regulated c-FOS gene through recruitment of histone deacetylase 1 by FG repeats. *Cancer research* 66, 4584-4590.
- Baril, C., Gavory, G., Bidla, G., Knaevelsrud, H., Sauvageau, G., and Therrien, M. (2017). Human NUP98-HOXA9 promotes hyperplastic growth of hematopoietic tissues in *Drosophila*. *Developmental biology* 421, 16-26.
- Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F., and Mann, R.S. (2002). Combinatorial control of *Drosophila* eye development by *eyeless*, *homothorax*, and *teashirt*. *Genes & development* 16, 2415-2427.
- Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature reviews Genetics* 6, 9-23.
- Borrow, J., Shearman, A.M., Stanton, V.P., Jr., Becher, R., Collins, T., Williams, A.J., Dube, I., Katz, F., Kwong, Y.L., Morris, C., *et al.* (1996). The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nature genetics* 12, 159-167.
- Boudreault, A.A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R.T., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Tan, S., and Cote, J. (2003). Yeast enhancer of polycomb defines global *Esa1*-dependent acetylation of chromatin. *Genes & development* 17, 1415-1428.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Calvo, K.R., Sykes, D.B., Pasillas, M.P., and Kamps, M.P. (2002). Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene* 21, 4247-4256.
- Cao, F., Miao, Y., Xu, K., and Liu, P. (2015). Lethal (2) giant larvae: an indispensable regulator of cell polarity and cancer development. *International journal of biological sciences* 11, 380-389.
- Casares, F., and Mann, R.S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* 392, 723-726.
- Chae, J., Kim, M.J., Goo, J.H., Collier, S., Gubb, D., Charlton, J., Adler, P.N., and Park, W.J. (1999). The *Drosophila* tissue polarity gene *starry night* encodes a member of the protocadherin family. *Development* 126, 5421-5429.
- Chan, C.J., Heisenberg, C.P., and Hiiragi, T. (2017). Coordination of Morphogenesis and Cell-Fate Specification in Development. *Current biology* : CB 27, R1024-R1035.

- Chen, C.W., and Armstrong, S.A. (2015). Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond. *Experimental hematology* *43*, 673-684.
- De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Basinko, A., Le Bris, M.J., Morel, F., and De Braekeleer, M. (2014). Hox gene dysregulation in acute myeloid leukemia. *Future oncology* *10*, 475-495.
- Debec, A., Grammont, M., Berson, G., Dastugue, B., Sullivan, W., and Couderc, J.L. (2001). Toucan protein is essential for the assembly of syncytial mitotic spindles in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* *31*, 167-175.
- Deshpande, A.J., Deshpande, A., Sinha, A.U., Chen, L., Chang, J., Cihan, A., Fazio, M., Chen, C.W., Zhu, N., Koche, R., *et al.* (2014). AF10 regulates progressive H3K79 methylation and HOX gene expression in diverse AML subtypes. *Cancer cell* *26*, 896-908.
- Dogan, Y., Sahay, S., Dorn, D.C., Franceschino, A., Xu, M., and Moore, M.A.S. (2011). The Nup98-HoxA9 Leukemogenic Fusion Protein Blocks Xpo1 and Tap-Mediated Nuclear Export. *Blood* *118*, 5228-5228.
- Doyon, Y., and Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current opinion in genetics & development* *14*, 147-154.
- Evans, C.J., Olson, J.M., Ngo, K.T., Kim, E., Lee, N.E., Kuoy, E., Patananan, A.N., Sitz, D., Tran, P., Do, M.T., *et al.* (2009). G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nature methods* *6*, 603-605.
- Funasaka, T., Nakano, H., Wu, Y., Hashizume, C., Gu, L., Nakamura, T., Wang, W., Zhou, P., Moore, M.A., Sato, H., *et al.* (2011). RNA export factor RAE1 contributes to NUP98-HOXA9-mediated leukemogenesis. *Cell cycle* *10*, 1456-1467.
- Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A.A., Zhang, Y., Heliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Stillman, D.J., and Cote, J. (2000). Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Molecular cell* *5*, 927-937.
- Garcia-Cuellar, M.P., Steger, J., Fuller, E., Hetzner, K., and Slany, R.K. (2015). Pbx3 and Meis1 cooperate through multiple mechanisms to support Hox-induced murine leukemia. *Haematologica* *100*, 905-913.
- Gehring, W. (1966). [Cell heredity and changes of determination in cultures of imaginal discs in *Drosophila melanogaster*]. *Journal of embryology and experimental morphology* *15*, 77-111.
- Gonzalez-Herrero, I., Rodriguez-Hernandez, G., Luengas-Martinez, A., Isidro-Hernandez, M., Jimenez, R., Garcia-Cenador, M.B., Garcia-Criado, F.J., Sanchez-Garcia, I., and Vicente-Duenas, C. (2018). The Making of Leukemia. *International journal of molecular sciences* *19*.
- Grimwade, D., Ivey, A., and Huntly, B.J. (2016). Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* *127*, 29-41.
- Hadorn, E. (1978). Imaginal discs: transdetermination. In: Ashburner M, Wright T, editors *The Genetics and Biology of Drosophila* New York: Academic Press, 556-617.
- Halder, G., and Carroll, S.B. (2001). Binding of the Vestigial co-factor switches the DNA-target selectivity of the Scalloped selector protein. *Development* *128*, 3295-3305.
- Hariri, F., Arguello, M., Volpon, L., Culjkovic-Kraljacic, B., Nielsen, T.H., Hiscott, J., Mann, K.K., and Borden, K.L. (2013). The eukaryotic translation initiation factor eIF4E is a

- direct transcriptional target of NF-kappaB and is aberrantly regulated in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 27, 2047-2055.
- Heidel, F.H., Bullinger, L., Arriba-Tutusaus, P., Wang, Z., Gaebel, J., Hirt, C., Niederwieser, D., Lane, S.W., Dohner, K., Vasioukhin, V., *et al.* (2013). The cell fate determinant *Llgl1* influences HSC fitness and prognosis in AML. *The Journal of experimental medicine* 210, 15-22.
- Heidel, F.H., and Ellis, S. (2018). Influence of Scribble polarity complex on hematopoiesis and leukemia - a matter of where, when and how. *Oncotarget* 9, 34642-34643.
- Ho, Y.H., Lien, M.T., Lin, C.M., Wei, S.Y., Chang, L.H., and Hsu, J.C. (2010). Echinoid regulates Flamingo endocytosis to control ommatidial rotation in the *Drosophila* eye. *Development* 137, 745-754.
- Huang, X., Spencer, G.J., Lynch, J.T., Ciceri, F., Somerville, T.D., and Somervaille, T.C. (2014). Enhancers of Polycomb EPC1 and EPC2 sustain the oncogenic potential of MLL leukemia stem cells. *Leukemia* 28, 1081-1091.
- Iwasaki, M., Kuwata, T., Yamazaki, Y., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Osato, M., Ito, Y., Kroon, E., Sauvageau, G., and Nakamura, T. (2005). Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model. *Blood* 105, 784-793.
- Johnston, L.A., and Schubiger, G. (1996). Ectopic expression of wingless in imaginal discs interferes with decapentaplegic expression and alters cell determination. *Development* 122, 3519-3529.
- Kasper, L.H., Brindle, P.K., Schnabel, C.A., Pritchard, C.E., Cleary, M.L., and van Deursen, J.M. (1999). CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Molecular and cellular biology* 19, 764-776.
- Katsuyama, T., Sugawara, T., Tatsumi, M., Oshima, Y., Gehring, W.J., Aigaki, T., and Kurata, S. (2005). Involvement of winged eye encoding a chromatin-associated bromo-adjacent homology domain protein in disc specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15918-15923.
- Kim, J., Sebring, A., Esch, J.J., Kraus, M.E., Vorwerk, K., Magee, J., and Carroll, S.B. (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* 382, 133-138.
- Klebes, A., Sustar, A., Kechris, K., Li, H., Schubiger, G., and Kornberg, T.B. (2005). Regulation of cellular plasticity in *Drosophila* imaginal disc cells by the Polycomb group, trithorax group and lama genes. *Development* 132, 3753-3765.
- Knoepfler, P.S., Calvo, K.R., Chen, H., Antonarakis, S.E., and Kamps, M.P. (1997). Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14553-14558.
- Knoepfler, P.S., and Kamps, M.P. (1995). The pentapeptide motif of Hox proteins is required for cooperative DNA binding with Pbx1, physically contacts Pbx1, and enhances DNA binding by Pbx1. *Molecular and cellular biology* 15, 5811-5819.
- Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., *et al.* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 818-822.

- Kroon, E., KrosI, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A.M., and Sauvageau, G. (1998). *Hoxa9* transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with *Meis1a* but not *Pbx1b*. *The EMBO journal* *17*, 3714-3725.
- Kroon, E., Thorsteinsdottir, U., Mayotte, N., Nakamura, T., and Sauvageau, G. (2001). NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *The EMBO journal* *20*, 350-361.
- Kurata, S., Go, M.J., Artavanis-Tsakonas, S., and Gehring, W.J. (2000). Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 2117-2122.
- Lee, H., and Adler, P.N. (2004). The grainy head transcription factor is essential for the function of the frizzled pathway in the *Drosophila* wing. *Mechanisms of development* *121*, 37-49.
- Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L., and Paro, R. (2005). Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* *438*, 234-237.
- Li, C., Zhu, B., Chen, J., and Huang, X. (2016). Feature genes predicting the FLT3/ITD mutation in acute myeloid leukemia. *Molecular medicine reports* *14*, 89-94.
- Li, Z., Zhang, Z., Li, Y., Arnovitz, S., Chen, P., Huang, H., Jiang, X., Hong, G.M., Kunjamma, R.B., Ren, H., *et al.* (2013). PBX3 is an important cofactor of HOXA9 in leukemogenesis. *Blood* *121*, 1422-1431.
- Liu, G.Z., Liu, J.Z., Li, X.Q., Zhang, L., Li, S.J., Xiao, T.W., Wang, J.X., Li, G.Y., and Liu, Y. (2018). Knockdown of eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D (eIF3D) inhibits proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Molecular and cellular biochemistry* *438*, 191-198.
- Lopes, C.S., and Casares, F. (2010). *hth* maintains the pool of eye progenitors and its downregulation by Dpp and Hh couples retinal fate acquisition with cell cycle exit. *Developmental biology* *339*, 78-88.
- MacFawn, I., Wilson, H., Selth, L.A., Leighton, I., Serebriiskii, I., Bleackley, R.C., Elzamzamy, O., Farris, J., Pifer, P.M., Richer, J., *et al.* (2018). Grainyhead-like-2 confers NK-sensitivity through interactions with epigenetic modifiers. *Molecular immunology* *105*, 137-149.
- Mann, R.S., and Morata, G. (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*. *Annual review of cell and developmental biology* *16*, 243-271.
- Masuko, K., Fuse, N., Komaba, K., Katsuyama, T., Nakajima, R., Furuhashi, H., and Kurata, S. (2018). winged eye Induces Transdetermination of *Drosophila* Imaginal Disc by Acting in Concert with a Histone Methyltransferase, Su(var)3-9. *Cell reports* *22*, 206-217.
- Maves, L., and Schubiger, G. (1998). A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between wingless and decapentaplegic signaling. *Development* *125*, 115-124.
- Maves, L., and Schubiger, G. (2003). Transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: a model for understanding pluripotency and selector gene maintenance. *Current opinion in genetics & development* *13*, 472-479.

- McClure, K.D., and Schubiger, G. (2007). Transdetermination: *Drosophila* imaginal disc cells exhibit stem cell-like potency. *The international journal of biochemistry & cell biology* *39*, 1105-1118.
- Mirouse, V., Dastugue, B., and Couderc, J.L. (2005). The *Drosophila* Toucan protein is a new mitotic microtubule-associated protein required for spindle microtubule stability. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* *10*, 37-46.
- Nakamura, T., Largaespada, D.A., Lee, M.P., Johnson, L.A., Ohyashiki, K., Toyama, K., Chen, S.J., Willman, C.L., Chen, I.M., Feinberg, A.P., *et al.* (1996). Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nature genetics* *12*, 154-158.
- Oka, M., Mura, S., Yamada, K., Sangel, P., Hirata, S., Maehara, K., Kawakami, K., Tachibana, T., Ohkawa, Y., Kimura, H., *et al.* (2016). Chromatin-prebound Crml1 recruits Nup98-HoxA9 fusion to induce aberrant expression of Hox cluster genes. *eLife* *5*, e09540.
- Pai, C.Y., Kuo, T.S., Jaw, T.J., Kurant, E., Chen, C.T., Bessarab, D.A., Salzberg, A., and Sun, Y.H. (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes & development* *12*, 435-446.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental cell* *19*, 491-505.
- Peng, H.W., Slattery, M., and Mann, R.S. (2009). Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes & development* *23*, 2307-2319.
- Perez-Caro, M., Cobaleda, C., Gonzalez-Herrero, I., Vicente-Duenas, C., Bermejo-Rodriguez, C., Sanchez-Beato, M., Orfao, A., Pintado, B., Flores, T., Sanchez-Martin, M., *et al.* (2009). Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment. *The EMBO journal* *28*, 8-20.
- Pifer, P.M., Farris, J.C., Thomas, A.L., Stoilov, P., Denvir, J., Smith, D.M., and Frisch, S.M. (2016). Grainyhead-like 2 inhibits the coactivator p300, suppressing tubulogenesis and the epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell* *27*, 2479-2492.
- Pineault, N., Helgason, C.D., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (2002). Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Experimental hematology* *30*, 49-57.
- Prince, F., Katsuyama, T., Oshima, Y., Plaza, S., Resendez-Perez, D., Berry, M., Kurata, S., and Gehring, W.J. (2008). The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development* *135*, 1669-1679.
- Rauskolb, C., Sun, S., Sun, G., Pan, Y., and Irvine, K.D. (2014). Cytoskeletal tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell* *158*, 143-156.
- Rice, K.L., and Licht, J.D. (2007). HOX deregulation in acute myeloid leukemia. *The Journal of clinical investigation* *117*, 865-868.
- Rio-Machin, A., Gomez-Lopez, G., Munoz, J., Garcia-Martinez, F., Maiques-Diaz, A., Alvarez, S., Salgado, R.N., Shrestha, M., Torres-Ruiz, R., Haferlach, C., *et al.* (2017). The molecular pathogenesis of the NUP98-HOXA9 fusion protein in acute myeloid leukemia. *Leukemia* *31*, 2000-2005.



- Roboz, G.J. (2011). Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology American Society of Hematology Education Program 2011*, 43-50.
- Salsi, V., Fantini, S., and Zappavigna, V. (2016). NUP98 fusion oncoproteins interact with the APC/C(Cdc20) as a pseudosubstrate and prevent mitotic checkpoint complex binding. *Cell cycle 15*, 2275-2287.
- Salsi, V., Ferrari, S., Gorello, P., Fantini, S., Chiavolelli, F., Mecucci, C., and Zappavigna, V. (2014). NUP98 fusion oncoproteins promote aneuploidy by attenuating the mitotic spindle checkpoint. *Cancer research 74*, 1079-1090.
- Salzer, C.L., and Kumar, J.P. (2010). Identification of retinal transformation hot spots in developing *Drosophila* epithelia. *PloS one 5*, e8510.
- Sauvageau, G., Lansdorp, P.M., Eaves, C.J., Hogge, D.E., Dragowska, W.H., Reid, D.S., Largman, C., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91*, 12223-12227.
- Shen, W.F., Montgomery, J.C., Rozenfeld, S., Moskow, J.J., Lawrence, H.J., Buchberg, A.M., and Largman, C. (1997). AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Molecular and cellular biology 17*, 6448-6458.
- Shen, W.F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Kom ves, L.G., Lawrence, H.J., and Largman, C. (1999). HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Molecular and cellular biology 19*, 3051-3061.
- Shestakova, E.A., Boutin, M., Bourassa, S., Bonneil, E., and Bijl, J.J. (2017). [Identification of proteins associated with transcription factors HOXA9 and E2A-PBX1 by tandem affinity purification]. *Molekuliarnaia biologiiia 51*, 490-501.
- Shima, Y., Yumoto, M., Katsumoto, T., and Kitabayashi, I. (2017). MLL is essential for NUP98-HOXA9-induced leukemia. *Leukemia 31*, 2200-2210.
- Shirvaikar, N., Jalili, A., Ilnitsky, S., Larratt, L., Mirza, I., and Janowska-Wieczorek, A. (2007). Membrane Type-Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) Are Expressed in Acute Myeloid Leukemia Cells and Are Upregulated by TNF- $\alpha$ . *Blood 110*, 2853-2853.
- Shysh, A.C., Nguyen, L.T., Guo, M., Vaska, M., Naugler, C., and Rashid-Kolvear, F. (2017). The incidence of acute myeloid leukemia in Calgary, Alberta, Canada: a retrospective cohort study. *BMC public health 18*, 94.
- Somervaille, T.C., and Cleary, M.L. (2006). Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer cell 10*, 257-268.
- Struhl, G., and Basler, K. (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell 72*, 527-540.
- Sugimura, R., He, X.C., Venkatraman, A., Arai, F., Box, A., Semerad, C., Haug, J.S., Peng, L., Zhong, X.B., Suda, T., *et al.* (2012). Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell 150*, 351-365.
- Sun, S., Reddy, B.V., and Irvine, K.D. (2015). Localization of Hippo signalling complexes and Warts activation in vivo. *Nature communications 6*, 8402.
- Takeda, A., Sarma, N.J., Abdul-Nabi, A.M., and Yaseen, N.R. (2010). Inhibition of CRM1-mediated nuclear export of transcription factors by leukemogenic NUP98 fusion proteins. *The Journal of biological chemistry 285*, 16248-16257.

- Thorne, R.M., and Milne, T.A. (2015). Dangerous liaisons: cooperation between Pbx3, Meis1 and Hoxa9 in leukemia. *Haematologica* *100*, 850-853.
- Thorsteinsdottir, U., Krosi, J., Kroon, E., Haman, A., Hoang, T., and Sauvageau, G. (1999). The oncoprotein E2A-Pbx1a collaborates with Hoxa9 to acutely transform primary bone marrow cells. *Molecular and cellular biology* *19*, 6355-6366.
- Waddington, C.H., and Perry, M.M. (1960). The ultra-structure of the developing eye of *Drosophila*. *Proc Roy Soc Biol Sci* *153*, 155-178.
- Wang, X., Ahmad, S., Zhang, Z., Cote, J., and Cai, G. (2018). Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* NuA4/TIP60 complex. *Nature communications* *9*, 1147.
- Wei, S.Y., Escudero, L.M., Yu, F., Chang, L.H., Chen, L.Y., Ho, Y.H., Lin, C.M., Chou, C.S., Chia, W., Modolell, J., *et al.* (2005). Echinoid is a component of adherens junctions that cooperates with DE-Cadherin to mediate cell adhesion. *Developmental cell* *8*, 493-504.
- Williams, J.A., Bell, J.B., and Carroll, S.B. (1991). Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes & development* *5*, 2481-2495.
- Xu, H., Valerio, D.G., Eisold, M.E., Sinha, A., Koche, R.P., Hu, W., Chen, C.W., Chu, S.H., Brien, G.L., Park, C.Y., *et al.* (2016). NUP98 Fusion Proteins Interact with the NSL and MLL1 Complexes to Drive Leukemogenesis. *Cancer cell* *30*, 863-878.
- Xu, S., and Powers, M.A. (2010). Nup98-homeodomain fusions interact with endogenous Nup98 during interphase and localize to kinetochores and chromosome arms during mitosis. *Molecular biology of the cell* *21*, 1585-1596.
- Yamamoto, J.F., and Goodman, M.T. (2008). Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer causes & control : CCC* *19*, 379-390.
- Yassin, E.R., Sarma, N.J., Abdul-Nabi, A.M., Dombrowski, J., Han, Y., Takeda, A., and Yaseen, N.R. (2009). Dissection of the transformation of primary human hematopoietic cells by the oncogene NUP98-HOXA9. *PloS one* *4*, e6719.
- Yu, S., Luo, F., and Jin, L.H. (2018). The *Drosophila* lymph gland is an ideal model for studying hematopoiesis. *Developmental and comparative immunology* *83*, 60-69.
- Zhang, T., Zhou, Q., and Pignoni, F. (2011). Yki/YAP, Sd/TEAD and Hth/MEIS control tissue specification in the *Drosophila* eye disc epithelium. *PloS one* *6*, e22278.
- Zhu, J., Ordway, A.J., Weber, L., Buddika, K., and Kumar, J.P. (2018). Polycomb group (PcG) proteins and Pax6 cooperate to inhibit in vivo reprogramming of the developing *Drosophila* eye. *Development* *145*.

### 3.8 Annexes

Gene	Taqman probe	Primer sequence
------	--------------	-----------------

<b>CG6583</b>	#18	Fwd 5' tgaatgtcctgctccgttg 3'
		Rev 5' gaggagcactggtagcatcg 3'
<b>dom</b>	#59	Fwd 5' gaaatataccaccaacagacaga 3'
		Rev 5' tgcttgaactgagattgc 3'
<b>E(Pc)</b>	#18	Fwd 5' ctccctcaattatcccagacc 3'
		Rev 5' aagtcgtcgaaattcgttgg 3'
<b>gpp</b>	#7	Fwd 5' caattgacaaagcgcaaaga 3'
		Rev 5' gcgcgccgtaattatgta 3'
<b>hpo</b>	#1	Fwd 5' caaaaacaacgacgaccaga 3'
		Rev 5' ccatctcccgcattttg 3'
<b>Rae1</b>	#92	Fwd 5' ccacgtacacctgcctcat 3'
		Rev 5' tgatggcatcatgggattg 3'
<b>tip60</b>	#101	Fwd 5' acgtgcactatgtggacttca 3'
		Rev 5' ttgcaccttcgctgta 3'
<b>yki</b>	#71	Fwd 5' aacaaggcgtccatcgtc 3'
		Rev 5' cggctgaatctggagctg 3'

**Annex 1. Primer sequences for qPCR assays**

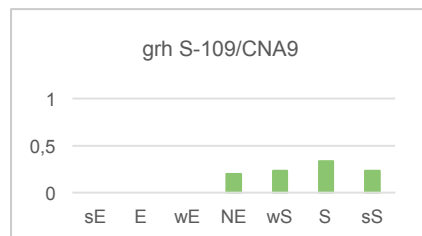
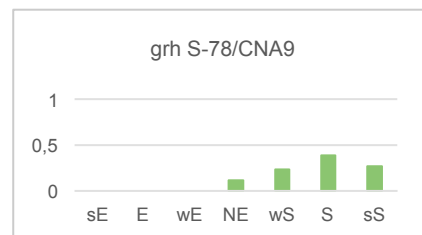
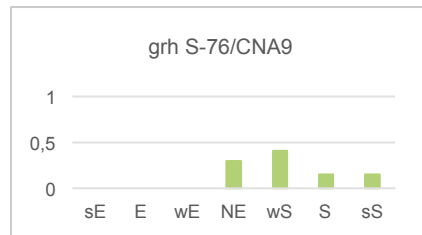
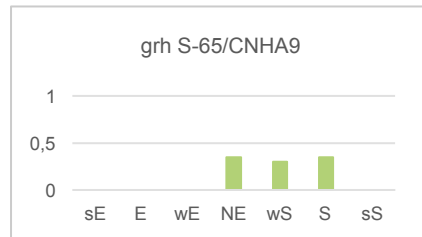
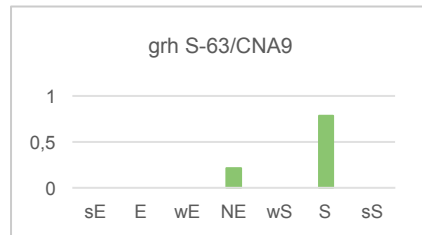
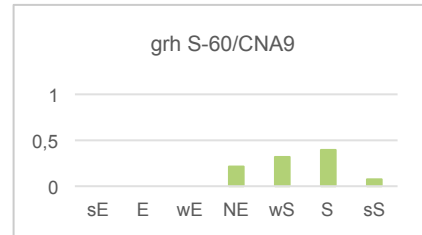
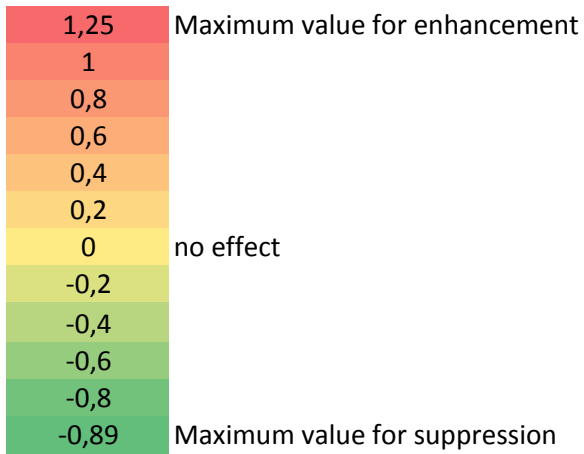
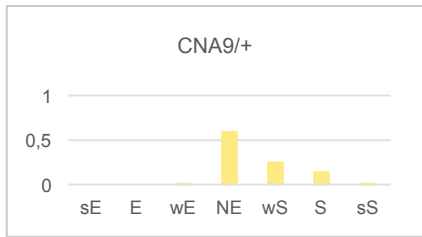
## Annex 2. Scoring of the modifiers identified in the NA9-dependent eye screen

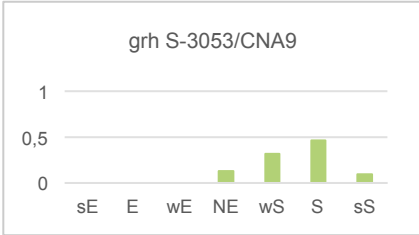
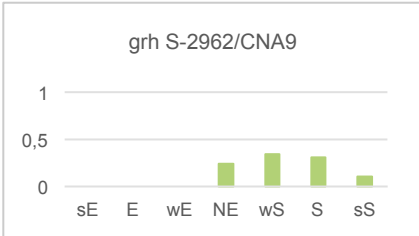
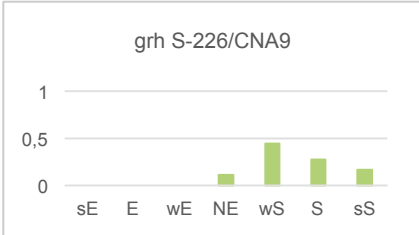
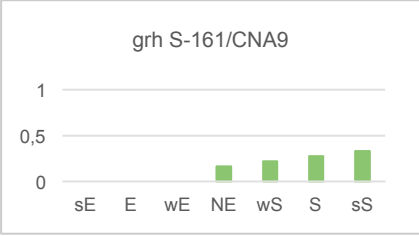
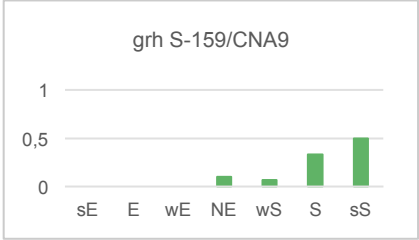
Alleles	Genes/ Cytological position	Fly number for each phenotype										Total number of files	Males/ Females	Phenotypic scoring compared to CNA9										Total number of files	Males/ Females		
		SE	E	WE	NE	WS	S	SS	SE	E	WE			NE	WS	S	SS										
CNA9/+		100%	66,66%	33,33%	0	-33,33%	-66,66%	-100%	953	100%	66,66%	33,33%	0	-33,33%	-66,66%	-100%	953	100%	66,66%	33,33%	0	-33,33%	-66,66%	-100%	953		
SN2-1-S-60/CNA9	grh	0	0	4	565	237	130	11	28	0	0	0	0	0,004197	0,21429	0,21429	0,59286	0,248688	0,136411	0,01154	0,004197	0,21429	0,392857	0,07143	28		
SN2-1-S-63/CNA9	grh	0	0	0	6	0	22	0	28	0	0	0	0	0	0,21429	0	0,785714	0	0	0	0	0,785714	0	0	28		
SN2-1-S-65/CNA9	grh	0	0	0	7	6	7	0	20	0	0	0	0	0	0,35	0	0,35	0,407407	0,148148	0,14815	0	0,35	0	0	20		
SN2-1-S-76/CNA9	grh	0	0	0	8	11	4	4	27	0	0	0	0	0	0,2963	0,407407	0,148148	0,230769	0,384615	0,26923	0	0,2963	0,384615	0,26923	26		
SN2-1-S-78/CNA9	grh	0	0	0	3	6	10	7	26	0	0	0	0	0	0,11538	0,230769	0,384615	0,11538	0,384615	0,26923	0	0,11538	0,230769	0,384615	26		
SN2-1-S-109/CNA9	grh	0	0	0	6	7	10	7	30	0	0	0	0	0	0,2	0,233333	0,333333	0,233333	0,333333	0,233333	0	0,2	0,233333	0,333333	0,233333	30	
SN2-1-S-159/CNA9	grh	0	0	0	3	2	10	15	30	0	0	0	0	0	0,1	0,066667	0,333333	0,066667	0,333333	0,333333	0,5	0,1	0,066667	0,333333	0,333333	30	
SN2-1-S-161/CNA9	grh	0	0	0	3	4	5	6	18	0	0	0	0	0,16667	0,222222	0,277778	0,16667	0,444444	0,277778	0,16667	0	0,16667	0,222222	0,277778	0,333333	18	
SN2-1-S-226/CNA9	grh	0	0	0	2	8	5	3	18	0	0	0	0	0,11111	0,444444	0,277778	0,321429	0,444444	0,310345	0,10345	0	0,11111	0,444444	0,277778	0,16667	18	
SN2-1-S-2962/CNA9	grh	0	0	0	7	10	9	3	29	0	0	0	0	0,24138	0,344828	0,310345	0,24138	0,44828	0,310345	0,10345	0	0,24138	0,344828	0,310345	0,10345	29	
SN2-1-S-3053/CNA9	grh	0	0	0	7	17	25	5	54	0	0	0	0	0,12963	0,314815	0,462963	0,314815	0,462963	0,09259	0,09259	0	0,12963	0,314815	0,462963	0,09259	54	
SN2-2-S-2288/CNA9	Mmp2	0	0	0	11	9	4	4	22	0	0	0	0	0,39286	0,321429	0,142857	0,39286	0,321429	0,142857	0,14286	0	0,39286	0,321429	0,142857	0,14286	28	
SN2-2-S-2713/CNA9	Mmp2	0	0	0	11	7	3	1	22	0	0	0	0	0	0,5	0,318182	0,136364	0,318182	0,136364	0,04545	0	0,5	0,318182	0,136364	0,04545	22	
SN2-3-S-937/CNA9	ND	0	0	0	1	7	9	2	19	0	0	0	0	0,05263	0,368421	0,473684	0,05263	0,368421	0,473684	0,10526	0	0,05263	0,368421	0,473684	0,10526	19	
SN2-3-S-1159/CNA9	ND	0	0	0	4	5	7	0	16	0	0	0	0	0,25	0,3125	0,4375	0,25	0,3125	0,4375	0	0	0,25	0,3125	0,4375	0	16	
SN2-3-S-1246/CNA9	ND	0	0	0	19	13	5	2	39	0	0	0	0	0,48718	0,333333	0,128205	0,48718	0,333333	0,128205	0,05128	0	0,48718	0,333333	0,128205	0,05128	39	
SN2-3-S-1296/CNA9	ND	0	0	0	3	4	9	7	23	0	0	0	0	0,13043	0,173913	0,391304	0,13043	0,173913	0,391304	0,30435	0	0,13043	0,173913	0,391304	0,30435	23	
SN2-3-S-3381/CNA9	ND	0	0	0	14	16	21	4	55	0	0	0	0	0,25455	0,290909	0,381818	0,25455	0,290909	0,381818	0,07273	0	0,25455	0,290909	0,381818	0,07273	55	
SN2-3-S-4054/CNA9	ND	0	0	0	7	10	1	0	18	0	0	0	0	0,555556	0,055556	0,555556	0	0,555556	0,055556	0	0	0,555556	0,055556	0,555556	0	18	
SN2-4-S-1714/CNA9	ND	0	0	0	0	6	7	5	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0,333333	0,388889	0,27778	0	0	0,333333	0,388889	0,27778	18	
SN2-4-S-1744/CNA9	ND	0	0	0	5	7	6	3	21	0	0	0	0	0,2381	0,333333	0,285714	0,2381	0,333333	0,285714	0,14286	0	0,2381	0,333333	0,285714	0,14286	21	
SN2-4-S-2114/CNA9	ND	0	0	0	8	7	5	2	22	0	0	0	0	0,36364	0,318182	0,227273	0,36364	0,318182	0,227273	0,09091	0	0,36364	0,318182	0,227273	0,09091	22	
SN2-4-S-4650/CNA9	ND	0	0	0	0	11	14	3	28	0	0	0	0	0	0,392857	0,392857	0,5	0,392857	0,392857	0,10774	0	0,392857	0,392857	0,5	0,10774	28	
SN2-5-S-128/CNA9	( 2)gl	0	0	0	3	7	4	4	18	0	0	0	0	0,16667	0,388889	0,222222	0,16667	0,388889	0,222222	0,22222	0	0,16667	0,388889	0,222222	0,22222	18	
SN2-5-S-2261/CNA9	( 2)gl	0	0	0	19	3	1	3	26	0	0	0	0	0,73077	0,115385	0,038462	0,73077	0,115385	0,038462	0,11538	0	0,73077	0,115385	0,038462	0,11538	26	
SN2-5-S-3086/CNA9	( 2)gl	0	0	0	8	8	3	0	19	0	0	0	0	0,42105	0,421053	0,157895	0,42105	0,421053	0,157895	0	0	0,42105	0,421053	0,157895	0	19	
SN2-5-S-4335/CNA9	( 2)gl	0	0	0	14	9	1	0	24	0	0	0	0	0,58333	0,375	0,041667	0,58333	0,375	0,041667	0	0	0,58333	0,375	0,041667	0	24	
SN2-6-S-1820/CNA9	elF3-59	0	0	0	1	11	7	0	19	0	0	0	0	0,05263	0,578947	0,368421	0,05263	0,578947	0,368421	0	0	0,05263	0,578947	0,368421	0	19	
SN2-6-S-2265/CNA9	elF3-59	0	0	0	5	6	6	0	17	0	0	0	0	0,352941	0,352941	0,352941	0,352941	0,352941	0,352941	0	0	0,352941	0,352941	0,352941	0	17	
SN2-6-S-2466/CNA9	elF3-59	0	0	0	0	9	15	5	29	0	0	0	0	0,310345	0,517241	0,17241	0,310345	0,517241	0,17241	0,17241	0	0,310345	0,517241	0,17241	0,17241	29	
SN2-6-S-4212/CNA9	elF3-59	0	0	0	0	4	10	6	20	0	0	0	0	0	0,2	0,5	0,3	0,2	0,5	0,3	0,3	0	0,2	0,5	0,3	20	
SN2-7-S-1828/CNA9	stan	0	0	0	24	13	18	0	55	0	0	0	0	0,236364	0,327273	0,327273	0,236364	0,327273	0,327273	0	0	0,236364	0,327273	0,327273	0	55	
SN2-7-S-2160/CNA9	stan	0	0	0	11	13	16	6	47	0	0	0	0	0,33404	0,276596	0,340426	0,33404	0,276596	0,340426	0,12766	0	0,33404	0,276596	0,340426	0,12766	47	
SN2-7-S-2309/CNA9	stan	0	0	0	17	11	18	9	55	0	0	0	0	0,30909	0,2	0,327273	0,30909	0,2	0,327273	0,16364	0	0,30909	0,2	0,327273	0,16364	55	
SN2-7-S-2360/CNA9	stan	0	0	0	8	13	29	7	57	0	0	0	0	0,14035	0,22807	0,508772	0,14035	0,22807	0,508772	0,12281	0	0,14035	0,22807	0,508772	0,12281	57	
SN2-7-S-2805/CNA9	stan	0	0	0	7	16	27	4	54	0	0	0	0	0,12963	0,296296	0,5	0,12963	0,296296	0,5	0,07407	0	0,12963	0,296296	0,5	0,07407	54	
SN2-7-S-3345/CNA9	stan	0	0	2	24	21	7	0	54	0	0	0	0	0,44444	0,388889	0,12963	0,44444	0,388889	0,12963	0	0	0,44444	0,388889	0,12963	0	54	
SN2-7-S-3778/CNA9	stan	1	1	8	22	8	1	0	41	0,02439	0,02439	0,195122	0	0,53659	0,195122	0,02439	0,02439	0,195122	0,02439	0	0	0,53659	0,195122	0,02439	0	41	
SN2-7-S-4120/CNA9	stan	0	0	0	30	7	1	0	45	0	0	0	0	0,66667	0,155556	0,022222	0,66667	0,155556	0,022222	0	0	0,66667	0,155556	0,022222	0	45	
SN2-8-S-2486/CNA9	AsnRS	0	0	0	17	12	18	1	48	0	0	0	0	0,35417	0,25	0,375	0,35417	0,25	0,375	0,02083	0	0,35417	0,25	0,375	0,02083	48	
SN2-8-S-3416b/CNA9	AsnRS	0	0	0	25	21	12	2	60	0	0	0	0	0,41667	0,35	0,2	0,41667	0,35	0,2	0,03333	0	0,41667	0,35	0,2	0,03333	60	
SN2-9-S-2260/CNA9	elF3-52	0	0	0	9	13	19	0	41	0	0	0	0	0,21951	0,317073	0,463415	0,21951	0,317073	0,463415	0	0	0,21951	0,317073	0,463415	0	41	
SN2-1-E-379/CNA9	emb	6	20	17	9	0	0	0	52	0,115385	0,384615	0,326923	0,17308	0	0	0	0,115385	0,384615	0,326923	0,17308	0	0	0,115385	0,384615	0,326923	0,17308	52
SN2-1-E-710/CNA9	emb	1	18	23	22	0</																					

Alleles	Genes/ Cytological position	Fly number for each phenotype										Total number of files	Phenotype scoring compared to CNA9										Total number of files
		SE	E	WE	NE	WS	S	SS	Males/ Females	SE	E		WE	NE	WS	S	SS	Males/ Females					
EN2-1-E-1836/CNA9	emb	100%	66,66%	33,33%	0	-33,33%	-66,66%	-100%	52	100%	66,66%	33,33%	0	-33,33%	-66,66%	-100%	52						
EN2-1-E-1854/CNA9	emb	7	41	3	0	1	0	0	49	0,134615	0,788462	0,057692	0	0,019231	0	0	49						
EN2-2-E-1768/CNA9	E(Pc)	10	36	3	0	0	0	0	44	0,204082	0,734694	0,061224	0	0	0	0	44						
EN2-2-E-4112/CNA9	E(Pc)	0	13	10	10	1	0	0	34	0	0,382353	0,294118	0,29412	0,029412	0	0	34						
EN2-3-E-451/CNA9	ND	4	16	5	17	2	0	0	44	0,090909	0,363636	0,113636	0,38636	0,045455	0	0	44						
EN2-3-E-477/CNA9	ND	0	0	25	31	0	0	0	56	0	0,138889	0,555556	0,30556	0	0	0	56						
EN2-4-E-1085/CNA9	ND	0	3	22	26	0	0	0	51	0	0,058824	0,431373	0,5098	0	0	0	51						
EN2-4-E-1136/CNA9	ND	0	0	1	9	14	2	0	26	0	0,038462	0,34615	0,538462	0,076923	0	0	26						
EN2-4-E-1209/CNA9	ND	0	0	12	36	2	0	0	42	0	0	0,285714	0,85714	0,047619	0	0	42						
EN2-5-E-1313/CNA9	ND	0	0	12	36	2	0	0	50	0	0	0,24	0,72	0,04	0	0	50						
EN2-5-E-1367/CNA9	ND	0	0	7	34	12	2	0	55	0	0	0,127273	0,61818	0,218182	0,036364	0	55						
EN2-6-E-1032/CNA9	ND	0	1	3	31	6	1	0	42	0	0,02381	0,071429	0,7381	0,142857	0,02381	0	42						
EN2-6-E-1365/CNA9	ND	0	0	0	30	8	0	0	38	0	0	0	0,78947	0,210526	0	0	38						
EN2-6-E-1430/CNA9	ND	0	0	2	31	7	0	0	40	0	0	0,05	0,775	0,175	0	0	40						
EN2-6-E-1465/CNA9	ND	0	0	10	40	2	0	0	52	0	0	0,192308	0,76923	0,038462	0	0	52						
EN2-6-E-2982/CNA9	ND	0	11	18	15	0	0	0	44	0	0,25	0,409091	0,34091	0	0	0	44						
EN2-7-E-1568/CNA9	ectinoid	0	6	9	10	1	0	0	26	0	0,230769	0,346154	0,38462	0,038462	0	0	26						
EN2-7-E-1864/CNA9	ectinoid	1	9	18	20	4	0	0	52	0,019231	0,173077	0,346154	0,38462	0,076923	0	0	52						
EN2-8-E-558/CNA9	Rae1	12	27	12	4	0	0	0	55	0,218182	0,490909	0,218182	0,07273	0	0	0	55						
EN2-8-E-992/CNA9	Rae1	5	11	0	1	0	0	0	17	0,294118	0,647059	0	0,05882	0	0	0	17						
EN2-8-E-1896/CNA9	Rae1	8	20	0	0	0	1	0	29	0,275862	0,689655	0	0	0,034483	0	0	29						
EN2-9-E-230/CNA9	CG6583	13	15	0	0	0	0	0	28	0,464286	0,535714	0	0	0	0	0	28						
EN2-9-E-326/CNA9	CG6583	12	20	4	0	0	0	0	36	0,333333	0,555556	0,111111	0	0	0	0	36						
EN2-9-E-1012/CNA9	CG6583	11	28	5	0	0	0	0	44	0,25	0,636364	0,113636	0	0	0	0	44						
EN2-9-E-1448/CNA9	CG6583	10	19	0	0	0	0	0	29	0,344828	0,655172	0	0	0	0	0	29						
EN2-9-E-1754/CNA9	CG6583	3	20	0	0	0	0	0	23	0,130435	0,869565	0	0	0	0	0	23						
EN2-9-E-2701/CNA9	CG6583	23	12	0	0	0	0	0	35	0,657143	0,342857	0	0	0	0	0	35						
EN2-10-E-1067/CNA9	ND	0	0	9	11	2	2	0	24	0	0	0,375	0,45833	0,083333	0,083333	0	24						
EN2-10-E-1221/CNA9	ND	0	0	8	13	3	0	0	24	0	0	0,333333	0,54167	0,125	0	0	24						
EN2-11-E-415/CNA9	toc	8	30	6	2	0	0	0	46	0,173913	0,652174	0,130435	0,04348	0	0	0	46						
EN2-11-E-555/CNA9	toc	15	39	3	1	0	0	0	58	0,258621	0,672414	0,051724	0,01724	0	0	0	58						
EN2-11-E-2545/CNA9	toc	0	3	15	44	5	1	0	68	0	0,044118	0,220588	0,64706	0,073529	0,014706	0	68						
EN2-11-E-2887/CNA9	toc	0	2	5	38	4	1	1	51	0	0,039216	0,098039	0,7451	0,078431	0,019608	0,01961	51						
EN2-11-E-3990/CNA9	toc	0	0	6	48	4	2	0	60	0	0	0,1	0,8	0,066667	0,033333	0	60						
EN2-11-E-4629/CNA9	toc	0	0	13	21	2	3	0	39	0	0	0,333333	0,53846	0,051282	0,076923	0	39						
EN2-12-E-2494/CNA9	shot	4	10	24	24	3	0	0	67	0,059701	0,149254	0,358209	0,35821	0,044776	0	0	67						
EN2-12-E-3566/CNA9	shot	0	3	6	35	13	3	0	60	0	0,05	0,1	0,58333	0,216667	0,05	0	60						
EN2-12-E-4271/CNA9	shot	0	2	10	35	1	4	0	52	0	0,038462	0,192308	0,67308	0,019231	0,076923	0	52						
SN3-1-S-1902/CNA9	tara	0	0	0	4	8	10	3	25	0	0	0	0,16	0,32	0,4	0,12	25						
CNA9/+; SN3-2-S-1878/+	ND	0	0	0	6	7	8	2	23	0	0	0	0,26087	0,304348	0,347826	0,08696	23						
CNA9/+; SN3-2-S-1922/+	ND	0	0	0	2	7	8	5	22	0	0	0	0,09091	0,318182	0,363636	0,22727	22						
CNA9/+; SN3-3-S-1472/+	ND	0	0	0	4	7	8	5	24	0	0	0	0,16667	0,291667	0,333333	0,20833	24						
CNA9/+; SN3-3-S-2006/+	ND	0	0	0	4	9	9	1	23	0	0	0	0,17391	0,391304	0,391304	0,04348	23						
CNA9/+; SN3-4-S-1330/+	77C6-77E1	0	0	0	0	10	5	3	18	0	0	0	0	0,555556	0,277778	0,16667	18						

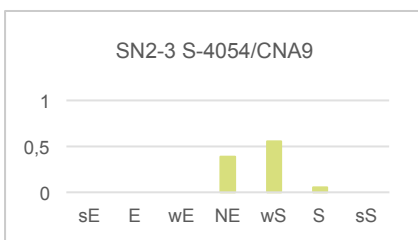
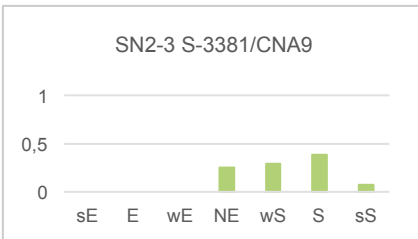
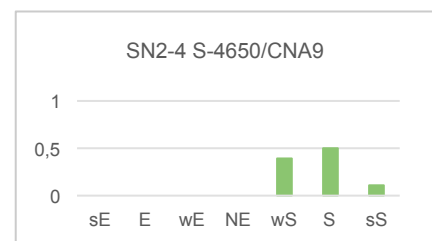
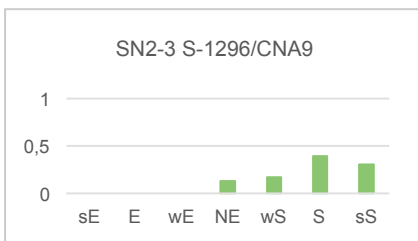
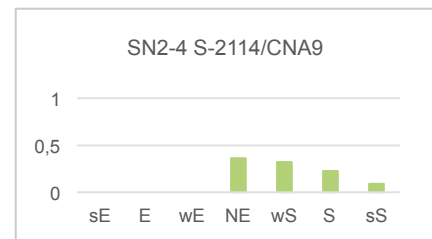
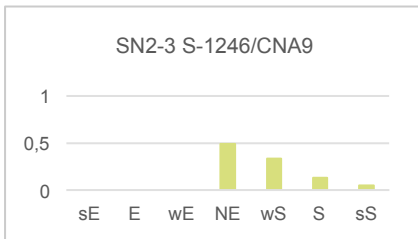
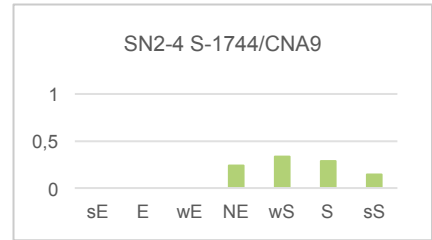
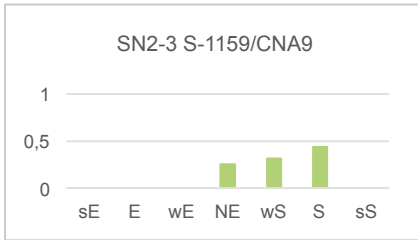
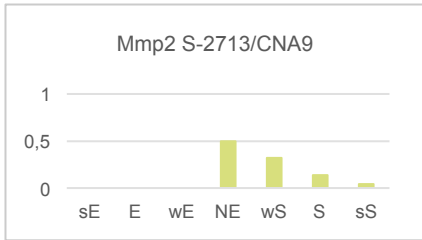
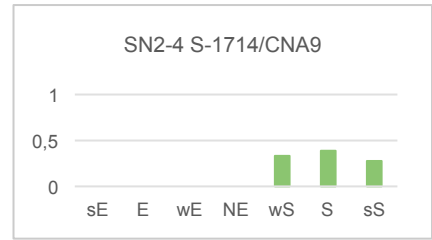
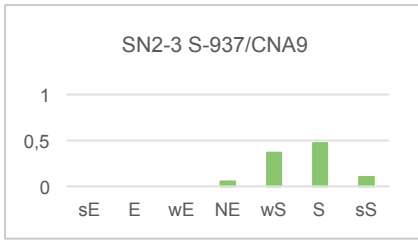
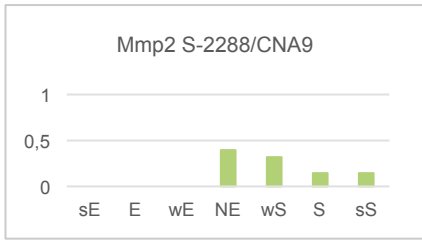
Alleles	Genes/ Cytological position	Fly number for each phenotype										Total number of flies	Phenotype scoring compared to CNA9										Total number of flies
		SE	E	WE	NE	WS	S	SS	Males/ Females	SE	E		WE	NE	WS	S	SS	Males/ Females					
CNA9/+;SN3-4 S-2552/+	77C6-77E1	100%	66,66%	33,33%	0	-33,33%	-66,66%	-100%	22	100%	66,66%	33,33%	0	-33,33%	-66,66%	-100%	22						
CNA9/+;SN3-4 S-2807/+	77C6-77E1	0	0	0	5	7	10	1	22	0	0	0	0,22727	0,318182	0,454545	0,04545	22						
CNA9/+;SN3-5 S-756/+	69B4-69C4	0	0	0	0	8	9	0	21	0	0	0	0,19048	0,380952	0,428571	0	21						
CNA9/+;SN3-5 S-2400/+	69B4-69C4	0	0	0	0	6	6	5	17	0	0	0	0	0,352941	0,352941	0,29412	17						
CNA9/+;SN3-5 S-2424/+	69B4-69C4	0	0	1	15	7	10	0	33	0	0	0,0330303	0,45455	0,212121	0,30303	0	33						
CNA9/+;SN3-5 S-2548/+	69B4-69C4	0	4	2	20	4	8	1	39	0	0,102564	0,051282	0,51282	0,102564	0,205128	0,02564	39						
CNA9/+;SN3-5 S-4236/+	69B4-69C4	0	0	0	0	8	13	2	23	0	0	0	0	0,347826	0,565217	0,08696	23						
CNA9/+;SN3-6 S-1017/+	90F4-90F4	0	0	0	5	10	10	3	28	0	0	0	0,17857	0,357143	0,357143	0,10714	28						
CNA9/+;SN3-6 S-2419/+	90F4-90F4	0	0	0	2	10	11	3	26	0	0	0	0,07692	0,384615	0,423077	0,11538	26						
CNA9/+;SN3-7 S-320/+	ND	0	0	0	0	3	10	8	21	0	0	0	0,14286	0,47619	0,380952	0	21						
CNA9/+;SN3-7 S-2037/+	ND	0	0	0	4	6	8	2	21	0	0	0	0,19048	0,285714	0,380952	0,09524	21						
CNA9/+;EN3-1 E-60/+	gpp	11	19	6	0	0	0	0	36	0,305556	0,527778	0,166667	0	0	0	0	36						
CNA9/+;EN3-1 E-1758/+	gpp	0	0	2	10	6	8	1	27	0	0	0,074074	0,37037	0,222222	0,296296	0,03704	27						
CNA9/+;EN3-1 E-3000/+	gpp	0	0	4	40	8	1	0	53	0	0	0,075472	0,75472	0,150943	0,018868	0	53						
CNA9/+;hth S-195/+	hth	0	0	0	18	11	11	1	41	0	0	0	0,43902	0,268293	0,268293	0,02439	41						

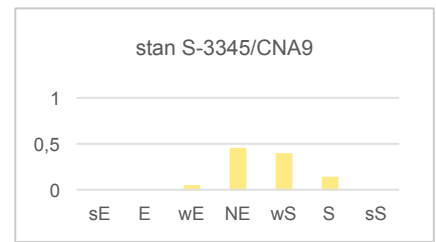
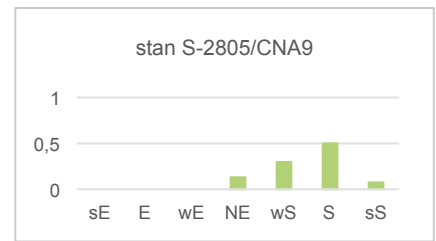
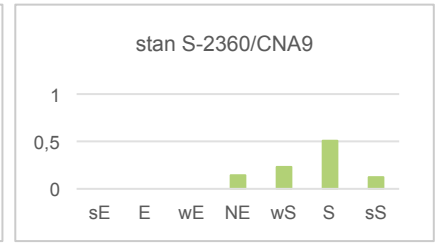
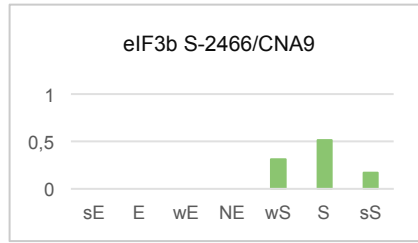
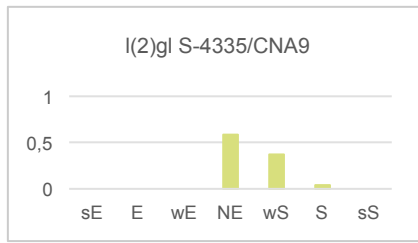
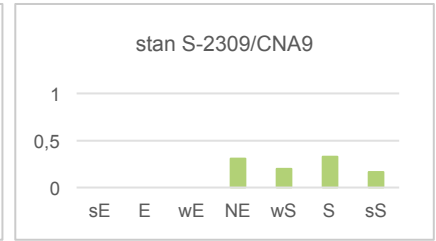
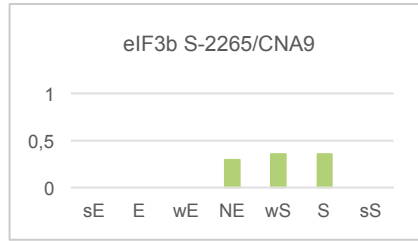
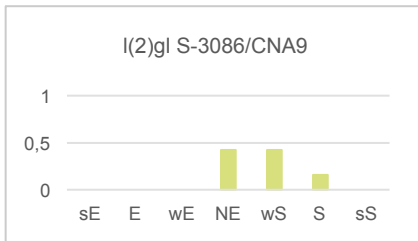
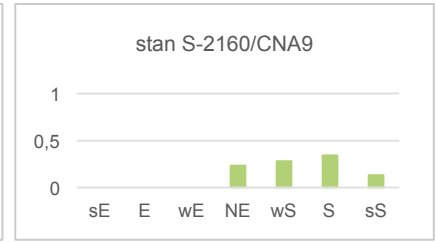
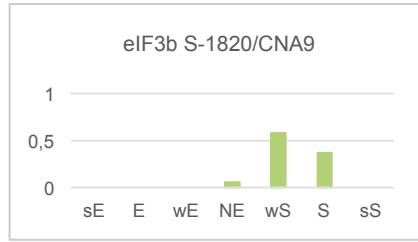
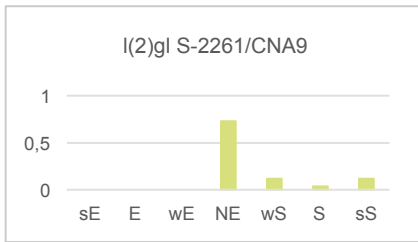
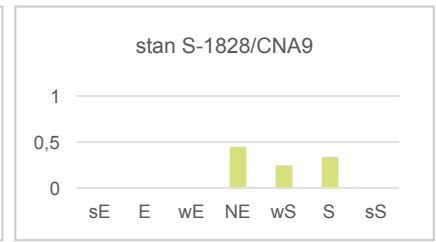
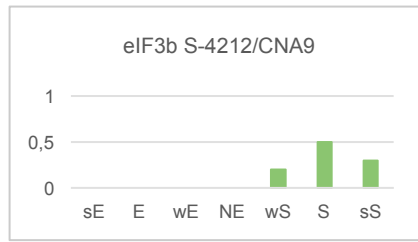
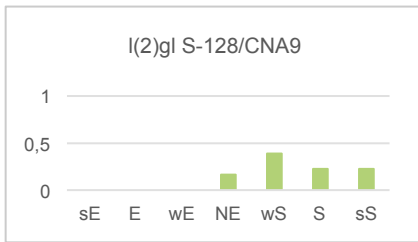
### Annex 3. Representation of the modified CNA9 phenotype for each modifiers

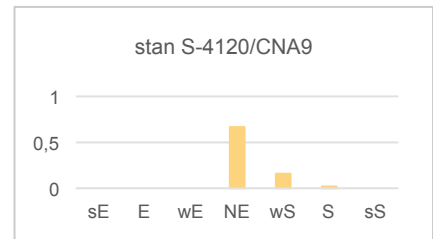
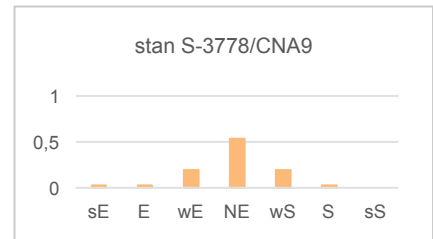


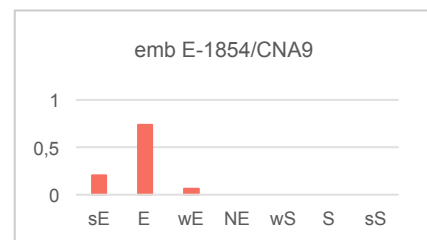
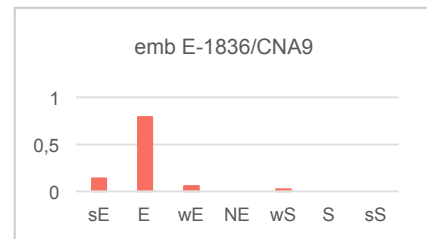
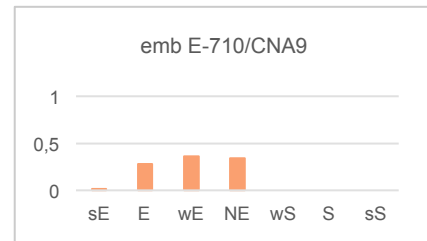
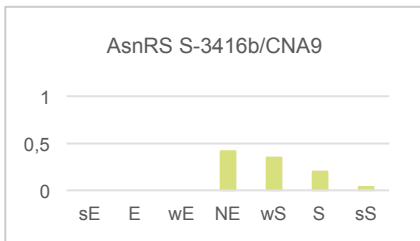
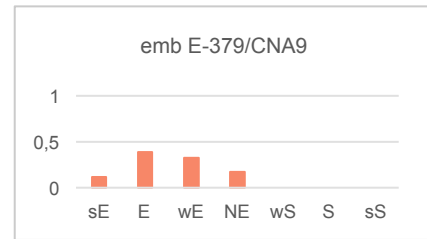
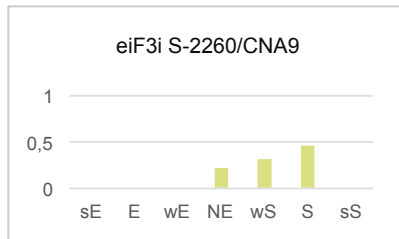
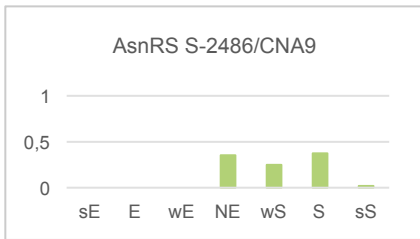


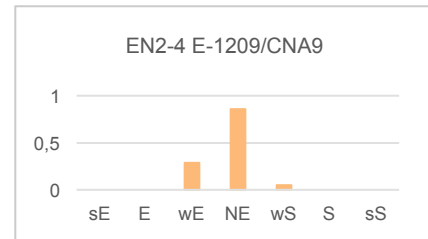
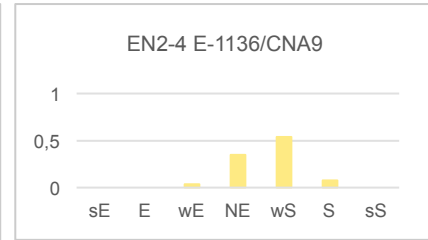
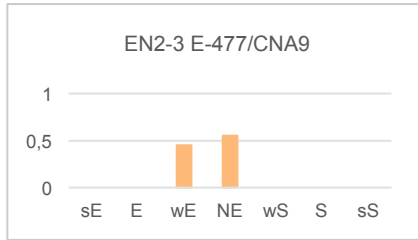
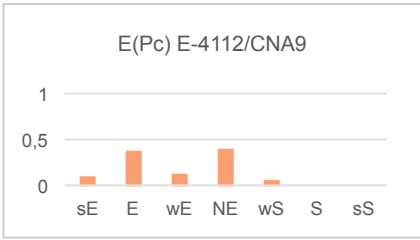
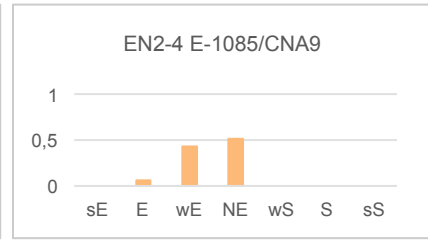
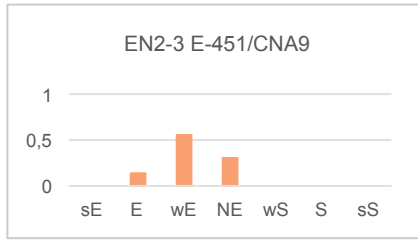
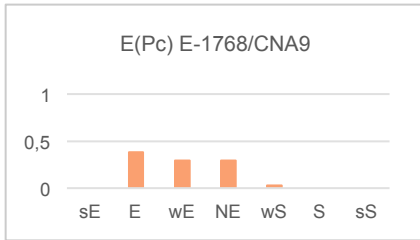


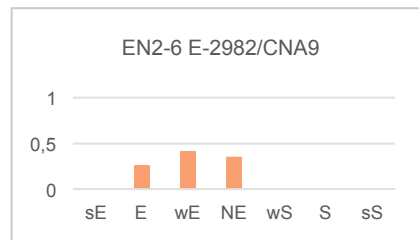
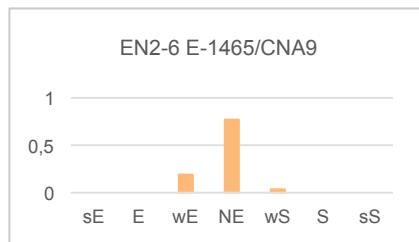
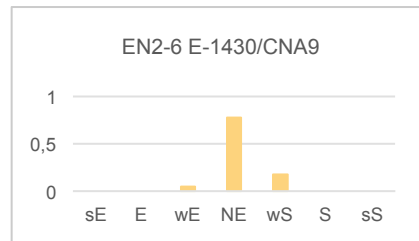
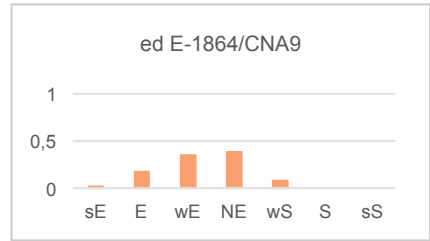
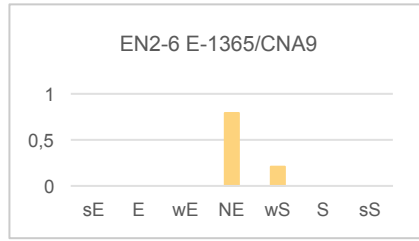
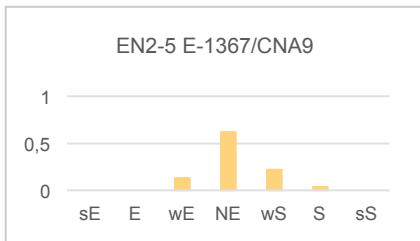
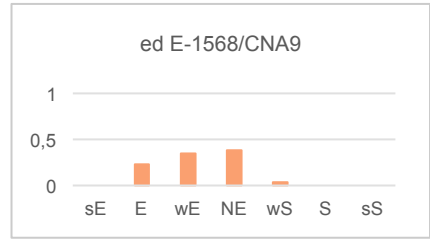
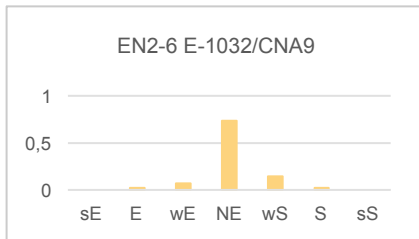
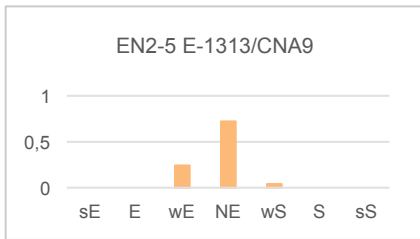


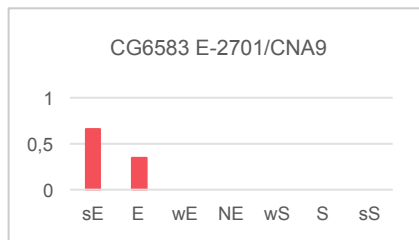
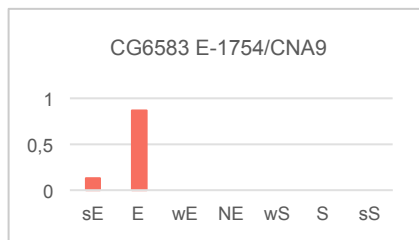
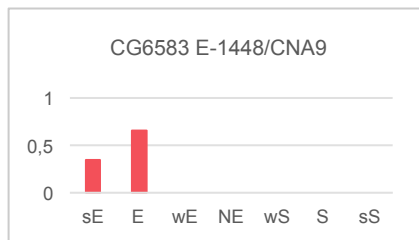
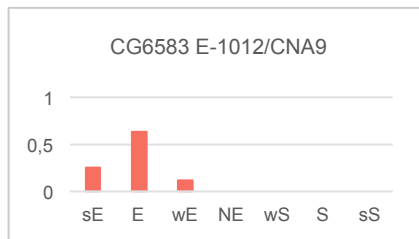
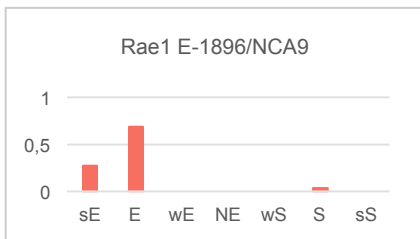
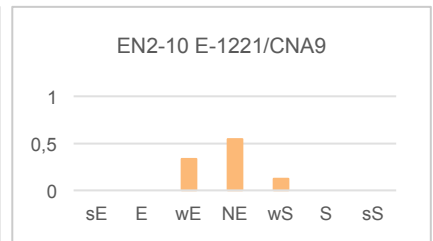
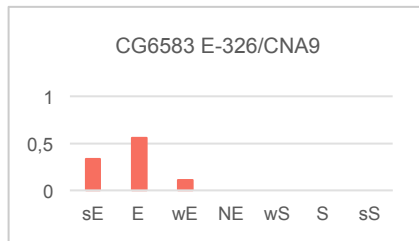
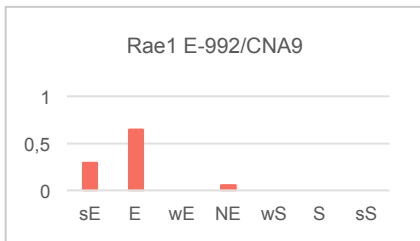
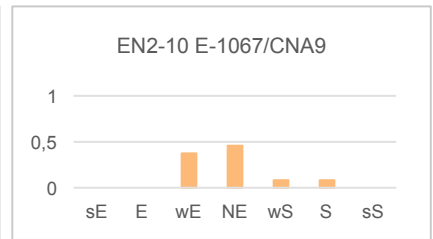
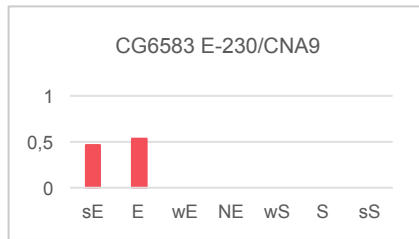
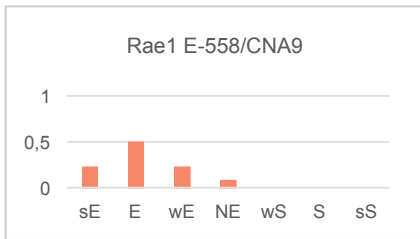


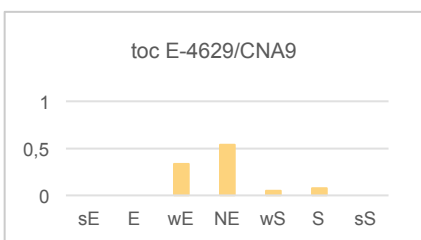
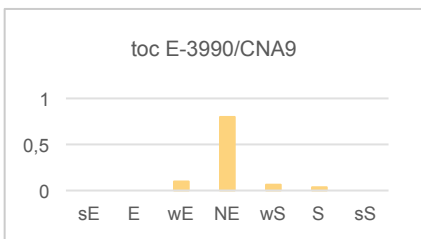
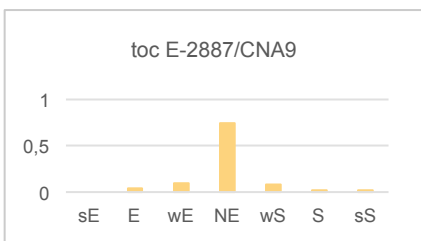
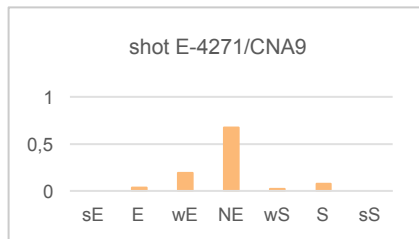
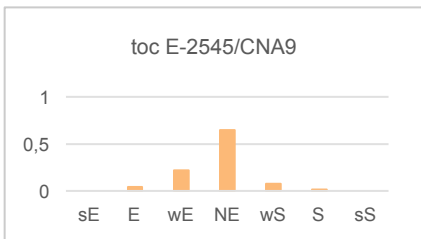
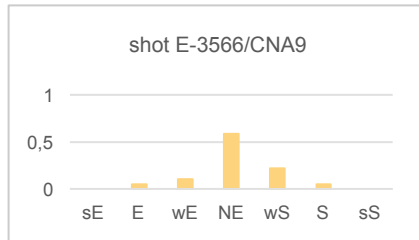
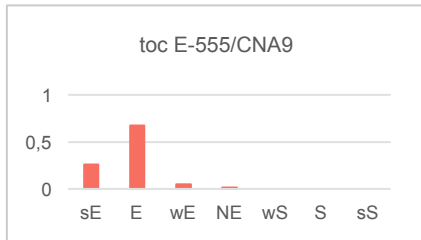
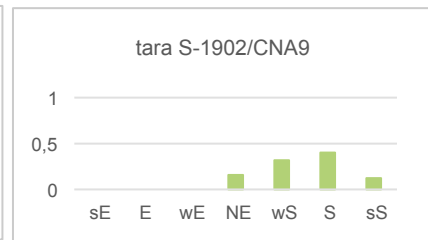
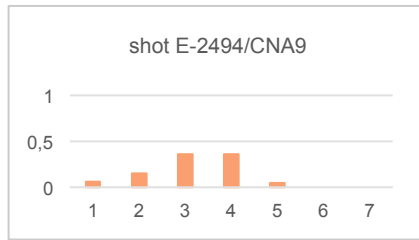
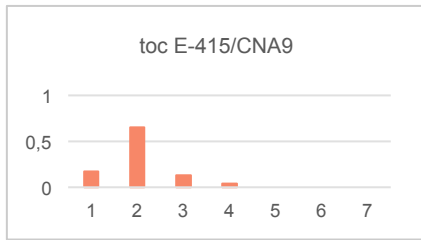




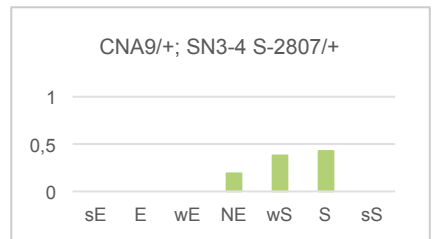
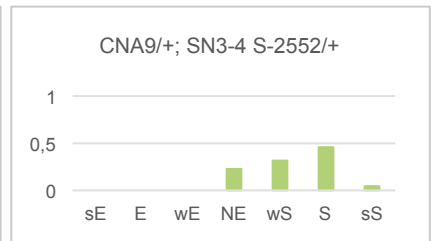
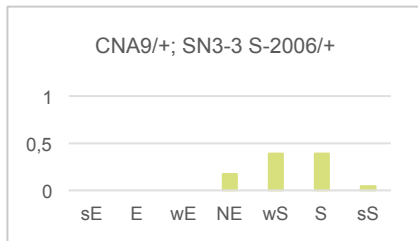
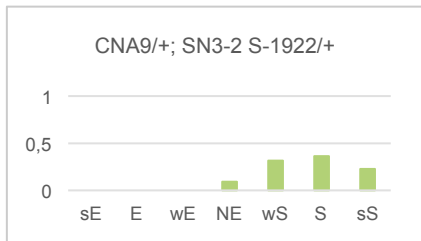
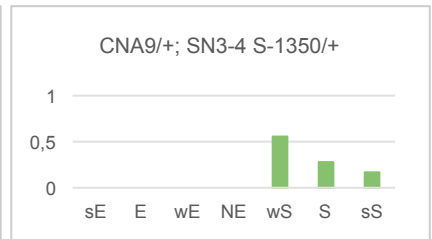
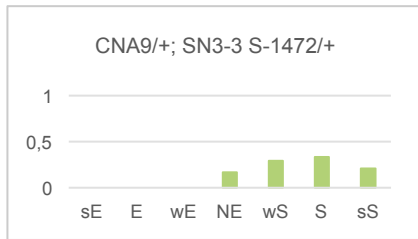
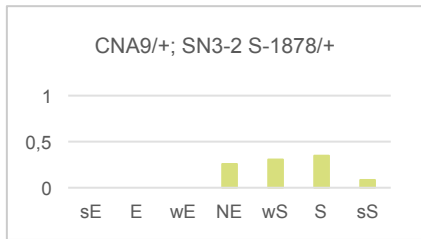


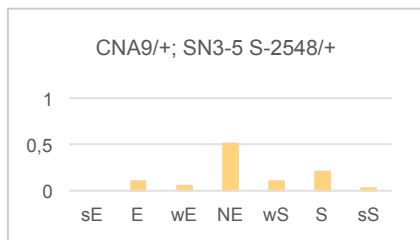
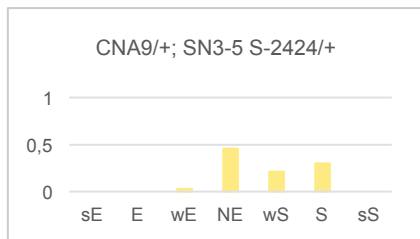
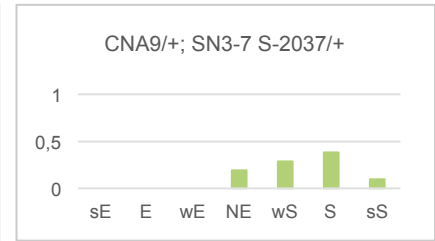
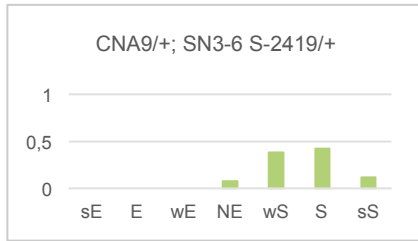
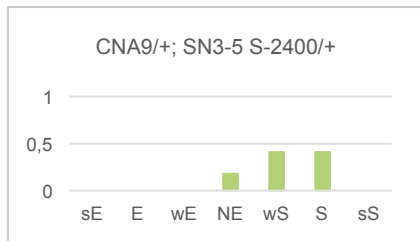
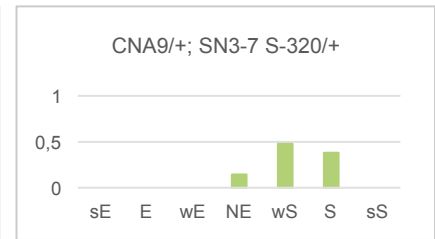
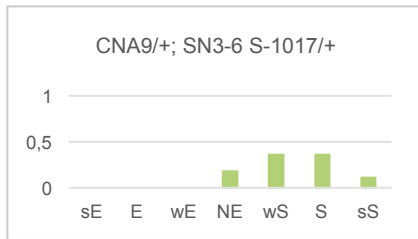
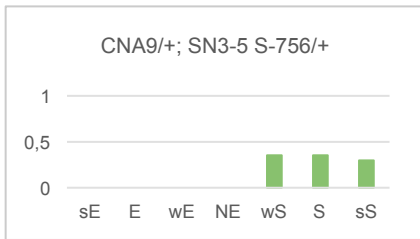


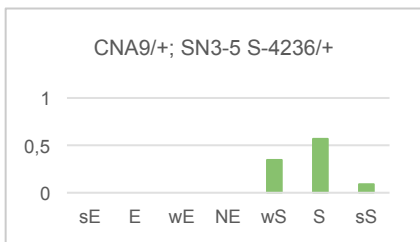
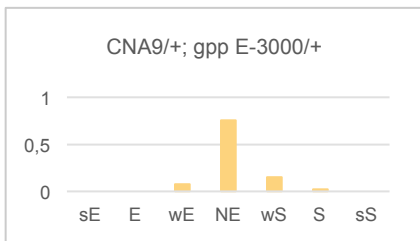
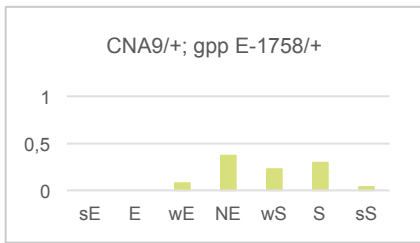
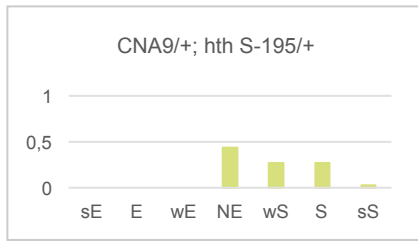
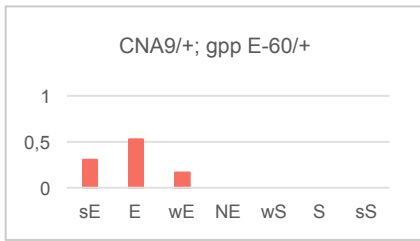










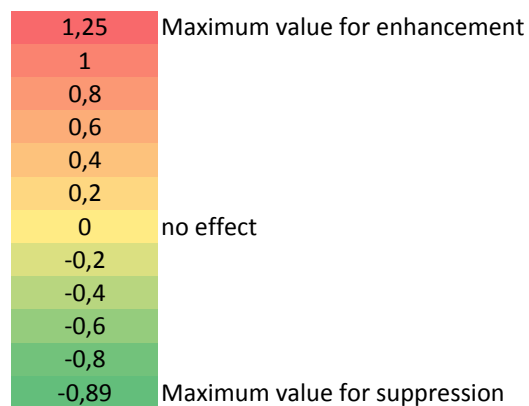


#### Annex 4. List of the modifiers identified in the NA9-dependent eye screen

Nbr. of analysed flies	Chr.	Groups	Gene / Cytological position	Genotype	Index of modification			
34				CNA9/+	0,00			
28	II	SN2-1	grainy head (grh)	grh S-60/CNA9	-0,33			
28				grh S-63/CNA9	-0,42			
20				grh S-65/CNA9	-0,23			
27				grh S-76/CNA9	-0,27			
26				grh S-78/CNA9	-0,49			
30				grh S-109/CNA9	-0,43			
30				grh S-159/CNA9	-0,64			
18				grh S-161/CNA9	-0,48			
18				grh S-226/CNA9	-0,39			
29				grh S-2962/CNA9	-0,32			
54				grh S-3053/CNA9	-0,33			
28				II	SN2-2	Matrix metalloproteinase	Mmp2 S-2288/CNA9	-0,23
22							Mmp2 S-2713/CNA9	-0,13
19				II	SN2-3	ND	SN2-3 S-937/CNA9	-0,43
16	SN2-3 S-1159/CNA9	-0,28						
39	SN2-3 S-1246/CNA9	-0,07						
23	SN2-3 S-1296/CNA9	-0,51						
55	SN2-3 S-3381/CNA9	-0,24						
18	SN2-3 S-4054/CNA9	-0,11						
18	II	SN2-4	ND	SN2-4 S-1714/CNA9	-0,54			
21				SN2-4 S-1744/CNA9	-0,33			
22				SN2-4 S-2114/CNA9	-0,24			
28				SN2-4 S-4650/CNA9	-0,46			
18	II	SN2-5	lethal (2) giant larvae (l(2)gl)	l(2)gl S-128/CNA9	-0,39			
26				l(2)gl S-2261/CNA9	-0,07			
19				l(2)gl S-3086/CNA9	-0,13			
24				l(2)gl S-4335/CNA9	-0,04			
19	II	SN2-6	eIF3-S9/eIF3b	elf3-S9 S-1820/CNA9	-0,33			
17				elf3-S9 S-2265/CNA9	-0,24			
29				elf3-S9 S-2466/CNA9	-0,51			
20				elf3-S9 S-4212/CNA9	-0,59			
40	II	SN2-7	starry night (stan)	stan S-1828/CNA9	-0,08			
34				stan S-2160/CNA9	-0,23			
39				stan S-2309/CNA9	-0,24			
40				stan S-2360/CNA9	-0,33			
37				stan S-2805/CNA9	-0,29			
12				stan S-3345/CNA9	0,01			
31				stan S-3778/CNA9	0,24			
14				stan S-4120/CNA9	0,15			
48				II	SN2-8	AsnRS	AsnRS S-2486/CNA9	-0,22
60							AsnRS S-3416b/CNA9	-0,15
41	II	SN2-9	eIF3-S2/Trip1/eIF3i	elF3-S2 S-2260/CNH	-0,19			

Nbr. of analysed flies	Chr.	Groups	Gene / Cytological position	Genotype	Index of modification
52	II	EN2-1	embargoed (emb)	emb E-379/CNA9	0,67
64				emb E-710/CNA9	0,52
52				emb E-1836/CNA9	0,87
49				emb E-1854/CNA9	0,91
34	II	EN2-2	enhancer of polycomb (E(Pc))	E(Pc) S-1768/CNA9	0,48
44				E(Pc) S-4112/CNA9	0,49
36	II	EN2-3	ND	EN2-3 E-451/CNA9	0,47
56				EN2-3 E-477/CNA9	0,34
51	II	EN2-4	ND	EN2-4 E-1085/CNA9	0,38
42				EN2-4 E-1209/CNA9	0,27
26				EN2-4 E-1136/CNA9	-0,02
50	II	EN2-5	ND	EN2-5 E-1313/CNA9	0,26
55				EN2-5 E-1367/CNA9	0,14
42	II	EN2-6	ND	EN2-6 E-1032/CNA9	0,17
38				EN2-6 E-1365/CNA9	0,12
40				EN2-6 E-1430/CNA9	0,15
52				EN2-6 E-1465/CNA9	0,24
44				EN2-6 E-2982/CNA9	0,50
26	II	EN2-7	echinoid (ed)	ed E-1568/CNA9	0,45
52				ed E-1864/CNA9	0,40
55	II	EN2-8	Rae1	Rae1 E-558/CNA9	0,79
17				Rae1 E-992/CNA9	0,90
29				Rae1 E-1896/CNA9	0,89
28	II	EN2-9	CG6583	CG6583 E-230/CNA9	1,07
36				CG6583 E-326/CNA9	0,99
44				CG6583 E-1012/CNA9	0,96
29				CG6583 E-1448/CNA9	1,03
23				CG6583 E-1754/CNA9	0,96
35				CG6583 E-2701/CNA9	1,10
24	II	EN2-10	ND	EN2-10 E-1067/CNA9	0,29
24				EN2-10 E-1221/CNA9	0,32
46	II	EN2-11	toucan (toc)	toc E-415/CNA9	0,79
58				toc E-555/CNA9	0,86
68				toc E-2545/CNA9	0,20
51				toc E-2887/CNA9	0,13
60				toc E-3990/CNA9	0,12
39				toc E-4629/CNA9	0,18
67	II	EN2-12	short stop (shot)	shot E-2494/CNA9	0,49
60				shot E-3566/CNA9	0,19
52				shot E-4271/CNA9	0,26
25	III	SN3-1	taranis tara	tara S-1902/CNA9	-0,32
23	III	SN3-2	ND	CNA9/+; SN3-2 S-1878/+	-0,17
22				CNA9/+; SN3-2 S-1922/+	-0,33

Nbr. of analysed flies	Chr.	Groups	Gene / Cytological position	Genotype	Index of modification
24	III	SN3-3	ND	CNA9/+; SN3-3 S-1472/+	-0,28
23				CNA9/+; SN3-3 S-2006/+	-0,19
18	III	SN3-4	77C6-77E1	CNA9/+; SN3-4 S-1350/+	-0,40
22				CNA9/+; SN3-4 S-2552/+	-0,32
21				CNA9/+; SN3-4 S-2807/+	-0,28
17	III	SN3-5	69B4-69C4	CNA9/+; SN3-5 S-756/+	-0,51
17				CNA9/+; SN3-5 S-2400/+	-0,27
33				CNA9/+; SN3-5 S-2424/+	-0,03
39				CNA9/+; SN3-5 S-2548/+	0,12
23				CNA9/+; SN3-5 S-4236/+	-0,44
28	III	SN3-6	90F4-90F4	CNA9/+; SN3-6 S-1017/+	-0,33
26				CNA9/+; SN3-6 S-2419/+	-0,39
21	III	SN3-7	ND	CNA9/+; SN3-7 S-320/+	-0,28
21				CNA9/+; SN3-7 S-2037/+	-0,31
36	III	EN3-1	grappa gpp	CNA9/+; gpp E-60/+	0,87
27				CNA9/+; gpp E-1758/+	-0,16
53				CNA9/+; gpp E-3000/+	0,08
24	III		homothorax hth	CNA9/+; hth S-195/+	-0,12



## 4 Discussion

L'objectif de ce projet était d'utiliser la drosophile, *Drosophila melanogaster*, comme modèle d'étude afin d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires qui régulent l'activité leucémogénique de NA9. Les modèles que nous avons développés dans les systèmes hématopoïétique et visuel de la mouche se sont avérés très utiles dans l'identification de nouveaux facteurs potentiellement impliqués dans l'activité oncogénique de NA9. Ces facteurs seront discutés dans cette dernière partie.

### 4.1 L'activité de NA9 dans le système hématopoïétique de la mouche

Comme les données du premier article présenté ici le mentionnent, l'expression de NA9 dans le système hématopoïétique de la larve de drosophile a révélé de nombreuses similitudes avec les phénotypes précédemment décrits dans les modèles mammifères et chez le poisson-zèbre (Calvo KR, 2002; Forrester et al., 2011; Iwasaki et al., 2005; Kasper et al., 1999; Kroon et al., 2001; Takeda et al., 2006). En effet, parmi ces dernières, nous avons montré que l'oncoprotéine humaine NA9 induit une hyperplasie de la GL et une augmentation du nombre d'hémocytes circulants en réponse à un accroissement de la prolifération. Il s'avère également que l'activité de NA9 dans ce modèle requiert à la fois les répétitions FG/GLFG de NUP98 et les domaines PIM et HD de HOXA9. De plus, Hth, qui est l'homologue de MEIS1 chez la drosophile, collabore très fortement avec NA9. Finalement, nous avons montré que NA9 interférait avec la voie de signalisation induite par PVR, qui est un récepteur de type tyrosine kinase, homologue des récepteurs PDGF et VEGF chez les mammifères. Effectivement, les récepteurs de type tyrosine kinase (RTK) sont très largement impliqués dans les LMA (Doepfner et al., 2007; Nelson et al., 2017).

Similairement aux modèles AML1-ETO développés chez la drosophile, notre modèle NA9 récapitule les principaux aspects caractéristiques de son activité leucémogénique observés chez les mammifères, ce qui en fait un modèle complémentaire qui pourrait s'avérer

très utile dans la compréhension moléculaire de ces différents aspects. En effet, il nous a déjà permis d'identifier la voie de signalisation Pvr comme facteur clé de l'activité de NA9 et de façon très intéressante de mettre de l'avant un impact non-cellule autonome de l'expression de NA9.

#### **4.1.1 La voie de signalisation Pvr**

Nous avons lié l'activité proliférative de NA9 dans la GL à sa capacité d'interférer avec la voie de signalisation Pvr. Chez la drosophile, cette voie de signalisation est impliquée dans différents aspects de l'hématopoïèse embryonnaire mais également dans divers processus reliés à la réponse immunitaire. Ainsi, Pvr est requis pour la prolifération des hémocytes (Munier et al., 2002), leur survie (Bruckner et al., 2004), leur migration (Parsons and Foley, 2013) mais aussi en réponse à différents challenges immunitaires (Bond and Foley, 2009; Zettervall et al., 2004). Il a été montré que la voie de signalisation Pvr joue également un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie de la GL. Plus précisément, l'activité de Pvr dans la ZC est requise pour maintenir le caractère indifférencié des progéniteurs de la ZM en gardant des niveaux d'adénosine extracellulaire bas, prévenant ainsi l'activation du récepteur à l'adénosine, Ado-R, dans la ZM (Mondal et al., 2011). Pvr agit par l'intermédiaire de l'activateur transcriptionnel STAT92E, qui régule l'expression de l'adénosine désaminase sécrétée ADGF-A au niveau de la ZC. Ainsi, une réduction de la voie de signalisation Pvr induit une élévation des niveaux d'adénosine, ce qui conduit à l'activation des récepteurs Ado-R dans les progéniteurs de la ZM promouvant alors leur différenciation (Mondal et al., 2011). De plus, Mondal *et al.* ont montré quelques années plus tard, que NUP98 régulait les niveaux d'expression de Pvr (Mondal et al., 2014). Nous avons alors pensé que l'activité de NA9 pouvait interférer avec celle de NUP98 endogène et ainsi affecter les niveaux d'expression de Pvr. Cependant, nous n'avons observé aucune fluctuation des niveaux d'expression de Pvr ou encore de la désaminase ADGF-A. Ce qui suggère que NA9 agit : (i) soit plus haut dans la voie, c'est-à-dire sur l'activation du récepteur Pvr, ce qui pourrait être évalué par une immunocoloration de la forme activée de Pvr. Or, Pvr est activé dans la ZC par son ligand Pvf1, qui lui, est sécrété par les hémocytes du PSC (Mondal et al., 2011). Ainsi, NA9 pourrait affecter



de façon non cellule-autonome l'expression du ligand Pvf1 ou encore son transport du PSC vers la ZC.

(ii) soit qu'il n'interfère pas directement avec la voie Pvr/STAT92E/ADGF-A pour réguler le maintien des progéniteurs de la ZM mais sur un autre facteur et/ou voie de signalisation impliqué(e) dans la balance différenciation/maintien des progéniteurs de la ZM qui reste à déterminer.

Cette deuxième hypothèse semble plus probable compte tenu du fait que la surexpression de Pvr abolit complètement le phénotype induit par NA9 dans la GL. Cependant, il est également possible que la signalisation Pvr ne passe pas seulement par l'activation de STAT92E mais par un autre facteur dont l'expression pourrait être affectée par NA9. En effet, l'activité oncogénique de NA9 repose en partie sur son action en tant que facteur de transcription aberrant capable de moduler l'expression de nombreux gènes et ce de façon dépendante de l'homéodomaine de HOXA9 (Ghannam et al., 2004). Cette activité semble être également opérante chez la drosophile puisque nous avons montré que l'activité de NA9 requiert à la fois le domaine de transactivation NUP98 et l'homéodomaine de HOXA9. Nous avons alors procédé à une analyse transcriptomique comparative entre des GL exprimant NA9 et des GL sauvages afin d'identifier les transcrits spécifiquement modulés par NA9 (résultats non présentés). Cette analyse nous a permis d'identifier plusieurs gènes dont la transcription est modulée par NA9. Cependant, nous avons réalisé que dans cette analyse nous étions certainement passé à côté d'éléments clés. Chaque compartiment qui constitue la GL étant de taille différente et contribuant à l'homéostasie de la GL de façon différente, le meilleur moyen d'identifier les facteurs dont la transcription est affectée par NA9 serait probablement de procéder à l'analyse transcriptomique des différents types d'hémocytes de la GL séparément, c'est-à-dire les hémocytes de la ZC (qui expriment NA9), ceux de la ZM, ceux du PSC et enfin les hémocytes en circulation (qui eux aussi expriment NA9). Ceci permettrait de dresser un tableau des gènes modulés directement et indirectement par NA9 dans chaque compartiment.

### 4.1.2 L'activité non-cellule autonome de NA9

Nous avons observé que l'expression de NA9 dans la ZC n'affectait pas seulement la ZM mais aussi la taille et la structure du PSC suggérant une activité non-cellule autonome de NA9. De plus, il semblerait que cet effet soit également dépendant de Pvr puisque la surexpression du récepteur Pvr dans la ZC restaure à la fois la taille et la structure du PSC. Toutefois, jusqu'à maintenant, aucune étude dans la GL ne rapporte de signalisation émanant de la ZC vers le PSC. Cependant, il n'est pas exclu que la ZC soit en mesure d'envoyer des signaux vers le PSC, fonctionnant un peu comme une boucle de rétroaction, afin de contrôler l'homéostasie de la GL.

Par contre, il est évident que l'impact de NA9 sur le PSC a des répercussions sur la structure de la GL puisque comme mentionné dans l'introduction, le PSC joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la GL. Similairement au phénotype observé suite à l'expression de NA9 dans la GL, de nombreuses études montrent que l'augmentation de la taille ou de l'activité du PSC modifie l'équilibre entre les prohémyocytes et les hémyocytes. En effet, le PSC est une source de ligands qui activent diverses voies de signalisation dans les ZC et ZM de la GL tels que Hh, Ser, Pvf-1, Upd3 (Krzemien et al., 2007; Mandal et al., 2007; Mondal et al., 2011; Sinenko et al., 2011). De plus, les cellules qui constituent le PSC présentent des filopodes qui s'étendent jusque dans la ZM, suggérant un moyen de communication directe entre le PSC et les prohémyocytes (Krzemien et al., 2007; Mandal et al., 2007; Pannetier et al., 2012).

Or, le PSC des GL exprimant NA9 ne présentent plus ces filopodes, mais devient très dense et compact ce qui affecte très certainement la communication entre le PSC et la ZM. Ainsi, l'expression de NA9 rend probablement le PSC non fonctionnel, c'est-à-dire incapable de transmettre les signaux nécessaires au maintien des progéniteurs de la ZM ce qui conduirait finalement à la différenciation précoce de ces derniers en hémyocytes matures. Cette hypothèse pourrait être testée. Dans un premier temps, si le PSC de glandes exprimant NA9 est bel et bien non fonctionnel, l'ablation du PSC dans ce contexte ne devrait avoir que peu d'incidence sur le phénotype de glandes exprimant NA9. Inversement, en exprimant directement les ligands Hh, Upd3 ou Ser dans la ZM, nous pourrions peut-être mimer une partie du rôle du PSC et ainsi restaurer en partie l'homéostasie de la GL. Cependant, il est fort possible que ce

ne soit pas aussi simple et que restaurer la fonction du PSC entraîne d'autres effets sur l'équilibre des ZC et ZM. D'autre part, le phénotype induit par NA9 est probablement une combinaison d'évènements à la fois de façon autonome dans la ZC et non autonome sur le PSC, ce qui rend d'autant plus complexe l'identification des mécanismes de l'activité de NA9 dans la GL.

#### **4.1.2.1 Comment l'expression de NA9 dans la ZC et les hémocytes circulants affecte la taille du PSC?**

Comme mentionné dans l'introduction, l'homéostasie de la GL n'est pas simplement régulée de façon autonome par les cellules qui la constituent mais impliquent un réseau bien plus complexe de signaux qui passent par la communication entre la GL et les autres tissus de la larve comme le système olfactif, le cerveau, l'apport de nutriment ou encore le système vasculaire (Letourneau et al., 2016). En effet, il a été montré que la voie de signalisation Slit/Robo, qui implique le système vasculaire, contribue au maintien de l'homéostasie de la GL (Morin-Poulard et al., 2016). Le ligand Slit, produit par les cellules du tube cardiaque (le système cardio-vasculaire de la mouche), active son récepteur Robo, exprimé par les cellules du PSC. Dans ce cas, la diminution du ligand Slit au niveau du tube cardiaque ou encore de son récepteur Robo dans le PSC induit l'augmentation de la taille de ce dernier. Il serait donc tout à fait envisageable que les hémocytes de la ZC qui sont en contact direct avec le tube cardiaque interagissent avec ces cellules pour finalement induire la sécrétion de facteurs, qui à leur tour, vont agir directement sur les cellules du PSC pour induire leur prolifération. Il a d'ailleurs été montré dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire que HOXA9 est capable de moduler son microenvironnement suite à l'activation transcriptionnelle de facteurs de croissance tels que TGF- $\beta$ 2, qui agit de manière paracrine sur le microenvironnement pour finalement stimuler la production de différents facteurs tels que CXCL12, IL-6, VEGF-A par les cellules qui constituent ce même microenvironnement (Ko et al., 2012). Il semblerait par ailleurs, suite aux résultats présentés dans le deuxième manuscrit, que l'activité leucémogénique de NA9 reposerait en partie sur sa capacité à moduler la plasticité cellulaire en affectant leur programme génétique et potentiellement leur microenvironnement.

De nombreux facteurs ont été identifiés comme acteur clé dans la régulation de la taille du PSC. Parmi ces derniers, l'activation de la voie Wnt/Wg ou l'inactivation de la voie BMP/Dpp dans le PSC, induit l'expansion de ce dernier en réponse à une activité accrue de dMyc, accompagnée d'une augmentation du nombre de progéniteurs de la ZM aux dépens des hémocytes différenciés (Pennetier et al., 2012; Sinenko et al., 2009). Ou encore, l'expression du facteur de transcription Jumu par les prohémocytes de la ZM qui serait requise à la fois pour la régulation de leur différenciation en hémocytes matures et pour le contrôle de la taille du PSC. En effet, la déplétion de Jumu dans la ZM induit une expansion du PSC en réponse à l'induction non-cellule autonome de dMyc dans ce dernier (Hao and Jin, 2017). D'après ces études, l'élargissement du PSC est souvent induit par une activité accrue de dMyc et est toujours accompagné d'une expansion de la ZM aux dépens des hémocytes différenciés de la ZC contrairement au phénotype que nous avons rapporté. Il serait intéressant de voir si l'expression de NA9 induit de façon non-cellule autonome une activité accrue de dMyc dans le PSC. Cependant, ceci n'expliquerait pas le changement morphologique que subit le PSC, entre autres, probablement causé par l'induction de la E-Cadherine.

Par ailleurs, en 2012, Benmimoun *et al.* ont décrit un phénotype très similaire au nôtre suite à l'analyse de GL au stade L3 qui sont *Pten* mutantes. En effet, similairement aux GL exprimant NA9, les GL *Pten* présentent une hyperplasie au niveau des lobes primaires et secondaires qui est associée à une prolifération accrue des hémocytes et présentent également de façon fréquente une dispersion précoce des lobes primaires (Benmimoun et al., 2012). De plus, une diminution des marqueurs associés aux progéniteurs est observée, ainsi que la présence de cellules différenciées à la fois dans les lobes primaires et secondaires, ce qui témoigne d'une différenciation précoce des progéniteurs. Enfin, un élargissement du PSC est également induit. Il semblerait donc que *Pten* soit requis pour prévenir la différenciation précoce des progéniteurs. Or *Pten* est une lipide phosphatase qui antagonise l'activité de la kinase PI3K impliquée dans la voie de signalisation InR/TOR. Benmimoun *et al.* ont montré que la voie de signalisation InR/TOR jouait un double rôle puisqu'elle semble requise à la fois dans les prohémocytes de la ZM afin de contrôler leur prolifération et leur maintien mais aussi dans le PSC où elle contrôle sa taille et son activité. Ainsi, l'hyperactivation de la voie InR/TOR dans le PSC induit son expansion et inhibe la différenciation des prohémocytes

(Benmimoun et al., 2012). L'activité de NA9 pourrait influencer les niveaux d'expression de Pten ou son activité dans la GL et contribuer en partie au phénotype que nous observons.

## 4.2 L'activité de NA9 dans l'œil de la mouche

Nos travaux dans l'œil composé de la mouche ont conduit à l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans l'activité oncogénique de NA9. Dans un premier temps, nous avons montré que l'expression de NA9 au cours du développement de l'œil composé chez la mouche dépendait des mêmes éléments caractéristiques que ceux identifiés chez les mammifères à savoir les répétitions FG/GLFG de NUP98 et les domaines PIM et HD de HOXA9. De plus, similairement aux modèles chez la souris, Hth qui est l'homologue de MEIS1 chez la drosophile collabore fortement avec NA9 (Kroon et al., 2001). Finalement, nous avons utilisé le phénotype induit par NA9 comme base pour générer un crible génétique modificateur afin d'identifier de nouveaux facteurs qui modulent l'activité de NA9. Ce crible a permis d'isoler 29 loci qui seront abordés dans cette prochaine section.

### 4.2.1 Les résultats du crible génétique

Suite au crible génétique décrit dans le 2<sup>ème</sup> manuscrit associé, nous avons identifiés 29 loci dont les mutations altèrent l'activité de NA9 dans l'œil composé de la mouche. Les gènes correspondant à 16 d'entre eux ont maintenant été identifiés. Dans un premier temps, nous avons vérifié que ces facteurs n'avaient pas d'influence sur l'expression de NA9 dans l'œil mais il serait également important de vérifier qu'ils n'ont pas d'effets sur l'expression des cofacteurs des gènes *HOX*, Hth et Exd. Ces facteurs étant requis pour l'activité de NA9, la modulation de leurs niveaux d'expression pourrait contribuer à exacerber ou au contraire supprimer le phénotype induit par NA9. Il semblerait toutefois que ce ne soit pas le cas puisque les niveaux d'expression de Hth ont été vérifiés pour certain d'entre eux et ne semblent pas modulés (données non présentées).

#### 4.2.1.1 Le facteur de transcription Hth

Parmi les 16 gènes identifiés, nous avons isolé des mutations dans trois gènes qui codent pour des facteurs impliqués dans l'activité oncogénique de NA9 entre autres le facteur de transcription Hth. En effet, nous avons isolé une mutation dans l'homologue de *Meis1*, *hth*. MEIS1 est connu pour accélérer drastiquement le développement de la LMA dans des souris NA9 (Kroon et al., 2001) et a été identifié comme un site d'intégration commun dans des souris BXH2 exprimant NA9 (Iwasaki et al., 2005). L'identification de Hth dans un modèle hétérologue tel que le notre confirme son importance dans l'activité de NA9. De plus, nous avons montré, à la fois dans le système hématopoïétique et visuel de la mouche, une importante collaboration entre NA9 et Hth dans l'induction de la prolifération cellulaire (Cf. figures 2. et 3.2). Il semble par ailleurs, que dans l'œil, la collaboration NA9-Hth soit dépendante de la voie de signalisation Hippo, qui est connue pour contrôler la croissance des tissus au cours du développement, suggérant un rôle de NA9 dans la capacité proliférative des cellules (Cf. figure 3.S2).

#### 4.2.1.2 Les facteurs de transport nucléo-cytoplasmique Rael et Emb

Plusieurs mutations ont également été isolées dans les gènes codant pour les facteurs de transport nucléo-cytoplasmique Rael et Emb, qui est l'homologue de XPO1. Il a été montré que ces deux facteurs RAE1 et XPO1 contribue à l'activité oncogénique de NA9 en interférant avec le transport nucléo-cytoplasmique de protéines, ARN et facteurs de transcription, à travers leur association au domaine GLEBS ou aux motifs FG/GLFG de NA9, respectivement (Dogan et al., 2011; Funasaka et al., 2011; Oka et al., 2016; Takeda et al., 2010; Xu and Powers, 2010). Par ailleurs, il s'agit ici de la première étude génétique qui identifie de façon non biaisée Rael et Emb comme des collaborateurs fonctionnels de NA9. Ces résultats supportent l'importance du rôle joué par leurs homologues RAE1 et XPO1 dans l'activité leucémogénique de NA9. Il serait intéressant de regarder si certains des facteurs identifiés dans le crible modulent l'activité de NA9 en interférant avec le transport nucléo-cytoplasmique.

Ces résultats confirment ainsi la capacité de notre approche à identifier des gènes pertinents dans l'activité de NA9. Par ailleurs, nous avons montré que la partie HOXA9 qui constitue la fusion NA9, lorsqu'exprimée seule, conduit à la formation d'un œil plus petit (**Cf. figure 3.1F**). Nous pourrions utiliser ce phénotype pour vérifier l'impact de nos modificateurs de l'activité de NA9 sur le phénotype HOXA9<sup>ΔNT</sup>. Nous pourrions alors envisager de séparer les facteurs identifiés en deux catégories : ceux qui interagissent avec la portion NUP98, comme Emb et Rae1, de ceux qui interagissent avec la portion HOXA9. Les mutations dans des facteurs qui interagissent avec la portion NUP98 ne devraient pas modifier le phénotype HOXA9<sup>ΔNT</sup>.

#### **4.2.1.3 Des facteurs épigénétiques qui influencent l'activité transcriptionnelle**

Le potentiel oncogénique de NA9 repose en partie sur sa capacité à induire de façon aberrante la transcription de gènes cibles (Ghannam et al., 2004; Kasper et al., 1999). Il a par ailleurs été montré que le coactivateur transcriptionnel CBP/p300 ou encore les facteurs épigénétiques HDAC1 et MLL1 contribuent à l'activité oncogénique de NA9 par l'intermédiaire d'interaction au niveau des motifs FG/GLFG de la portion NUP98 (Bai et al., 2006; Kasper et al., 1999; Rio-Machin et al., 2016; Rio-Machin et al., 2017; Shima et al., 2017; Xu et al., 2016b). Entre autres, la méthyltransférase MLL1 recrute NA9 au niveau des loci des gènes *HOX* et de leurs cofacteurs *Meis1* et *Pbx3* (Shima et al., 2017; Xu et al., 2016b).

Consistant avec ces données, nous avons identifié plusieurs gènes qui codent pour des facteurs épigénétiques. Ce qui renforce d'avantage la capacité de notre crible à identifier des partenaires pertinents dans l'activité de NA9. En effet, nous avons isolé des mutations dans la méthyltransférase grappa (gpp), l'homologue de DOT1L chez les mammifères, qui agissent comme des antagonistes de NA9. De façon très intéressante, il a été montré que DOT1L est requise dans le développement et le maintien des leucémies avec des réarrangements du gène *MLL* en induisant l'expression anormale de gènes (Chen and Armstrong, 2015). Ce qui pourrait laisser présager un rôle similaire dans l'activité de NA9.

Nous avons également identifié un membre du complexe Trithorax, Taranis (Tara). Il semblerait que Tara soit impliqué dans le recrutement du facteur Polycomb au niveau des séquences PRE afin de moduler le silençage épigénétique des gènes dont la transcription est normalement réprimée par Polycomb (Dutta and Li, 2017). Il est d'ailleurs intéressant de noter ici que l'allèle de *tara* supprime l'activité de NA9. Nous pourrions alors envisager que le complexe Trithorax soit recruté au niveau des répétitions FG/GLFG de NA9 par l'intermédiaire de MLL1 permettant ainsi l'interaction des autres sous-unités du complexe avec NA9.

#### 4.2.1.3.1 Le rôle d'Enhancer of Polycomb, E(Pc)

Finalement, le facteur de remodelage de la chromatine E(Pc) a été identifié comme l'un des modulateurs négatifs les plus forts à la fois dans l'œil et dans le système hématopoïétique de la mouche (Cf. **figure 3.5 et 3.7**). Conservé de la levure (Epl1) à l'humain (EPC1/2), E(Pc) est un membre du complexe Polycomb (PcG) (Stankunas et al., 1998). Chez la levure, Epl1 est un membre du complexe d'histone acétyltransférase NuA4, qui est impliqué dans la stimulation de la transcription à travers l'acétylation des histone H4 et H2A (Boudreault et al., 2003; Doyon and Cote, 2004; Galarneau et al., 2000). Une étude publiée en 2009 a également démontré l'implication d'*EPCI* dans la translocation der(10)t(2;10)(p23;p11.2) avec le gène *ASXL2* dans des leucémies des cellules T chez l'adulte. Cette translocation, qui conduit à l'expression d'une protéine de fusion EPC1-ASXL2, accélère la prolifération cellulaire (Nakahata et al., 2009). Par ailleurs, la forme tronquée d'E(Pc), impliquée dans cette fusion favorise également la prolifération de cellules leucémiques (Nakahata et al., 2009). De façon intéressante, lorsque nous avons testé l'effet des allèles d'*E(Pc)* sur la capacité de NA9 à induire une expansion de la GL, nous avons noté que les allèles hétérozygotes d'*E(Pc)*, seuls, induisaient une expansion significative de la GL suggérant un rôle au cours de l'hématopoïèse. De plus, les mutations que nous avons identifiées consistent en deux codons stop dans la région riche en polyQ située en N-terminale (Cf. **figure 3.4**) laissant présager la formation d'une protéine tronquée qui serait responsable du phénotype observé.



#### 4.2.1.3.2 Comment E(Pc) contribue à l'activité oncogénique de NA9?

Les deux homologues humains, EPC1 et EPC2, ont été rapportés comme étant des cofacteurs oncogéniques dans des LMA associées à des réarrangements du gène *MLL* (Huang et al., 2014). Il semblerait qu'EPC1 et EPC2 soient requis pour prévenir l'accumulation de MYC et l'apoptose des cellules souches leucémiques, soutenant ainsi leur potentiel oncogénique (Huang et al., 2014). Les résultats de nos travaux combinés aux implications d'EPC1 en tant que cofacteur dans les LMA, nous ont amené à poser l'hypothèse qu'E(Pc) agissait potentiellement comme cofacteur de NA9 dans le développement de la LMA et similairement à l'effet induit par le cofacteur MEIS1, il réduirait significativement la latence de développement des LMA dans les modèles de souris exprimant NA9. Dans des travaux non publiés, nous avons réalisé une expérience de transplantation similaire à celle décrite par Kroon *et al.*, qui démontre la collaboration de MEIS1 avec NA9 dans le développement de la LMA (Kroon et al., 2001). Pour ce faire, nous avons transplanté des souris receveuses avec des progéniteurs hématopoïétiques exprimant par transduction virale NA9 associée ou non avec la forme sauvage d'EPC1 ou une forme tronquée d'EPC1 (équivalente à celles de nos allèles) (Cf. figure 4.1).

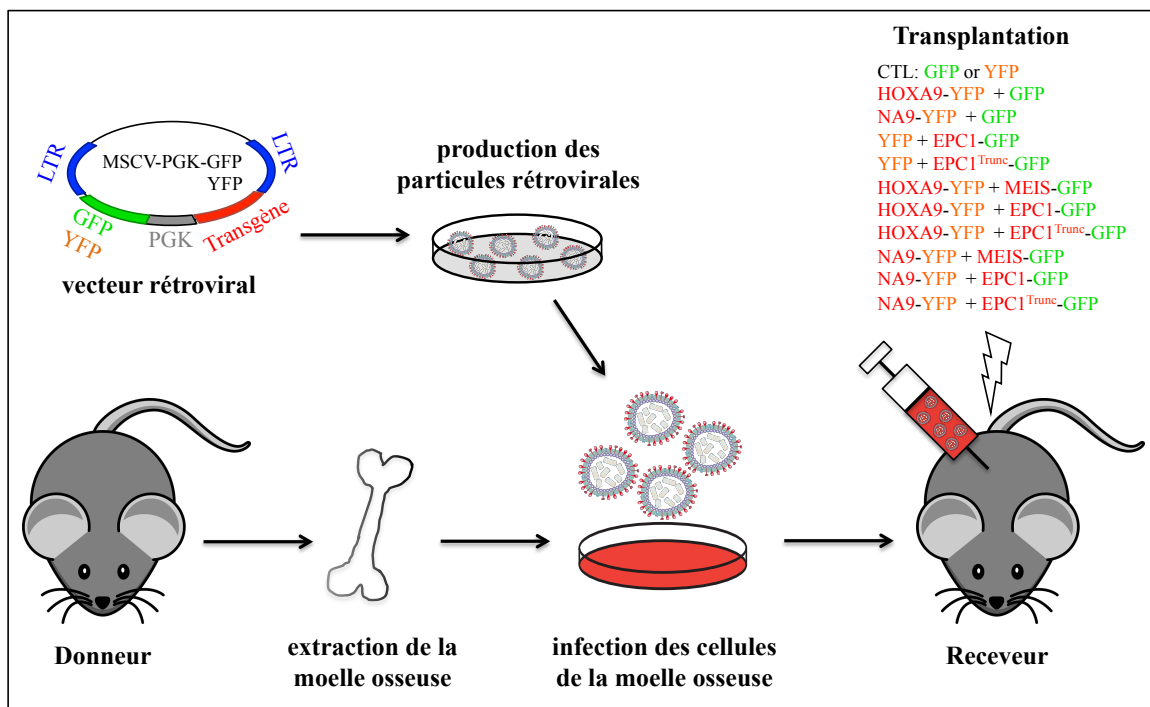
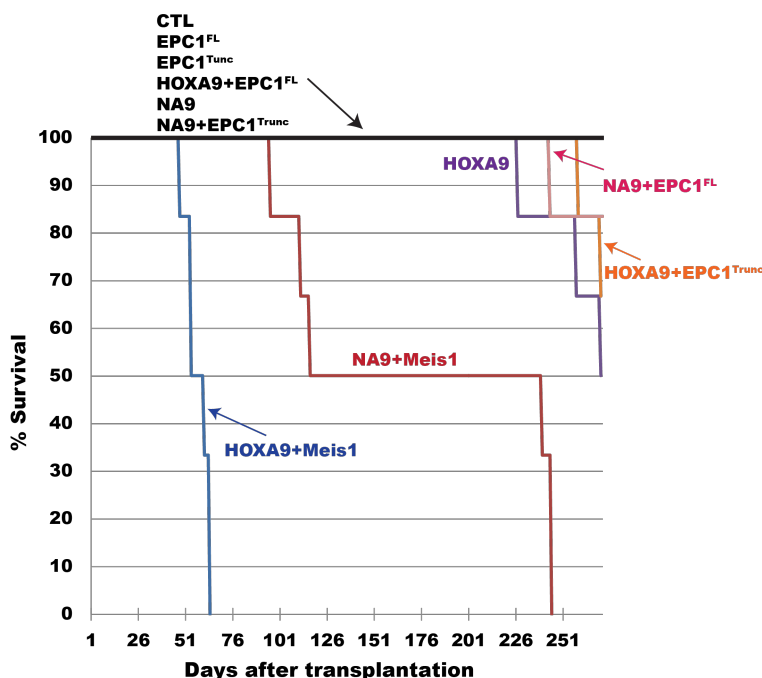


Figure 4.1. Représentation schématique de la procédure de transplantation

La moelle osseuse de souris donneuse est extraite des fémurs, tibias et pelvis puis les progéniteurs  $\text{Lin}^-$  sont isolés. Au préalable, les cellules d'encapsulation écotropiques GP+E-86 sont infectées avec les particules rétrovirales amphotropiques produites par les cellules VSV-G suite à leur co-transfection avec les vecteurs gag-pol, env et les différents vecteurs rétroviraux MSCV-pGK-GFP ou YFP. Les progéniteurs extraits de la moelle osseuse sont alors infectés par co-culture avec les cellules GP+E-86 puis finalement collectés et injectés dans des souris receveuse irradiée. Six souris ont été transplantées pour chacune des combinaisons indiquées.



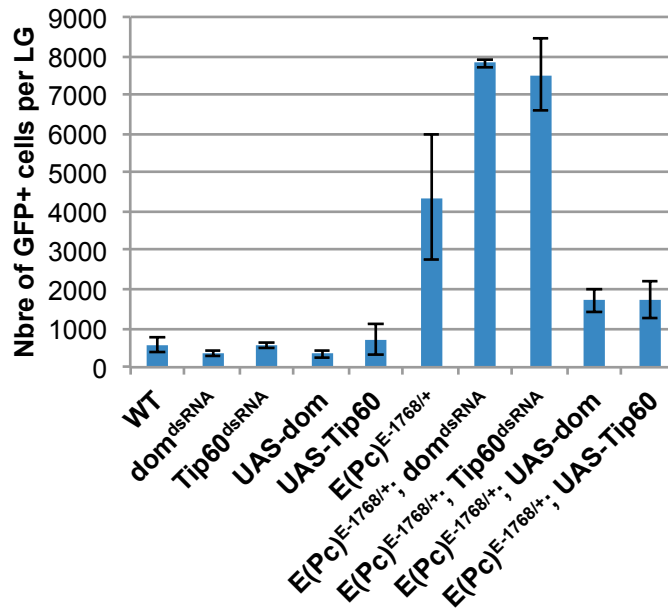
**Figure 4.2. Courbe de survie post-transplantation**

Les souris exprimant HOXA9-MEIS1 et NA9-MEIS1 ont succombé à la suite de LMA dans les temps préalablement publiés (Kroon *et al.*, 2001). La souris NA9-EPC1 et les deux souris HOXA9-EPC1<sup>Trunc</sup> qui sont mortes entre 250 et 270 jours post-transplantation présentaient une expansion de la rate, et les signes d'un syndrome myéloprolifératif. Les souris ont toutes été sacrifiées un an après la transplantation sans aucuns signes apparents de syndrome myéloprolifératif.

Les résultats de cette expérience nous ont conduit à conclure qu'EPC1 sous sa forme sauvage ou tronquée n'agissait pas comme un cofacteur de NA9 dans le développement de la leucémie au même titre que MEIS1. En effet, aucune souris exprimant NA9 en présence de la forme sauvage ou tronquée d'EPC1 n'a succombé au développement d'une LMA au cours des 365 jours post-transplantation, alors que les souris exprimant à la fois NA9 et MEIS1 meurent en moyenne autour de 170 jours suivant la transplantation (Cf. **figure 4.2**). Néanmoins, il nous

est difficile d'affirmer qu'EPC1 n'a aucun effet collaboratif en présence de NA9 dans le développement de la LMA puisque les souris sacrifiées à la toute fin de l'expérience n'exprimaient plus que très peu et même, pour la majorité d'entre elles, plus du tout les différentes constructions. Ceci explique probablement pourquoi seulement la moitié des souris exprimant HOXA9 a succombé d'une leucémie après un temps de latence plus élevé que ceux rapportés dans la littérature (230 jours versus 130 jours) et qu'aucune des souris exprimant NA9 n'est tombée malade au cours de ces 365 jours suivant la transplantation (Kroon et al., 1998; Kroon et al., 2001). Ces résultats soulèvent également la question suivante : la présence d'EPC2 vient-elle contrecarrer l'effet collaboratif que nous pensions observer entre EPC1 et NA9? Bien que nous n'ayons pas de réponses à cette question, nous pouvons toutefois affirmer qu'EPC1 ne collabore pas de façon aussi drastique que MEIS1 avec NA9 dans le développement de la LMA chez la souris.

Néanmoins, la caractérisation plus approfondie du phénotype induit par les allèles hétérozygotes d'E(Pc) a mené à l'identification du complexe de remodelage de la chromatine NuA4/Tip60 comme étant requis pour l'activité d'E(Pc) dans la GL (Cf. **figure 4.3**). Par ailleurs, Fisher *et al.* ont montré chez le nématode *C. elegans* que les complexes MLL et NuA4/Tip60 coopèrent pour réguler la transcription de gènes impliqués dans l'atténuation de la voie de signalisation Ras (Fisher et al., 2010). Nous pourrions alors imaginer qu'E(Pc) soit recruté par l'intermédiaire du complexe NuA4/Tip60 et du complexe MLL au niveau des répétitions FG/GLFG de NA9 afin de contribuer à la modulation transcriptionnelle et épigénétique induite par NA9.



**Figure 4.3. Le complexe NuA4/Tip60 est requis pour l'activité d'E(Pc) dans la GL.**

Quantification par FACS du nombre de cellules GFP+ par GL pour les génotypes mentionnés.

#### 4.2.1.4 Nouvelles fonctions de NA9 indépendantes de son activité transcriptionnelle

Parmi les 13 gènes identifiés comme modulateur de l'activité de NA9, certains d'entre eux encodent des protéines impliquées dans des processus biologiques telles que la polarité cellulaire et la traduction. Des processus, qui jusqu'à maintenant, n'avaient pas encore été identifiés comme contribuant à l'activité de NA9.

##### 4.2.1.4.1 La traduction

En effet, l'identification des facteurs eIF3b et eIF3i, deux sous-unités du complexe d'initiation de la traduction eIF3, et l'asparagine synthétase AsnRS suggère que NA9 pourrait également moduler directement la synthèse de protéines. D'ailleurs, Shestakova *et al.*, ont montré très récemment, suite à une expérience de purification TAP (« Tandem Affinity Purification ») combinée à l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), que

l'oncoprotéine HOXA9 était associée à différentes sous-unités du complexe d'initiation de la traduction eIF3 (Shestakova et al., 2017). Ces résultats supportent un rôle potentiel de NA9 dans l'activité traductionnelle.

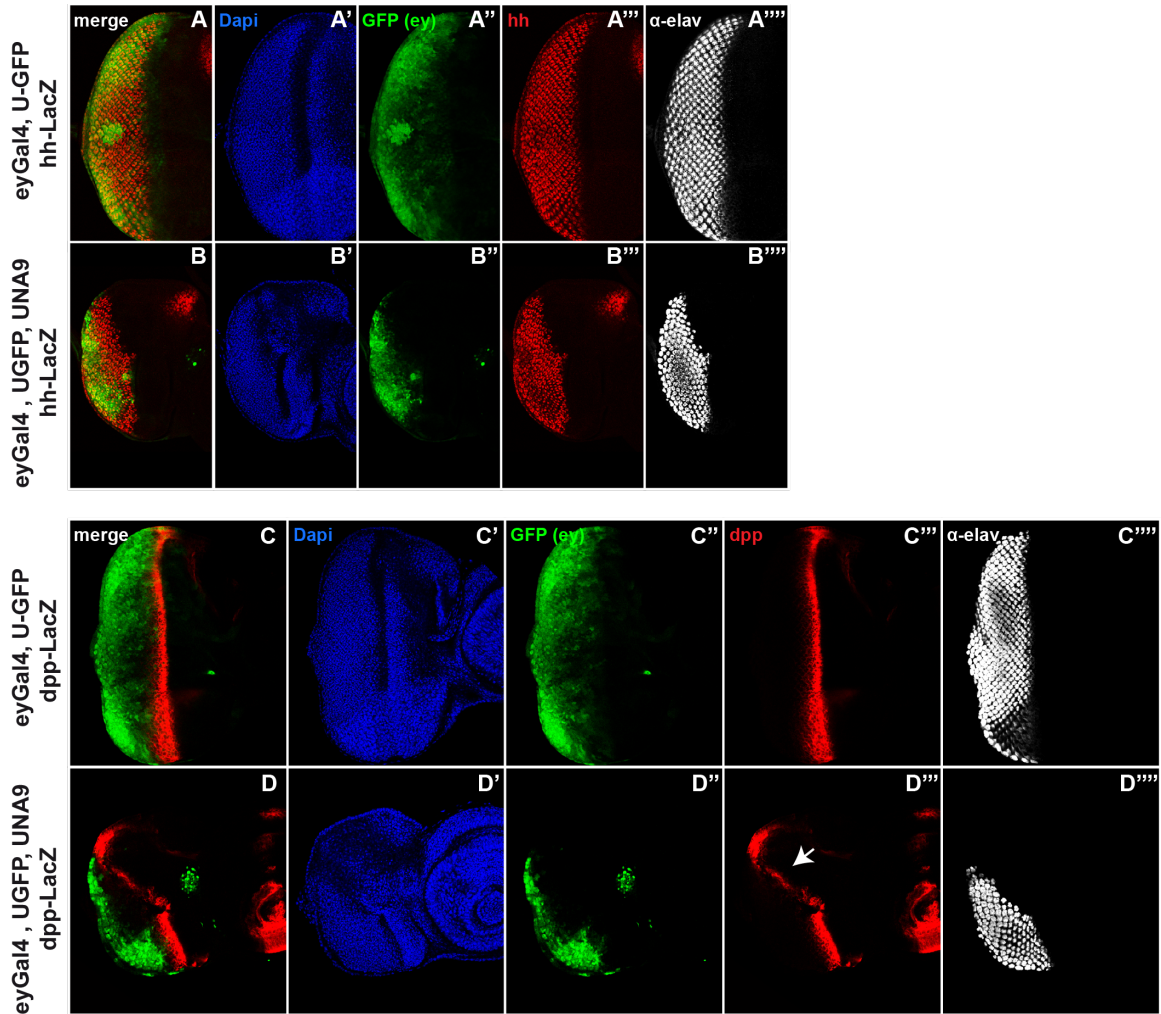
#### **4.2.1.4.2 La polarité cellulaire**

Par ailleurs, plusieurs facteurs impliqués dans l'adhésion et la polarité cellulaire ont également été identifiés. Parmi eux, les protéines Grh/ GRHL1, Stan/ CELSR2 et Ed/ KIRREL2 qui sont des membres de la voie Wnt/Wg non canonique impliquée dans la polarité cellulaire planaire. La voie non canonique Wnt/Wg a, en outre, été rapportée comme jouant un rôle dans le maintien des CSH au niveau de la niche (Sugimura et al., 2012). Ou encore, la protéine l(2)gl (« lethal giant larvae »)/LLGL1, membre du complexe de polarité Scribble, également impliqué dans l'hématopoïèse. En effet, dans les cellules hématopoïétiques, l'inactivation de *Lgl1* induit l'expansion des cellules souches et augmente leur capacité d'auto-renouvellement mais ne confère aucune capacité de transformation maligne (Heidel et al., 2013). Bien que la diminution de l'expression de *Lgl1* dans des échantillons de LMA primaires corrèle avec la diminution des chances de survie (Heidel et al., 2013), il semblerait que *Lgl1* ait plutôt un rôle de cofacteur dans le développement de la leucémie qui en présence de NA9 pourrait contribuer à son activité.

### **4.2.2 NA9 et les morphogènes Wingless (Wg) et Decapentaplegic (Dpp)**

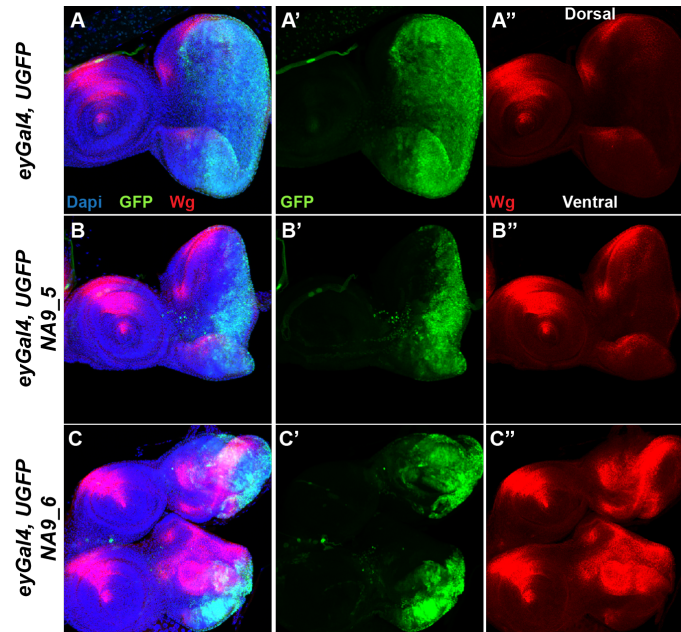
Comme mentionné dans l'introduction, l'œil adulte de la mouche se développe à partir du disque imaginal œil-antenne, un épithélium de cellules formé au cours des stades larvaires dont la morphogénèse commence au troisième stade (Halder et al., 1995) (Cf **figure 1.18**). Afin de caractériser de manière plus approfondie le phénotype induit par NA9, nous avons analysé des disques imaginaires au stade larvaire L3. Dans un premier temps, nous avons regardé le morphogène Hedgehog (Kocks et al., 2005), un facteur clé dans le processus d'établissement et de migration du sillon morphogénétique (SM), qui est sécrété par les

neurones en différenciation dans la zone postérieure au SM (Heberlein et al., 1993; Ma et al., 1993). Une fois initié, le SM progresse suivant une séquence d'évènements répétés qui est contrôlé par une boucle de rétroaction positive. En effet, le signal Hh reçu par les cellules dans le SM et en aval de ce dernier, induit leur différenciation en photorécepteurs et alors qu'ils se différencient, ces derniers vont eux-mêmes commencer à exprimer *hh*, induisant à leur tour la différenciation des cellules plus antérieures (Dominguez and Hafen, 1997; Heberlein et al., 1995; Heberlein et al., 1993; Ma et al., 1993). Il semblerait que NA9 n'affecte pas l'expression de *hh* dans les neurones différenciés qui sont identifiés par le marqueur neuronal Elav (Cf. **figure 4.4 A-B** *hh* en rouge et Elav en blanc). Cependant, les disques imaginaux œil-antenne exprimant NA9 sont plus petits et présentent un délai au niveau de la progression du SM. Ce qui nous a conduit à examiner le facteur Dpp, qui est impliqué dans la progression du SM et dont l'expression est induite par Hh dans une rangée de cellules non différenciées du SM (Heberlein et al., 1993; Masucci et al., 1990). Il apparaît que les disques NA9 présentent à la fois une atténuation du signal *dpp* et un retard dans la progression du SM dans la partie dorsale du disque (Cf. **figure 4.4 C-D**). Or Dpp est connu pour inhiber l'expression du morphogène Wg, ce qui nous a finalement amené à examiner les niveaux d'expression de la protéine Wg (Theisen et al., 1996). Ils se sont avérés fortement augmentés en présence de NA9 et ce, de façon dose-dépendante (Cf. **figure 4.5**). En temps normal, Wg est exprimé au niveau des marges du disque imaginaire de l'œil où il promeut la formation de la cuticule de la tête au détriment de la formation de la rétine dans ces zones (Legent and Treisman, 2008). Cette dernière observation pourrait expliquer l'indentation observée dans la partie dorsale de l'œil adulte.



**Figure 4.4. NA9 atténue l'expression de *dpp* dans la partie dorsale du disque imaginal de l'œil.**

(A-D''') Coloration immunofluorescente de disques imaginaux œil-antenne au troisième stade larvaire pour révéler l'expression de *hedgehog* (*hh*) (A-B''') et *decapentaplegic* (*dpp*) (C-D'''). Les génotypes sont : (A-A''') *ey-Gal4/ wg-LacZ ; UAS-GFP*, (B-B''') *ey-Gal4, UAS-NA9/ wg-LacZ ; UAS-GFP*, (C-C''') *ey-Gal4/ dpp-LacZ ; UAS-GFP*, (D-D''') *ey-Gal4, UAS-NA9/ dpp-LacZ ; UAS-GFP*. (A-D) Signal GFP (*ey*) (A''-D'') et immunocoloration anti- $\beta$ -Gal (en rouge) (A'''-D'''), (A'-D') Coloration au DAPI (en bleu), Immunocoloration anti-elav (en blanc, photorécepteurs). La partie postérieure du disque est à gauche et dorsale vers le haut. Données générées par Gino Laberge.



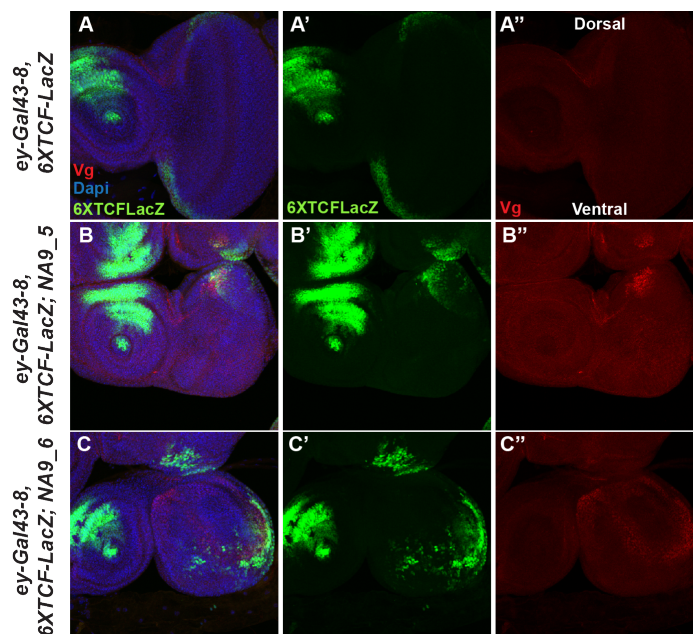
**Figure 4.5. NA9 induit l'expression de Wg de façon dose-dépendante.**

(A-C'') Coloration immunofluorescente de disques imaginaux œil-antenne au troisième stade larvaire pour les génotypes suivants : (A-A'') *ey-Gal4; UAS-GFP*, (B-B'') *ey-Gal4, UAS-NA9\_5; UAS-GFP*, (C-C'') *ey-Gal4; UAS-GFP/ UAS-NA9\_6*. (A-C) Coloration au DAPI (en bleu), expression de la GFP (*ey*) (A'-C') et immunocoloration avec l'anticorps anti-Wg (en rouge) (A''-C''). La lignée NA9\_6 exprime plus fortement le transgène NA9 que la lignée NA9\_5. La partie postérieure du disque est à droite et dorsale vers le haut.

Ces résultats non publiés montrent que NA9 affecte l'expression des facteurs antagonistes Dpp et Wg dans le disque imaginal œil-antenne apparemment de façon non cellule autonome puisque les cellules GFP positives qui expriment NA9 ne sont ni positives pour Dpp, ni pour Wg dans le disque au troisième stade larvaire. Ces résultats demeurent préliminaires et nécessitent d'être reproduits. De plus, il serait important de vérifier l'implication des voies de signalisation Wg/Wnt et Dpp/BMP dans le phénotype NA9 observé. Dans un premier temps, nous avons confirmé que l'augmentation d'expression de Wg est corrélée avec une activité accrue de la voie de signalisation Wg/Wnt avec la lignée rapporteuse 6XTCF-LacZ (Chang et al., 2008) (Cf. **figure 4.6**). Nous pourrions également monitorer les niveaux d'expression de l'effecteur transcriptionnel Armadillo ( $\beta$ -caténine). De même, nous pourrions évaluer l'activité de la voie Dpp/BMP avec la lignée rapporteuse Dad-lacZ (Firth et al., 2010) ou encore en mesurant les niveaux de phosphorylation de l'effecteur Mad. Enfin, par la suite, nous pourrions examiner l'effet de mutations dans différents



composants de ces deux voies de signalisation tels que les récepteurs Frizzled (Fz) et Thickvein (Tkv) ou encore les effecteurs Armadillo et Mad sur le phénotype NA9 dans l'œil.



**Figure 4.6. NA9 induit l'activation de la voie Wg et l'expression de Vestigial.**

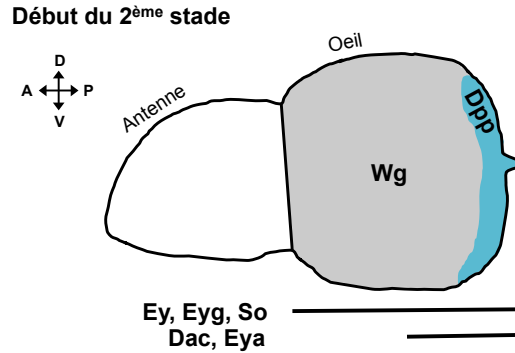
(A-C'') Coloration immunofluorescente de disques imaginaux œil-antenne au troisième stade larvaire pour les génotypes suivants : (A-A'') *ey-Gal4; 6XTCF-LacZ*, (B-B'') *ey-Gal4; UAS-NA9\_5; 6XTCF-LacZ*, (C-C'') *ey-Gal4; 6XTCF-LacZ/ UAS-NA9\_6*. (A-C) Coloration au DAPI (en bleu), *6XTCF-LacZ* (en vert) (A'-C') et immunocoloration avec l'anticorps anti-Vg (en rouge) (A''-C''). La lignée NA9\_6 exprime plus fortement le transgène NA9 que la lignée NA9\_5. La partie postérieure du disque est à droite et dorsale vers le haut.

Dans la GL, nous pourrions également envisager que le transgène NA9 affecte de façon non autonome l'expression de Wg dans les hémocytes du PSC. Ceci pourrait alors expliquer l'expansion de ce dernier, puisque la surexpression de Wg dans le PSC avec le promoteur *Antp-Gal4* conduit à l'augmentation de sa taille (Sinenko et al., 2009). À l'inverse, l'activité de la voie de signalisation Dpp/BMP limite la prolifération cellulaire du PSC en réprimant le proto-oncogène *dmyc* (Pennetier et al., 2012). Pour conclure sur ce bref aparté dans la GL, il semblerait que dans le PSC, les voies Dpp et Wg s'opposent mutuellement dans le contrôle de sa taille en régulant l'expression de *dmyc* de façon opposée (Pennetier et al., 2012). Il serait donc intéressant d'examiner les niveaux d'expression de dMyc, que nous nous

attendrions à voir augmentés suite à l'expression de NA9, à la fois dans la GL et dans les disques imaginaux de l'œil.

#### **4.2.2.1 Comment NA9 affecte les niveaux de Wg ou Dpp?**

La construction *ey-Gal4* est exprimée dans toute la zone dédiée à la formation de l'œil dans le disque imaginal œil-antenne au second stade larvaire. Similairement, Wg est exprimé partout dans le primordium de l'œil très tôt au second stade larvaire (Royet and Finkelstein, 1997). Par ailleurs, Dpp est présent au niveau des marges latérales dans la région postérieure du disque tôt au cours du troisième stade larvaire avant d'être par la suite restreint au SM (Blackman et al., 1991). Il semblerait donc que les cellules qui expriment le transgène NA9 au cours du troisième stade larvaire aient exprimé par le passé, les facteurs Wg et Dpp. Ceci suggère fortement que les défauts observés au troisième stade larvaire sont en fait le résultat de l'impact de NA9 au cours des stades plus précoces. En effet, une expérience de marquage de lignage appelée *Gal4 Technique for Real-time and Clonal Expression (G-TRACE)* (Evans et al., 2009) a permis de confirmer que les cellules présentant des défauts d'expression de Wg et Dpp ont déjà exprimé NA9 (données non présentées). De plus, les deux voies de signalisation Wg et Dpp sont également connues pour leur rôle antagoniste au cours du développement larvaire de l'œil. L'oncogène NA9 pourrait donc influencer directement qu'une seule d'entre elles (Dominguez and Hafen, 1997; Treisman and Rubin, 1995). Plusieurs hypothèses sont alors envisageables quant au rôle de NA9 dans la régulation de l'expression de Wg et Dpp.



**Figure 4.7. Patterns d'expression des morphogènes Wg et Dpp dans le disque imaginal œil-antenne au début du deuxième stade larvaire.**

Wg est exprimé partout dans le primordium de l'œil (en gris) alors que l'expression de Dpp est restreinte dans la partie postérieure (en bleu). Les traits horizontaux représentent les domaines d'expression des facteurs rétiniens mentionnés. A : antérieur, P : postérieur, D : dorsal, V : ventral.

#### 4.2.2.1.1 La régulation de Wg

La protéine Wg est exprimée partout à travers le disque de l'œil au second stade larvaire pour être finalement restreinte au niveau des marges latérales antérieures au troisième stade larvaire, les régions qui deviendront la partie dorsale de la tête (Baker, 1988; Legent and Treisman, 2008; Royet and Finkelstein, 1997) (Cf **figure 1.18**). A partir du second stade larvaire, l'expression dorsale de *wg* est dépendante du facteur de transcription de type GATA Pannier (*Pnr*) dont les transcrits sont présents dans la région dorsale du disque à partir du stade embryonnaire (Heitzler et al., 1996; Maurel-Zaffran and Treisman, 2000). En effet, Pereira *et al.* ont montré que le facteur *Pnr* active un amplificateur spécifique de l'œil dans la région cis-régulatrice en 3' du gène *wg* (Pereira et al., 2006). Une des premières hypothèses serait donc que NA9 affecte soit directement l'expression du facteur *Pnr*, soit indirectement en agissant en amont sur les facteurs qui contrôlent l'expression de ce dernier, facteurs qui sont encore inconnus à ce jour.

Avant l'initiation du SM, au cours du deuxième stade larvaire, l'expression de Wg est normalement inhibée au niveau de la marge postérieure du disque par les voies JAK/STAT et Dpp (Chanut and Heberlein, 1997; Dominguez and Hafen, 1997; Tsai et al., 2007) (Cf. **figure 1.18A**). Par exemple, Ekas *et al.* rapportent un phénotype apparenté au nôtre suite à

l'induction de clones mutants de Stat92E, l'effecteur de la voie JAK/STAT. En effet, ils montrent que la perte de la signalisation JAK/STAT induit l'activation ectopique du gène *wg*, ce qui entraîne la formation de cuticule ectopique au détriment du développement normal de l'œil (Ekas et al., 2006). Ainsi, il se pourrait que NA9 affecte l'activité de la voie JAK/STAT en réduisant les niveaux du ligand Unpaired (Upd) exprimé dans la région postérieure ou bien encore en réprimant l'activité de Stat92E pour finalement conduire à une élévation des niveaux de Wg.

Au troisième stade larvaire, l'expression de *wg*, qui est alors restreinte au niveau des marges latérales antérieures, réprime l'expression des facteurs clés dans l'établissement de l'œil : Eya, So et Dac (Fukuda et al., 1997) qui, en retour, répriment l'expression de *wg* au niveau des marges postérieures du disque (Baonza and Freeman, 2002; Legent and Treisman, 2008) (**Cf. figure 1.18B**). Le facteur de transcription Eyeless (Eye) situé au sommet de la hiérarchie des facteurs déterminants dans la formation de la rétine, est le premier exprimé et induit au cours du second stade larvaire l'expression du facteur de transcription So et son cofacteur Eya, qui à leur tour, induisent l'expression de *dac*, au niveau des marges postérieures (Chen et al., 1997; Halder et al., 1995). Suite à l'initiation du SM, Eya et So sont exprimés à la fois dans le sillon et dans la région postérieure (Bonini et al., 1993; Cheyette et al., 1994). So maintient sa propre expression ainsi que celle d'Eya, Dac et Ey (Jin et al., 2016; Pignoni et al., 1997). Une seconde hypothèse serait alors que NA9 affecte l'expression des facteurs déterminants So et/ou Eya dans la région postérieure du disque conduisant à une dérégulation de *wg*.

#### 4.2.2.1.2 La régulation de Dpp

Différents groupes ont montré que la perte de la voie de signalisation Dpp/BMP conduisait à l'activation ectopique de *wg* (Chanut and Heberlein, 1997; Wiersdorff et al., 1996). Nous pourrions envisager que l'activité de NA9 interfère directement avec la régulation de l'expression du facteur de croissance de la famille TGF- $\beta$ , Dpp. Il a été montré au cours du deuxième stade larvaire, précédent l'initiation du SM, que Hh induit l'expression de Dpp le long de la marge postérieure alors que les gènes *eya* et *eygone* (*eyg*) sont requis pour

l'activation de *dpp* au niveau des marges postérieures et latérales du disque (Blackman et al., 1991; Hazelett et al., 1998; Heberlein et al., 1993; Ma et al., 1993; Royet and Finkelstein, 1997)). Il semblerait que les facteurs Eya et So soient requis pour l'initiation de *hh* mais également pour le maintien de l'expression de *dpp* (Hazelett et al., 1998; Pignoni et al., 1997). À travers une boucle de rétroaction positive, Dpp contrôle également sa propre expression (Pignoni and Zipursky, 1997). Il semblerait que le transgène NA9 n'interfère pas avec l'expression de Hh d'après nos résultats mais pourrait interférer avec les facteurs Eya, So ou Eyg.

#### 4.2.2.1.3 NA9 et la transdétermination

Il semblerait qu'au vu de l'ensemble de nos résultats, l'hypothèse la plus probable serait la modulation de l'expression de *wg*. NA9 induirait une élévation des niveaux de Wg dans la partie dorsale du disque de l'œil, conduisant à la fois à l'arrêt de la progression du SM et à une diminution des niveaux de Dpp dans cette région. En effet, il a été montré que l'expression ectopique de *wg* réprimait *eya*, *so* et *dac* induisant ainsi une perte de la formation de la rétine mais l'excès de *wg* est également à l'origine de la transformation du tissu de l'œil non seulement en cuticule de la tête mais encore en une variété de structures telles que des ailes ou des pattes au cours d'un phénomène que l'on nomme la transdétermination (Baonza and Freeman, 2002; Johnston and Schubiger, 1996; Maves and Schubiger, 1998). Un phénomène que nous avons observé suite à l'expression de NA9 dans l'œil. En effet, nous avons montré que l'expression de NA9 induisait la transformation d'une partie de l'œil en tissu de l'aile (Cf. **figure 3.5**) accompagnée d'une induction de *vg* (Cf. **figure 4.6**) et d'une dépression du locus HOX *Antp*. Et ce phénomène est exacerbé suite à la déplétion des sous-unités E(Pc), Tip60 et Domino du complexe HAT NuA4/Tip60.

Il a été montré par le passé que ce phénomène de transdétermination peut être induit : (i) suite à l'expression ectopique d'*Antp* en présence de Notch activé (Kurata et al., 2000; Prince et al., 2008); (ii) ou en réponse à une activité accrue de Wg (Baonza and Freeman, 2002). Ces résultats suggèrent que NA9 interfère probablement à la fois avec les voies Notch et Wnt/Wg. Alors que le rôle potentiel de NA9 sur l'activité de la voie Notch reste à être démontré, son impact sur l'activation de la voie canonique Wnt/Wg a été confirmé. Des

données non présentées dans cet ouvrage, viennent également corroborer l'implication de la voie canonique Wnt/Wg dans le phénotype de collaboration observé entre NA9 et Hth puisque celui-ci est complètement supprimé suite à la déplétion par ARNi du coactivateur transcriptionnel Armadillo/ $\beta$ -caténine ou du facteur de transcription Pangolin/TCF. À la lumière de l'ensemble de ces résultats, il semblerait que l'expression de NA9 affecte la voie de signalisation Wnt/Wg en plus d'induire à la fois l'expression ectopique de *vg* et la réactivation du gène HOX *Antp*, probablement accompagnée d'une activation de la voie Notch.

#### **4.2.2.2 Un lien entre Wg et les gènes identifiés dans le crible?**

##### **4.2.2.2.1 La voie non canonique Wnt/Wg**

Au sein de la cascade de signalisation Wnt, on distingue généralement la voie canonique Wnt/Wg aussi connue sous le nom Wnt/ $\beta$ -caténine en raison de sa dépendance à la  $\beta$ -caténine, des voies non canoniques, qui elles, sont indépendantes de la  $\beta$ -caténine, soit la voie Wnt/ $Ca^{2+}$  ou encore la voie de la polarité cellulaire planaire Wnt/PCP (Habas and Dawid, 2005). Brièvement, l'activation de la voie canonique par les ligands Wnt induit l'inactivation du complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine, qui en absence de ligands induit sa dégradation. La liaison des ligands Wnt aux récepteurs Fz et LRP-5/6 induit alors l'accumulation de la  $\beta$ -caténine et sa translocation dans le noyau où elle lie et active les facteurs de transcription de type TCF/LEF (Malhotra and Kincade, 2009). La voie non canonique Wnt/PCP, quant à elle, est également initiée par la liaison des ligands Wnt aux récepteurs Fz et co-récepteurs spécifiques du PCP (Yang and Mlodzik, 2015).

Il semblerait, dans notre cas, que la voie de signalisation Wnt/Wg joue un rôle essentiel dans l'activité de NA9. Cependant, parmi les 16 gènes identifiés dans le crible génétique, aucun ne correspond à des facteurs clés de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine. Toutefois, nous avons identifiés les gènes : *grh/ GRHL1*, *fmi/ CELSR2*, *ed/ KIRREL2* et *l(2)gl/ LLGL1* encodant des facteurs impliqués dans la voie non canonique Wnt/PCP ou en aval de celle-ci (Dollar et al., 2005; Goodrich, 2008; Ho et al., 2010; Kaplan and Tolwinski, 2010; Lee and Adler, 2004). De plus, parmi les 29 loci identifiés comme modulateur de l'activité de NA9, il

en reste 13 dont les gènes n'ont pas encore été identifiés et qui pourraient encoder des composants de la voie Wnt/Wg. Ces résultats supportent l'importance de la voie Wnt/Wg dans l'activité de NA9.

#### 4.2.2.2.2 La voie Wnt/Wg et les facteurs de remodelage de la chromatine

Les données présentées dans le deuxième manuscrit associé montrent que l'activité de NA9 dans la reprogrammation épigénétique des cellules est antagonisée par des facteurs épigénétiques tels que le complexe de remodelage de la chromatine NuA4/Tip60. Or, dans le crible, nous avons identifié deux autres gènes encodants des facteurs épigénétiques soit *taranis/SERTAD2* et *grappa/DOT1L*, confirmant le rôle important de la structure de la chromatine dans l'activité oncogénique de NA9.

#### *grappa/DOT1L*

Le gène *grappa* encode une méthyl-transférase qui catalyse l'ajout de groupements méthyl au niveau de la lysine 79 (K79) de l'histone H3 (Shanower et al., 2005). Les allèles que nous avons identifiés ainsi que la déplétion de *grappa* exacerbent le phénotype induit par NA9 dans l'œil de la mouche (Cf. **figure 3.5 et table 3.1**). Il semblerait que Grappa/DOT1L joue un rôle dans la voie de signalisation Wnt. En effet, un complexe multi-protéique DotCom qui contient DOT1L associée avec plusieurs partenaires de fusion de MLL et des composants de la voie Wnt : Skp1, TRRAP, et  $\beta$ -caténine impliqué dans la méthylation H3K79 a été identifié dans des cellules HEK293 (Mohan et al., 2010). Par la suite, Mohan *et al.* ont montré que la déplétion de *grappa* chez la drosophile diminue les niveaux d'expression d'un ensemble de gènes cibles de la voie Wnt (Mohan et al., 2010). Mahmoudi *et al.* ont montré que dans des cellules cryptiques intestinales de souris et des cellules de carcinomes colorectaux humaines, DOT1L et son partenaire AF10 s'associent pour former un complexe avec le facteur de transcription Tcf4, un effecteur clé de la voie Wnt canonique (Mahmoudi et al., 2010). Des études fonctionnelles montrent également, que  $\beta$ -caténine recrute ce complexe au niveau des séquences régulatrices de gènes cibles de la voie Wnt pour permettre la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 79. AF10 et DOT1L ont été identifiés comme des co-

activateurs requis pour la transcription des gènes cibles de la voie Wnt (Mahmoudi et al., 2010). Dans un modèle de chondrogenèse chez la souris, il a également été montré que la déplétion de DOT1L réprime l'expression des gènes *Tcf1*, *Axin2*, *c-Myc*, positivement régulés par la voie Wnt et induit l'expression du gène *Osteocalcin* normalement réprimé par la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Castano Betancourt et al., 2012). Enfin, Monteagudo *et al.* montrent qu'à travers l'inhibition de l'activité de la sirtuine 1, un régulateur important de la transcription, DOT1L supprime l'activité de la voie de signalisation Wnt/Wg dans les chondrocytes afin de préserver l'homéostasie du cartilage (Monteagudo et al., 2017). Ces études confirment que DOT1L est impliquée dans l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Cependant, selon les modèles d'étude, les résultats sont contradictoires quant au rôle que joue DOT1L dans la signalisation Wnt, de plus, il semblerait que la méthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 79 induite par DOT1L ne soit pas essentielle pour l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de la voie Wnt canonique dans les cellules épithéliales de l'intestin ou dans des cellules HEK293 (Gibbons et al., 2015; Ho et al., 2013). Ainsi, la contribution de DOT1L à l'activité de la voie Wnt/Wg serait indépendante de son activité enzymatique.

### ***taranis/SERTAD2***

Tara est un membre du groupe trxG initialement identifié dans un crible génétique à la recherche de mutations dominantes qui modulent le phénotype homéotique induit par l'expression ectopique d'un gène homéotique (Calgaro et al., 2002). Il semble que Tara joue un rôle dans le « silençage » génétique médié par le groupe PcG. Il contribue au recrutement de Pc au niveau des séquences spécifiques PREs (« PcG recognition element ») et ainsi module l'expression de gènes régulés par le groupe PcG au cours du développement chez la drosophile (Dutta and Li, 2017). Or, il semble que le groupe PcG module l'activité de la voie Wnt et dMyc, deux de ces cibles. Les protéines du groupe PcG sont principalement regroupées en trois sous-complexes : le complexe PRC1, PRC2 et PhoRC (Schuettengruber and Cavalli, 2009). Chen *et al.* ont montré que le complexe PRC1, qui contient entre autre Pc, favorise le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques de souris à travers la répression de la voie de signalisation Wnt canonique (Chen et al., 2015). Par ailleurs, Goodlife *et al.* ont montré que Pc est impliqué dans l'auto-répression de *dmyc* et dans la régulation de son activité



transcriptionnelle chez la drosophile (Goodliffe et al., 2005). Alors que Chiacchiera *et al.* montrent que le complexe PRC1 est requis pour l'homéostasie intestinale en réprimant l'expression de facteurs de transcription qui inhibent l'activité transcriptionnelle du complexe  $\beta$ -caténine/TCF/LEF dans les cellules intestinales. Ils montrent ainsi que PRC1 préserve l'intégrité des cellules souches intestinales en soutenant l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Chiacchiera et al., 2016). Les résultats d'une seconde étude viennent corroborer le rôle du groupe PcG dans le maintien de l'homéostasie intestinale à travers l'activation de la voie Wnt. En effet, Oittinen *et al.* montrent que PRC2 favorise également l'activation de la voie Wnt afin de contrôler l'homéostasie intestinale (Oittinen et al., 2017). Tara pourrait donc contribuer à l'activité de NA9 en modulant l'activité de la voie Wnt/Wg à travers la modulation de l'activité transcriptionnelle des groupes PcG et trxG.

En conclusion, il apparaît évident que les facteurs épigénétiques jouent un rôle important dans la modulation de l'activité de la voie de signalisation Wnt/Wg.

#### **4.2.2.2.3 La voie Wnt/Wg et les facteurs impliqués dans la traduction**

La régulation anormale de l'expression génique apparaît comme un élément essentiel à la tumorigenèse. Au cours de la dernière décennie, le contrôle de la traduction a été reconnu comme un mécanisme majeur dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'oncogenèse, principalement à travers l'étape d'initiation de la synthèse protéique qui implique de nombreux facteurs d'initiation eucaryotes (eIFs, « eukaryotic initiation factors ») dont eIF3, le facteur le plus complexe avec ses 13 sous-unités (eIF3a à eIF3m) (Cate, 2017; Truitt and Ruggero, 2016). En effet, de nombreuses sous-unités du facteur eIF3, qui est impliqué dans le maintien de la sous-unité ribosomique 40S libre et dans la formation du complexe de pré-initiation 43S, sont exprimées de façon aberrante dans divers types de cancers (Cate, 2017; Yin et al., 2018). Récemment, Xu *et al.* ont montré que le facteur d'initiation eIF3B (eIF3-S9 chez la drosophile) est surexprimé dans les carcinomes épidermoïdes de l'œsophage et qu'il contribue à la prolifération ainsi qu'à l'invasion des cellules squameuses cancéreuses à travers l'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Xu et al., 2016a). De même, Qi *et al.* ont montré que le facteur eIF3i (eIF3-S2/Trip

chez la drosophile) est surexprimé à la fois dans les adénocarcinomes et les polypes adénomateux (adénomes) colorectaux ce qui conduit à l'augmentation de la synthèse de la cyclooxygénase 2 (COX-2) qui induit, à son tour, l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine responsable de l'activité oncogénique de eIF3i (Qi et al., 2014).

De façon intéressante, nous avons identifié les facteurs eIF3-S9 et eIF3-S2 comme des modulateurs potentiels de l'activité oncogénique de NA9. Les allèles qui ont été identifiés suppriment le phénotype NA9 observé dans l'œil. Il semblerait que la contribution des facteurs eIF3-S9 et eIF3-S2 à l'activité de NA9 puissent être en rapport avec leur rôle dans la régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.

Un autre type de protéine, les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) jouent un rôle crucial dans l'interprétation du code génétique. Elles forment une famille de 20 ligases essentielles, une pour chaque acide aminé, dont la fonction principale consiste à catalyser la réaction d'aminacylation, c'est-à-dire l'estérification des acides aminés spécifiques sur les ARN de transfert correspondants qui seront ensuite utilisé par le ribosome pour assurer la synthèse protéique (Mirande, 2017). Neuf d'entre elles s'associent avec trois protéines dépourvues d'activité enzymatique, soit les protéines multifonctionnelles associées aux aaRS (AIMP1 à 3 aussi connues sous le nom p43, p38 et p18, respectivement) pour former le complexe multi-aminoacyl-ARNt synthétase (Mirande, 2017). Outre une fonction essentielle dans la biosynthèse protéique, de nombreuses évidences suggèrent que les protéines aaRS et AIMP possèdent des fonctions non canoniques indépendantes de la traduction comme la transcription, la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse et l'inflammation (Kim et al., 2011; Martinis et al., 1999; Yum et al., 2016).

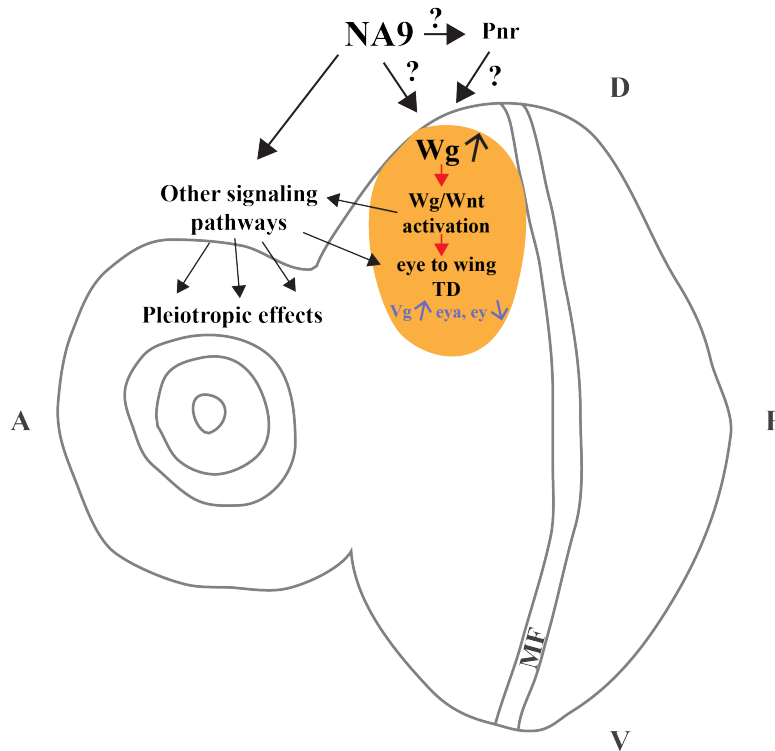
Nous avons identifié l'asparaginyl-ARNt synthétase NARS (AsnRS chez la drosophile) comme modulateur potentiel de l'activité de NA9. Comme pour les facteurs d'initiation eIF3, les allèles identifiés suppriment l'activité de NA9. Il a été montré que NARS est requis pour la progression du cycle cellulaire puisqu'un mutant de NARS sensible à la température induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase S à la température restrictive (Diamond et al., 1989). Il a également été montré que NARS promeut la survie des ostéoblastes à travers l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (Park et al., 2009). Une des hypothèses serait que les allèles de NARS suppriment l'activité de NA9 en inhibant la voie de signalisation

PI3K/Akt menant à l'apoptose des cellules exprimant NA9 ainsi qu'à une diminution de l'activité de la voie Wnt. En effet, bien qu'aucun lien direct n'ait été montré entre NARS/AsnRS et la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, il semblerait qu'Akt soit un régulateur important de la voie Wnt et que l'activation d'Akt associée avec Dishevelled induit l'accumulation de la  $\beta$ -caténine (Fukumoto et al., 2001).

#### 4.2.2.2.4 La voie Wnt/Wg et le cytosquelette

Enfin, il semblerait qu'il existe de nombreuses connections entre la voie de signalisation Wnt et la régulation du cytosquelette entre autres dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique (Bryja et al., 2017; Chen et al., 2006; Ciani et al., 2004; Galli et al., 2012; May-Simera and Kelley, 2012; Salinas, 2007). De façon intéressante, nous avons identifié deux gènes, *toucan (toc)* et *short stop (shot)* qui sont directement impliqués dans l'organisation du cytosquelette. En effet, le gène *tocMTUS2* encode une protéine associée aux microtubules qui est requise pour l'assemblage et la stabilité des microtubules du fuseau (Debec et al., 2001; Mirouse et al., 2005). Le gène *shot/DST*, quant à lui, encode plusieurs isoformes de la famille des spectraplakines. Conservées au cours de l'évolution, les spectraplakines sont des protéines dites de structure, qui combinent à la fois les propriétés des spectrines et des plakines. Elles sont capables de lier les trois éléments du cytosquelette que sont les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ce sont des protéines gigantesques de plus de 500 kDa, qui jouent un rôle critique dans la migration, la prolifération cellulaire, l'intégrité et la fonction des tissus en agissant comme des agents de réticulation. La famille des spectraplakines comporte deux gènes chez les mammifères, soit *MACF1* codant pour le facteur MACF1 (« microtubule actin cross-linking factor 1 ») et *DST* qui code pour dystonin (Zhang et al., 2017). Le facteur MACF1 fait d'ailleurs partie intégrante de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, MACF1 s'associe au complexe de destruction et suite à la stimulation de la voie par les ligands Wnt, MACF1 est impliqué dans la translocation de ce dernier à la membrane (Chen et al., 2006). Dystonin pourrait également jouer un rôle dans l'activité de la voie Wnt et contribuer au phénotype induit par NA9.

Ainsi, l'activité de la voie Wnt/Wg peut être modulée par un très grand nombre de facteurs dont certains ont été identifiés dans le crible génétique comme des modulateurs potentiels de l'activité oncogénique de NA9.



**Figure 4.8. Modèle schématique représentant l'impact de l'expression de NA9 au cours du développement de l'œil.**

Lorsqu'exprimé au cours du développement de l'œil, NA9 affecte à la fois les niveaux d'expression de Wg et l'activité de la voie de signalisation Wnt/Wg dans la région dorsale (représentée ici en orange). Dans cette même région, NA9 induit la TD de l'œil en aile. En effet, *vg* le gène sélecteur de l'aile est alors exprimé dans cette région au détriment des gènes sélecteurs de l'œil tels qu'*eya* et *ey*. Il semblerait que NA9 affecte également d'autres voies de signalisation telles que Notch, Dpp/BMP ou encore JAK/STAT, reflétant ainsi le caractère pleiotropique des effets induits par NA9. Cet effet pleiotropique est également souligné par la diversité des facteurs modulant l'activité de NA9 qui ont été identifiés dans le crible. La façon dont NA9 induit l'expression de Wg reste toutefois à être déterminée : 1) est-ce par l'intermédiaire du facteur de transcription Pnr ou 2) directement sur la transcription de *wg*? MF : sillon morphogénique, A : antérieur, P : postérieur, D : dorsal, V : ventral.

### 4.3 Les voies Wnt/Wg et Pvr/PDGF-VEGF

L'expression de NA9 dans les systèmes hématopoïétique et visuel de la mouche nous ont permis de mettre en évidence que l'activité de NA9 induit la perte d'homéostasie des cellules en agissant sur leur microenvironnement et/ou directement en réinitialisant leur programme épigénétique et transcriptionnel. De plus, nous avons montré que : (i) l'activité hyperplasique de NA9 dans la GL interférait avec la voie de signalisation Pvr; (ii) alors que l'activité de NA9 dans l'œil, en plus d'induire la dépression du locus HOX *Antp*, semble interférer avec la signalisation Wnt/Wg.

Il semble donc que l'activité de NA9 interfère avec les voies de signalisation Pvr et Wnt/Wg. Ce qui nous conduit à se questionner quant à l'existence d'un lien entre ces deux voies. A priori, aucune évidence ne suggère un rôle de la voie de signalisation Pvr dans le développement du disque imaginal de l'œil. Cependant, il semble que Pvr soit exprimé dans la partie postérieure du disque au troisième stade larvaire (Rosin et al., 2004). Il a effectivement, été montré que la voie de signalisation Pvr est impliquée dans la migration des cellules gliales, qui avec les neurones, constituent les lignées cellulaires majeures du système nerveux à travers le disque imaginal de l'œil au cours du troisième stade larvaire (Kim et al., 2014). De plus, l'équipe de Nobe Perrimon a réalisé un crible génétique par ARNi sur des cellules dérivées du disque imaginal de l'œil et des cellules S2R<sup>+</sup> afin d'identifier de nouveaux régulateurs potentiels de la voie Wnt/Wg chez la drosophile. Parmi 238 régulateurs potentiels, la kinase Pvr a été identifiée. Ils ont également observés que la déplétion de certains facteurs dont nous avons parlé plus haut : E(Pc), Emb et Dom induit une activation de la voie Wnt (DasGupta et al., 2005). Ces données ouvrent la porte à l'existence d'un lien potentiel entre les deux voies de signalisation Pvr et Wnt/Wg. Il serait intéressant dans un premier temps de confirmer que l'expression de NA9 a un impact sur la signalisation Pvr dans le disque imaginal de l'œil avant de creuser plus amplement sur le lien entre ces deux voies.

Les voies Wnt/Wg, PDGF et VEGF sont bien connues pour jouer un rôle essentiel au cours de l'hématopoïèse chez l'humain et leur dérégulation est par ailleurs observée dans les leucémies. En effet, la voie de signalisation Wnt/Wg joue un rôle essentiel au cours de

l'hématopoïèse dans le développement et le maintien de l'homéostasie des cellules sanguines (Malhotra and Kincade, 2009). Il n'est donc pas étonnant, que la dérégulation de la voie Wnt/Wg soit associée aux hémopathies malignes (Ashihara et al., 2015; Staal et al., 2016; Zhan et al., 2017). Dans les LMA, l'hyperactivation de la voie Wnt est généralement associée à un pronostic très défavorable (Staal et al., 2016). Tout récemment, il a été montré que l'hyperméthylation anormale des cellules stromales de patients atteints de syndrome myélodysplasique avancé induisait une hyperactivation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les cellules CD34+ de ces patients et était associée avec un pronostic sévère (Bhagat et al., 2017). De plus, Bhagat *et al.* ont démontré que l'activation constitutive de la  $\beta$ -caténine dans les cellules hématopoïétiques de souris atteintes d'un syndrome myélodysplasique induit par la fusion NUP98-HOXD13 entraîne le développement de la LMA (Bhagat et al., 2017). De plus, la réactivation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine semble être impliquée dans la transformation de CSH ou progéniteurs sanguins en cellules souches leucémiques dans les LMA induites par les oncogènes tels que HOXA9-MEIS1 ou MLL-AF9 (Wang et al., 2010). Deux modèles chez le poisson-zèbre exprimant respectivement les fusions AML1-ETO et NA9 ont également permis de révéler l'implication des voies PTGS/COX et Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'activité oncogénique de ces fusions (Deveau et al., 2015; Yeh et al., 2009). L'activité des voies PTGS/COX et Wnt/ $\beta$ -caténine sont inter-connectées dans la formation des CSH et la régénération (Goessling et al., 2009). Finalement, il semblerait que la voie Wnt soit impliquée dans l'initiation et la progression des LMA aussi bien de façon cellule autonome qu'en modifiant son microenvironnement (Lane et al., 2011; Wang et al., 2010; Yeung et al., 2010).

De même les voies de signalisation PDGF et VEGF sont impliquées toutes deux dans l'hématopoïèse et agissent respectivement dans la fonction des plaquettes sanguines et l'angiogenèse (Demoulin and Montano-Almendras, 2012; Gerber and Ferrara, 2003). Il semblerait que l'hyperactivation de ces deux voies soit associée aux hémopathies malignes (Demoulin and Montano-Almendras, 2012; Gerber and Ferrara, 2003). De plus, chez les patients atteints de LMA, l'hyperactivation de la voie VEGF est associée à un pronostic défavorable (Kampen et al., 2013). Il semblerait que la voie VEGF puisse contrôler

l'angiogenèse de façon paracrine et agir sur le microenvironnement de la niche hématopoïétique de manière autocrine (Kampen et al., 2013).

Il apparait que le potentiel oncogénique de NA9 repose sur sa capacité à moduler son microenvironnement en interférant avec les deux voies de signalisation Wnt et PDGF/VEGF conférant ainsi aux cellules un potentiel prolifératif accru et une plus grande plasticité cellulaire ce qui contribue à la perte d'homéostasie.

#### **4.4 Les modifications épigénétiques et la reprogrammation du destin cellulaire dans les LMA**

L'étude de l'activité de NA9 au cours du développement de l'œil de la mouche a également révélé la capacité de NA9 à induire une reprogrammation du destin cellulaire. En effet, les cellules qui forment normalement la rétine, perdent les marqueurs spécifiques aux cellules de l'œil pour acquérir ceux des cellules de l'aile et forment alors une ébauche d'aile (Cf. **figure 3.6**). Ces résultats suggèrent que l'activité oncogénique de NA9 repose sur sa capacité de reprogrammation transcriptionnelle afin de modifier le profil d'expression génique et donc le destin cellulaire. De plus, cette capacité semble être dépendante de l'activité du complexe de remodelage de la chromatine Tip60 ce qui suggère également un rôle de NA9 au niveau de la reprogrammation épigénétique (Cf. **figure 3.5**).

Il est maintenant clairement établi que les modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones jouent un rôle critique dans la régulation de l'hématopoïèse normale mais également dans l'initiation et la progression de la LMA (Antoniani et al., 2017; Goyama and Kitamura, 2017). Les premières aberrations épigénétiques ont été rapportées pour la première fois en 1987 suite à l'étude d'échantillons de leucémie primaire. Il s'agissait d'une altération au niveau de la méthylation de l'ADN dans la région régulatrice en 5' du gène calcitonin (Baylin et al., 1987). Par la suite, de nombreuses études ont confirmé une hyperméthylation dans les régions régulatrices des gènes (îlots CpG : régions riches en dinucléotides CpG) mais une hypométhylation globale (Melki et al., 1999; Toyota et al., 2001). Des altérations au niveau des modifications post-

traductionnelles des histones telles que la méthylation et l'acétylation des histones ont également été observées (Antoniani et al., 2017; Goyama and Kitamura, 2017). La thérapie épigénétique qui consiste au traitement par des inhibiteurs ciblant des modificateurs épigénétiques tels que les méthyltransférases, les histones déacétylases, ou encore les histones déméthylases est actuellement à l'étude dans le traitement de la LMA (Kim et al., 2015). Il a d'ailleurs été montré que la thérapie épigénétique par des inhibiteurs de la méthyltransférase DNMT1 restaurait une hématopoïèse normale chez le poisson-zèbre exprimant NA9 (Deveau et al., 2012). De plus, il semblerait que le traitement par de faibles doses de Panobinostat, un inhibiteur des HDAC, inhibe fortement la capacité proliférative de progéniteurs hématopoïétiques humains exprimant NA9 par transduction rétrovirale et induit leur apoptose (Rio-Machin et al., 2017). Il semblerait donc que l'activité de NA9 ait un impact au niveau épigénétique au travers soit de la séquestration de facteurs épigénétiques soit de leur recrutement au niveau de gènes cibles afin de moduler leur activité transcriptionnelle.

L'épigénome est au cœur de la stabilité des profils d'expression des gènes au cours du développement et de la différenciation cellulaire. Ainsi, la reprogrammation épigénétique et transcriptionnelle modifie le profil d'expression génique et par conséquent affecte la spécification du destin cellulaire. En effet, certains oncogènes possèdent la capacité de reprogrammer épigénétiquement et transcriptionnellement une cellule souche ou progénitrice saine en cellule tumorale (Gonzalez-Herrero et al., 2018). C'est le cas par exemple de l'oncogène MLL-AF9 impliqué dans le développement de LMA qui confère des propriétés d'auto-renouvellement aux progéniteurs granulo-monocytaires (CFU-GM) en induisant la réactivation d'un ensemble de gènes fortement exprimés par les CSH (Krivtsov et al., 2006; Somervaille and Cleary, 2006). Les profils épigénétiques et d'expression des gènes sont spécifiques et différent pour chaque oncogène. Une étude récente montre que les deux fusions chromosomiques RUNX1-ETO et RUNX1-EVI1, bien qu'elles impliquent le même facteur de transcription RUNX1, présentent différents profils épigénétiques et d'expression génique et ne dépendent pas des mêmes facteurs de transcription. En effet, RUNX1-EVI1 induit un programme génétique similaire à celui des cellules souches qui dépend du facteur GATA2, alors que les cellules leucémiques qui expriment RUNX1-ETO sont plus matures et dépendent du facteur RUNX1 (Loke et al., 2017).



Ainsi, NA9 pourrait réécrire la carte épigénétique et transcriptionnelle de CSH ou de progéniteurs hématopoïétiques sains en cellules leucémiques. Deux autres observations que nous avons faites viendraient appuyer un rôle de NA9 au niveau de l'épigénome : i) d'une part l'identification de facteurs épigénétiques comme modulateurs de l'activité de NA9 dans le crible génétique et ii) d'autre part le fait que les cellules qui subissent un changement de destin cellulaire dans l'œil de la mouche ont exprimé NA9 plus tôt dans le développement mais n'expriment plus l'oncogène à partir du troisième stade larvaire. Ce qui laisse penser que NA9 aurait laissé « une empreinte de passage » dans ces cellules possiblement par des marques épigénétiques. D'ailleurs, dans les cancers où des cellules souches cancéreuses sont générées par un processus de reprogrammation cellulaire, la nécessité d'expression des oncogènes à l'origine de la formation de la tumeur est mise en doute dans la progression de ces tumeurs (Perez-Caro et al., 2009; Vicente-Duenas et al., 2015).

## 4.5 Les limites de notre modèle

L'expression de la fusion humaine NA9 dans les systèmes hématopoïétique et visuel de la mouche nous a permis d'identifier un ensemble de nouveaux facteurs impliqués dans l'activité de NA9 permettant de mettre en avant de nouvelles fonctions de cette fusion qui nécessitent toutefois d'être validées. Bien que la drosophile se soit avérée être un modèle pertinent dans notre cas, comme n'importe lequel des modèles, il possède ses limites. En effet, le système sanguin chez la mouche à fruit est relativement simple en comparaison de celui des mammifères : il ne comporte qu'une lignée apparentée aux cellules myéloïdes, et bien que la plupart des facteurs qui jouent un rôle clé soit conservé, leur implication pourrait tout de même différer quelque peu en raison de la différence de complexité. De plus, le crible génétique dans l'œil a permis d'identifier des facteurs impliqués dans la polarité cellulaire. Bien que de plus en plus d'études suggèrent un rôle important de la polarité cellulaire dans l'hématopoïèse et les hémopathies malignes, nous pourrions nous questionner à savoir si ces facteurs ont été identifiés parce que l'œil est un tissu polarisé ou si effectivement ils ont bel et bien un impact sur l'activité de NA9 aussi bien chez la drosophile que les mammifères. Il sera

important à terme de confirmer que les homologues chez les mammifères des facteurs que nous avons identifiés ont bel et bien une influence sur l'activité de NA9 soit, *in cellulo*, dans des lignés cellulaires humaines ou de souris, ou encore, *in vivo*, dans des modèles leucémiques chez la souris.

## **Conclusion**

Au vue des résultats de cette étude, il s'avère que le potentiel oncogénique de NA9 relève d'une multitude de facteurs qui sont impliqués dans divers processus biologiques tels que la régulation épigénétique, le transport nucléo-cytoplasmique, la traduction, l'organisation du cytosquelette et la polarité cellulaire en plus de son activité transcriptionnelle avérée. L'un des défis qui s'impose maintenant est de déterminer lesquels de ces événements sont pertinents pour l'induction de la leucémie et d'élucider leurs mécanismes d'action.

## Bibliographie

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Alfonso, T.B., and Jones, B.W. (2002). *gcm2* promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Developmental biology* 248, 369-383.
- Alharbi, R.A., Pettengell, R., Pandha, H.S., and Morgan, R. (2013). The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 27, 1000-1008.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhatar, R., *et al.* (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131, 633-636.
- Antoniani, C., Romano, O., and Miccio, A. (2017). Concise Review: Epigenetic Regulation of Hematopoiesis: Biological Insights and Therapeutic Applications. *Stem cells translational medicine* 6, 2106-2114.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391-2405.
- Argiropoulos, B., Palmqvist, L., Yung, E., Kuchenbauer, F., Heuser, M., Sly, L.M., Wan, A., Krystal, G., and Humphries, R.K. (2008). Linkage of *Meis1* leukemogenic activity to multiple downstream effectors including *Trib2* and *Ccl3*. *Experimental hematology* 36, 845-859.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., and Dearolf, C.R. (2003). Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* 163, 203-215.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Ashihara, E., Takada, T., and Maekawa, T. (2015). Targeting the canonical Wnt/beta-catenin pathway in hematological malignancies. *Cancer science* 106, 665-671.

- Avet-Rochex, A., Boyer, K., Polesello, C., Gobert, V., Osman, D., Roch, F., Auge, B., Zanet, J., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2010). An in vivo RNA interference screen identifies gene networks controlling *Drosophila melanogaster* blood cell homeostasis. *BMC developmental biology* *10*, 65.
- Azcoitia, V., Aracil, M., Martinez, A.C., and Torres, M. (2005). The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Developmental biology* *280*, 307-320.
- Babcock, D.T., Brock, A.R., Fish, G.S., Wang, Y., Perrin, L., Krasnow, M.A., and Galko, M.J. (2008). Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 10017-10022.
- Babu, J.R., Jeganathan, K.B., Baker, D.J., Wu, X., Kang-Decker, N., and van Deursen, J.M. (2003). Rael is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *The Journal of cell biology* *160*, 341-353.
- Bachi, A., Braun, I.C., Rodrigues, J.P., Pante, N., Ribbeck, K., von Kobbe, C., Kutay, U., Wilm, M., Gorlich, D., Carmo-Fonseca, M., *et al.* (2000). The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *Rna* *6*, 136-158.
- Bai, X.T., Gu, B.W., Yin, T., Niu, C., Xi, X.D., Zhang, J., Chen, Z., and Chen, S.J. (2006). Trans-repressive effect of NUP98-PMX1 on PMX1-regulated c-FOS gene through recruitment of histone deacetylase 1 by FG repeats. *Cancer research* *66*, 4584-4590.
- Baker, N.E. (1988). Embryonic and imaginal requirements for wingless, a segment-polarity gene in *Drosophila*. *Developmental biology* *125*, 96-108.
- Baonza, A., and Freeman, M. (2002). Control of *Drosophila* eye specification by Wingless signalling. *Development* *129*, 5313-5322.
- Baril, C., Gavory, G., Bidla, G., Knaevelsrud, H., Sauvageau, G., and Therrien, M. (2017). Human NUP98-HOXA9 promotes hyperplastic growth of hematopoietic tissues in *Drosophila*. *Developmental biology* *421*, 16-26.
- Bassett, A., and Liu, J.L. (2014). CRISPR/Cas9 mediated genome engineering in *Drosophila*. *Methods* *69*, 128-136.

- Bataille, L., Auge, B., Ferjoux, G., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2005). Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors. *Development* *132*, 4635-4644.
- Bateson, W. (1894). *Materials for the study of variation treated with special regard to discontinuity in the origin of species*. London, New York: Macmillan and Co.
- Baylin, S.B., Fearon, E.R., Vogelstein, B., de Bustros, A., Sharkis, S.J., Burke, P.J., Staal, S.P., and Nelkin, B.D. (1987). Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. *Blood* *70*, 412-417.
- Becker, A.J., Mc, C.E., and Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* *197*, 452-454.
- Benmimoun, B., Polesello, C., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2015). The EBF transcription factor Collier directly promotes *Drosophila* blood cell progenitor maintenance independently of the niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 9052-9057.
- Benmimoun, B., Polesello, C., Waltzer, L., and Haenlin, M. (2012). Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in *Drosophila*. *Development* *139*, 1713-1717.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology* *33*, 451-458.
- Bentley, A., MacLennan, B., Calvo, J., and Dearolf, C.R. (2000). Targeted recovery of mutations in *Drosophila*. *Genetics* *156*, 1169-1173.
- Berthelsen, J., Kilstrup-Nielsen, C., Blasi, F., Mavilio, F., and Zappavigna, V. (1999). The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes & development* *13*, 946-953.
- Beumer, K.J., and Carroll, D. (2014). Targeted genome engineering techniques in *Drosophila*. *Methods* *68*, 29-37.
- Bhagat, T.D., Chen, S., Bartenstein, M., Barlowe, A.T., Von Ahrens, D., Choudhary, G.S., Tivnan, P., Amin, E., Marcondes, A.M., Sanders, M.A., *et al.* (2017). Epigenetically

- Aberrant Stroma in MDS Propagates Disease via Wnt/beta-Catenin Activation. *Cancer research* 77, 4846-4857.
- Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature reviews Genetics* 6, 9-23.
- Bier, E., Harrison, M.M., O'Connor-Giles, K.M., and Wildonger, J. (2018). Advances in Engineering the Fly Genome with the CRISPR-Cas System. *Genetics* 208, 1-18.
- Blackman, R.K., Sanicola, M., Raftery, L.A., Gillevet, T., and Gelbart, W.M. (1991). An extensive 3' cis-regulatory region directs the imaginal disk expression of decapentaplegic, a member of the TGF-beta family in *Drosophila*. *Development* 111, 657-666.
- Blatt, C., Aberdam, D., Schwartz, R., and Sachs, L. (1988). DNA rearrangement of a homeobox gene in myeloid leukaemic cells. *The EMBO journal* 7, 4283-4290.
- Blevins, M.B., Smith, A.M., Phillips, E.M., and Powers, M.A. (2003). Complex formation among the RNA export proteins Nup98, Rae1/Gle2, and TAP. *The Journal of biological chemistry* 278, 20979-20988.
- Blower, M.D., Nachury, M., Heald, R., and Weis, K. (2005). A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell* 121, 223-234.
- Bond, D., and Foley, E. (2009). A quantitative RNAi screen for JNK modifiers identifies Pvr as a novel regulator of *Drosophila* immune signaling. *PLoS pathogens* 5, e1000655.
- Bonini, N.M., Leiserson, W.M., and Benzer, S. (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 72, 379-395.
- Borrow, J., Shearman, A.M., Stanton, V.P., Jr., Becher, R., Collins, T., Williams, A.J., Dube, I., Katz, F., Kwong, Y.L., Morris, C., *et al.* (1996). The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nature genetics* 12, 159-167.
- Boudreault, A.A., Cronier, D., Selleck, W., Lacoste, N., Utley, R.T., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Tan, S., and Cote, J. (2003). Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes & development* 17, 1415-1428.
- Boutros, M., Kiger, A.A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S.A., Paro, R., Perrimon, N., and Heidelberg Fly Array, C. (2004). Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 303, 832-835.

- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Bras-Pereira, C., Bessa, J., and Casares, F. (2006). Odd-skipped genes specify the signaling center that triggers retinogenesis in *Drosophila*. *Development* 133, 4145-4149.
- Braun, A., Lemaitre, B., Lanot, R., Zachary, D., and Meister, M. (1997). *Drosophila* immunity: analysis of larval hemocytes by P-element-mediated enhancer trap. *Genetics* 147, 623-634.
- Breig, O., Bras, S., Martinez Soria, N., Osman, D., Heidenreich, O., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2014). Pontin is a critical regulator for AML1-ETO-induced leukemia. *Leukemia* 28, 1271-1279.
- Bretscher, A.J., Honti, V., Binggeli, O., Burri, O., Poidevin, M., Kurucz, E., Zsomboki, J., Ando, I., and Lemaitre, B. (2015). The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in *Drosophila melanogaster*. *Biology open* 4, 355-363.
- Bridges, C.B., and Morgan, T.H. (1923). The third-chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. Washington: Carnegie Institution of Washington.
- Brock, H.W., Hodgson, J.W., Petruk, S., and Mazo, A. (2009). Regulatory noncoding RNAs at Hox loci. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 87, 27-34.
- Brooke, N.M., Garcia-Fernández, J., and Holland, P.W. (1998). The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 392, 920-922.
- Brooke-Bisschop, T., Savory, J.G.A., Foley, T., Ringuette, R., and Lohnes, D. (2017). Essential roles for Cdx in murine primitive hematopoiesis. *Developmental biology* 422, 115-124.
- Bruckner, K., Kockel, L., Duchek, P., Luque, C.M., Rorth, P., and Perrimon, N. (2004). The PDGF/VEGF receptor controls blood cell survival in *Drosophila*. *Developmental cell* 7, 73-84.
- Bryja, V., Cervenka, I., and Cajanek, L. (2017). The connections of Wnt pathway components with cell cycle and centrosome: side effects or a hidden logic? *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 52, 614-637.

- Burglin, T.R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic acids research* 25, 4173-4180.
- Burglin, T.R., and Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma* 125, 497-521.
- Cagan, R. (2009). Principles of Drosophila eye differentiation. *Current topics in developmental biology* 89, 115-135.
- Calgano, S., Boube, M., Cribbs, D.L., and Bourbon, H.M. (2002). The Drosophila gene taranis encodes a novel trithorax group member potentially linked to the cell cycle regulatory apparatus. *Genetics* 160, 547-560.
- Caligiuri, M.A., Schichman, S.A., Strout, M.P., Mrozek, K., Baer, M.R., Frankel, S.R., Barcos, M., Herzig, G.P., Croce, C.M., and Bloomfield, C.D. (1994). Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer research* 54, 370-373.
- Calvo KR, S.D., Pasillas MP, Kamps MP (2002). Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene* 21, 4247-4256.
- Calvo, K.R., Sykes, D.B., Pasillas, M.P., and Kamps, M.P. (2002). Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene* 21, 4247-4256.
- Cancer Genome Atlas Research Network - 39 collaborators (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 368, 2059-2074.
- Capelson, M., Liang, Y., Schulte, R., Mair, W., Wagner, U., and Hetzer, M.W. (2010). Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes. *Cell* 140, 372-383.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., *et al.* (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.



- Carton, Y., and Nappi, A.J. (2001). Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* 52, 157-164.
- Castano Betancourt, M.C., Cailotto, F., Kerkhof, H.J., Cornelis, F.M., Doherty, S.A., Hart, D.J., Hofman, A., Luyten, F.P., Maciewicz, R.A., Mangino, M., *et al.* (2012). Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 8218-8223.
- Cate, J.H. (2017). Human eIF3: from 'blobology' to biological insight. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 372.
- Cavodeassi, F., Diez Del Corral, R., Campuzano, S., and Dominguez, M. (1999). Compartments and organising boundaries in the *Drosophila* eye: the role of the homeodomain Iroquois proteins. *Development* 126, 4933-4942.
- Chan, H.M., and La Thangue, N.B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of cell science* 114, 2363-2373.
- Chan, W.I., Hannah, R.L., Dawson, M.A., Pridans, C., Foster, D., Joshi, A., Gottgens, B., Van Deursen, J.M., and Huntly, B.J. (2011). The transcriptional coactivator Cbp regulates self-renewal and differentiation in adult hematopoietic stem cells. *Molecular and cellular biology* 31, 5046-5060.
- Chang, C.P., Brocchieri, L., Shen, W.F., Largman, C., and Cleary, M.L. (1996). Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Molecular and cellular biology* 16, 1734-1745.
- Chang, C.P., Jacobs, Y., Nakamura, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Cleary, M.L. (1997). Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Molecular and cellular biology* 17, 5679-5687.
- Chang, C.P., Shen, W.F., Rozenfeld, S., Lawrence, H.J., Largman, C., and Cleary, M.L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes & development* 9, 663-674.
- Chang, M.V., Chang, J.L., Gangopadhyay, A., Shearer, A., and Cadigan, K.M. (2008). Activation of wingless targets requires bipartite recognition of DNA by TCF. *Current biology : CB* 18, 1877-1881.

- Chanut, F., and Heberlein, U. (1997). Role of decapentaplegic in initiation and progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* retina. *Development* *124*, 559-567.
- Chen, C.W., and Armstrong, S.A. (2015). Targeting DOT1L and HOX gene expression in MLL-rearranged leukemia and beyond. *Experimental hematology* *43*, 673-684.
- Chen, H.J., Lin, C.M., Lin, C.S., Perez-Olle, R., Leung, C.L., and Liem, R.K. (2006). The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. *Genes & development* *20*, 1933-1945.
- Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z., and Mardon, G. (1997). Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* *91*, 893-903.
- Chen, S., Liu, X., Gao, R., Kobayashi, M., Yu, H., Yao, C., Qian, Z., Xi, R., and Liu, Y. (2015). Polycomb Repressive Complex 1 Enhances HSC Self-Renewal through Repressing the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Blood* *126*, 2378.
- Chen, Y., Riese, M.J., Killinger, M.A., and Hoffmann, F.M. (1998). A genetic screen for modifiers of *Drosophila* decapentaplegic signaling identifies mutations in *punt*, *Mothers against dpp* and the BMP-7 homologue, *60A*. *Development* *125*, 1759-1768.
- Chern, J.J., and Choi, K.W. (2002). Lobe mediates Notch signaling to control domain-specific growth in the *Drosophila* eye disc. *Development* *129*, 4005-4013.
- Cheyette, B.N., Green, P.J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V., and Zipursky, S.L. (1994). The *Drosophila* *sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* *12*, 977-996.
- Chiacchiera, F., Rossi, A., Jammula, S., Piunti, A., Scelfo, A., Ordonez-Moran, P., Huelsken, J., Koseki, H., and Pasini, D. (2016). Polycomb Complex PRC1 Preserves Intestinal Stem Cell Identity by Sustaining Wnt/beta-Catenin Transcriptional Activity. *Cell stem cell* *18*, 91-103.
- Cho, K.O., Chern, J., Izaddoost, S., and Choi, K.W. (2000). Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc patterning in *Drosophila*. *Cell* *103*, 331-342.
- Cho, K.O., and Choi, K.W. (1998). *Fringe* is essential for mirror symmetry and morphogenesis in the *Drosophila* eye. *Nature* *396*, 272-276.

- Chou, T.B., and Perrimon, N. (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *144*, 1673-1679.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., and Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* *365*, 855-859.
- Ciani, L., Krylova, O., Smalley, M.J., Dale, T.C., and Salinas, P.C. (2004). A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules. *The Journal of cell biology* *164*, 243-253.
- Clark, R.I., Woodcock, K.J., Geissmann, F., Trouillet, C., and Dionne, M.S. (2011). Multiple TGF-beta superfamily signals modulate the adult *Drosophila* immune response. *Current biology : CB* *21*, 1672-1677.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A., and Dixon, J.E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 6499-6503.
- Collins, C.T., and Hess, J.L. (2016a). Deregulation of the HOXA9/MEIS1 axis in acute leukemia. *Current opinion in hematology* *23*, 354-361.
- Collins, C.T., and Hess, J.L. (2016b). Role of HOXA9 in leukemia: dysregulation, cofactors and essential targets. *Oncogene* *35*, 1090-1098.
- Cook, K.R., Parks, A.L., Jacobus, L.M., Kaufman, T.C., and Matthews, K.A. (2010). New research resources at the Bloomington *Drosophila* Stock Center. *Fly (Austin)* *4*, 88-91.
- Crooks, G.M., Fuller, J., Petersen, D., Izadi, P., Malik, P., Pattengale, P.K., Kohn, D.B., and Gasson, J.C. (1999). Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* *94*, 519-528.
- Crozatier, M., Ubeda, J.M., Vincent, A., and Meister, M. (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier*. *PLoS biology* *2*, E196.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibnsouda, S., and Vincent, A. (1996). *Collier*, a novel regulator of *Drosophila* head development, is expressed in a single mitotic domain. *Current biology : CB* *6*, 707-718.

- Csordas, G., Varga, G.I., Honti, V., Jankovics, F., Kurucz, E., and Ando, I. (2014). In vivo immunostaining of hemocyte compartments in *Drosophila* for live imaging. *PloS one* 9, e98191.
- Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual review of immunology* 25, 745-785.
- Curtiss, J. (2013). Cell Morphogenesis: Tracing the Paths of Induction During *Drosophila* Ommatidial Development. In: Singh A, Kango-Singh M (eds) *Molecular Genetics of Axial Patterning, Growth and Disease in the Drosophila Eye* Springer, New York, NY, 99-140.
- Curtiss, J., and Mlodzik, M. (2000). Morphogenetic furrow initiation and progression during eye development in *Drosophila*: the roles of decapentaplegic, hedgehog and eyes absent. *Development* 127, 1325-1336.
- Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W.J., and Busslinger, M. (1999). twin of eyeless, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Molecular cell* 3, 297-307.
- DasGupta, R., Kaykas, A., Moon, R.T., and Perrimon, N. (2005). Functional genomic analysis of the Wnt-wingless signaling pathway. *Science* 308, 826-833.
- Dash, A.B., Williams, I.R., Kutok, J.L., Tomasson, M.H., Anastasiadou, E., Lindahl, K., Li, S., Van Etten, R.A., Borrow, J., Housman, D., *et al.* (2002). A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7622-7627.
- Davidson, A.J., Ernst, P., Wang, Y., Dekens, M.P., Kingsley, P.D., Palis, J., Korsmeyer, S.J., Daley, G.Q., and Zon, L.I. (2003). *cdx4* mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple *hox* genes. *Nature* 425, 300-306.
- Davidson, A.J., and Zon, L.I. (2006). The caudal-related homeobox genes *cdx1a* and *cdx4* act redundantly to regulate *hox* gene expression and the formation of putative hematopoietic stem cells during zebrafish embryogenesis. *Developmental biology* 292, 506-518.

- Davidson, C.J., Tirouvanziam, R., Herzenberg, L.A., and Lipsick, J.S. (2005). Functional evolution of the vertebrate Myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements *Drosophila* Myb in hemocytes. *Genetics* *169*, 215-229.
- Davis, A.P., and Capecchi, M.R. (1994). Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. *Development* *120*, 2187-2198.
- Davis, A.P., Witte, D.P., Hsieh-Li, H.M., Potter, S.S., and Capecchi, M.R. (1995). Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* *375*, 791-795.
- de Celis, J.F., Barrio, R., del Arco, A., and Garcia-Bellido, A. (1993). Genetic and molecular characterization of a Notch mutation in its Delta- and Serrate-binding domain in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 4037-4041.
- Debec, A., Grammont, M., Berson, G., Dastugue, B., Sullivan, W., and Couderc, J.L. (2001). Toucan protein is essential for the assembly of syncytial mitotic spindles in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* *31*, 167-175.
- Demoulin, J.B., and Montano-Almendras, C.P. (2012). Platelet-derived growth factors and their receptors in normal and malignant hematopoiesis. *American journal of blood research* *2*, 44-56.
- Deveau, A., Forrester, A.M., Grabher, C., Coombs, A.J., Chute, I., Leger, D., Lewis, S., Look, A.T., and Berman, J.N. (2012). Epigenetic Therapy Inhibits NUP98-HOXA9-Mediated Myeloid Disease – Decitabine and Valproic Acid Work Synergistically to Rescue Normal Hematopoiesis in Transgenic Zebrafish. *Blood* *120*, 2391.
- Deveau, A.P., Forrester, A.M., Coombs, A.J., Wagner, G.S., Grabher, C., Chute, I.C., Leger, D., Mingay, M., Alexe, G., Rajan, V., *et al.* (2015). Epigenetic therapy restores normal hematopoiesis in a zebrafish model of NUP98-HOXA9-induced myeloid disease. *Leukemia* *29*, 2086-2097.
- Diamond, G., Cedar, H., and Marcus, M. (1989). A temperature-sensitive mutation in asparaginyl-tRNA synthetase causes cell-cycle arrest in early S phase. *Experimental cell research* *184*, 53-60.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oettel, S., Scheiblauer, S., *et al.* (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* *448*, 151-156.

- Doepfner, K.T., Boller, D., and Arcaro, A. (2007). Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology* 63, 215-230.
- Dogan, Y., Sahay, S., Dorn, D.C., Franceschino, A., Xu, M., and Moore, M.A. (2011). The Nup98-HoxA9 Leukemogenic Fusion Protein Blocks Xpo1 and Tap-Mediated Nuclear Export. *Blood* 118, 5228.
- Dohner, H., Weisdorf, D.J., and Bloomfield, C.D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine* 373, 1136-1152.
- Dollar, G.L., Weber, U., Mlodzik, M., and Sokol, S.Y. (2005). Regulation of Lethal giant larvae by Dishevelled. *Nature* 437, 1376-1380.
- Dominguez, M., and Hafen, E. (1997). Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the Drosophila eye. *Genes & development* 11, 3254-3264.
- Dorey, K., and Amaya, E. (2010). FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 137, 3731-3742.
- Doyon, Y., and Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current opinion in genetics & development* 14, 147-154.
- Dragojlovic-Munther, M., and Martinez-Agosto, J.A. (2013). Extracellular matrix-modulated Heartless signaling in Drosophila blood progenitors regulates their differentiation via a Ras/ETS/FOG pathway and target of rapamycin function. *Developmental biology* 384, 313-330.
- Duboule, D., and Dolle, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *The EMBO journal* 8, 1497-1505.
- Duboule, D., and Morata, G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends in genetics : TIG* 10, 358-364.
- Duchek, P., Somogyi, K., Jekely, G., Beccari, S., and Rorth, P. (2001). Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor. *Cell* 107, 17-26.
- Duffy, J.B., Harrison, D.A., and Perrimon, N. (1998). Identifying loci required for follicular patterning using directed mosaics. *Development* 125, 2263-2271.
- Dunwell, T.L., and Holland, P.W. (2016). Diversity of human and mouse homeobox gene expression in development and adult tissues. *BMC developmental biology* 16, 40.

- Dutta, P., and Li, W.X. (2017). The SERTAD protein Taranis plays a role in Polycomb-mediated gene repression. *PloS one* *12*, e0180026.
- Duvic, B., Hoffmann, J.A., Meister, M., and Royet, J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Current biology : CB* *12*, 1923-1927.
- Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J.A., Lawrence, J.B., and Livingston, D.M. (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes & development* *8*, 869-884.
- Economides, K.D., and Capecchi, M.R. (2003). Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. *Development* *130*, 2061-2069.
- Edwards, W., Nantie, L.B., and Raetzman, L.T. (2016). Identification of a novel progenitor cell marker, grainyhead-like 2 in the developing pituitary. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* *245*, 1097-1106.
- Ekas, L.A., Baeg, G.H., Flaherty, M.S., Ayala-Camargo, A., and Bach, E.A. (2006). JAK/STAT signaling promotes regional specification by negatively regulating wingless expression in *Drosophila*. *Development* *133*, 4721-4729.
- Elagib, K.E., and Goldfarb, A.N. (2007). Oncogenic pathways of AML1-ETO in acute myeloid leukemia: multifaceted manipulation of marrow maturation. *Cancer letters* *251*, 179-186.
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., and Schneider, D. (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current biology : CB* *10*, 781-784.
- Eslin, P., Prevost, G., Havard, S., and Doury, G. (2009). Immune resistance of *Drosophila* hosts against *Asobara* parasitoids: cellular aspects. *Advances in parasitology* *70*, 189-215.
- Evans, C.J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Developmental cell* *5*, 673-690.
- Evans, C.J., Olson, J.M., Ngo, K.T., Kim, E., Lee, N.E., Kuoy, E., Patananan, A.N., Sitz, D., Tran, P., Do, M.T., *et al.* (2009). G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nature methods* *6*, 603-605.

- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., *et al.* (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *The New England journal of medicine* *352*, 254-266.
- Ferguson, G.B., and Martinez-Agosto, J.A. (2014). Kicking it up a Notch for the best in show: Scalloped leads Yorkie into the haematopoietic arena. *Fly (Austin)* *8*, 206-217.
- Ferguson, G.B., and Martinez-Agosto, J.A. (2017). The TEAD family transcription factor Scalloped regulates blood progenitor maintenance and proliferation in *Drosophila* through PDGF/VEGFR receptor (Pvr) signaling. *Developmental biology* *425*, 21-32.
- Ferjoux, G., Auge, B., Boyer, K., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2007). A GATA/RUNX cis-regulatory module couples *Drosophila* blood cell commitment and differentiation into crystal cells. *Developmental biology* *305*, 726-734.
- Ferrell, C.M., Dorsam, S.T., Ohta, H., Humphries, R.K., Derynck, M.K., Haqq, C., Largman, C., and Lawrence, H.J. (2005). Activation of stem-cell specific genes by HOXA9 and HOXA10 homeodomain proteins in CD34+ human cord blood cells. *Stem cells* *23*, 644-655.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Firth, L.C., Bhattacharya, A., and Baker, N.E. (2010). Cell cycle arrest by a gradient of Dpp signaling during *Drosophila* eye development. *BMC developmental biology* *10*, 28.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W., and Luhrmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* *82*, 475-483.
- Fisher, K., Southall, S.M., Wilson, J.R., and Poulin, G.B. (2010). Methylation and demethylation activities of a *C. elegans* MLL-like complex attenuate RAS signalling. *Developmental biology* *341*, 142-153.
- Fornierod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I.W. (1997a). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* *90*, 1051-1060.
- Fornierod, M., van Deursen, J., van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K.G., Fransen, J., and Grosveld, G. (1997b). The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic



- subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. The EMBO journal *16*, 807-816.
- Forrester, A.M., Grabher, C., McBride, E.R., Boyd, E.R., Vigerstad, M.H., Edgar, A., Kai, F.B., Da'as, S.I., Payne, E., Look, A.T., *et al.* (2011). NUP98-HOXA9-transgenic zebrafish develop a myeloproliferative neoplasm and provide new insight into mechanisms of myeloid leukaemogenesis. *British journal of haematology* *155*, 167-181.
- Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S.H., and Schulz, R.A. (2003). Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during *Drosophila* hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 11451-11456.
- Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., and Ezekowitz, R.A. (1996). Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* *4*, 431-443.
- Franks, T.M., and Hetzer, M.W. (2013). The role of Nup98 in transcription regulation in healthy and diseased cells. *Trends in cell biology* *23*, 112-117.
- Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* *87*, 651-660.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* *390*, 308-311.
- Fukumoto, S., Hsieh, C.M., Maemura, K., Layne, M.D., Yet, S.F., Lee, K.H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Taylor, W.G., Rubin, J.S., *et al.* (2001). Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *The Journal of biological chemistry* *276*, 17479-17483.
- Funasaka, T., Nakano, H., Wu, Y., Hashizume, C., Gu, L., Nakamura, T., Wang, W., Zhou, P., Moore, M.A., Sato, H., *et al.* (2011). RNA export factor RAE1 contributes to NUP98-HOXA9-mediated leukemogenesis. *Cell cycle* *10*, 1456-1467.
- Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F., 3rd (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology* *31*, 397-405.

- Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A.A., Zhang, Y., Heliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W.S., Stillman, D.J., and Cote, J. (2000). Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Molecular cell* 5, 927-937.
- Galli, C., Piemontese, M., Lumetti, S., Ravanetti, F., Macaluso, G.M., and Passeri, G. (2012). Actin cytoskeleton controls activation of Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal cells on implant surfaces with different topographies. *Acta biomaterialia* 8, 2963-2968.
- Gao, H., Wu, X., and Fossett, N. (2009). Upregulation of the Drosophila Friend of GATA gene U-shaped by JAK/STAT signaling maintains lymph gland prohemocyte potency. *Molecular and cellular biology* 29, 6086-6096.
- Gao, H., Wu, X., and Fossett, N. (2013). Drosophila E-cadherin functions in hematopoietic progenitors to maintain multipotency and block differentiation. *PloS one* 8, e74684.
- Gao, H., Wu, X., Simon, L., and Fossett, N. (2014). Antioxidants maintain E-cadherin levels to limit Drosophila prohemocyte differentiation. *PloS one* 9, e107768.
- Garcia-Fernandez, J. (2005). Hox, ParaHox, ProtoHox: facts and guesses. *Heredity* 94, 145-152.
- Gaunt, S.J. (1988). Mouse homeobox gene transcripts occupy different but overlapping domains in embryonic germ layers and organs: a comparison of Hox-3.1 and Hox-1.5. *Development* 103, 135-144.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., and Wuthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-223.
- Gerber, H.P., and Ferrara, N. (2003). The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *Journal of molecular medicine* 81, 20-31.
- Geutskens, S.B., Andrews, W.D., van Stalborch, A.M., Brussen, K., Holtrop-de Haan, S.E., Parnavelas, J.G., Hordijk, P.L., and van Hennik, P.B. (2012). Control of human hematopoietic stem/progenitor cell migration by the extracellular matrix protein Slit3. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92, 1129-1139.
- Ghannam, G., Takeda, A., Camarata, T., Moore, M.A., Viale, A., and Yaseen, N.R. (2004). The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 866-875.

- Ghosh, S., Singh, A., Mandal, S., and Mandal, L. (2015). Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. *Developmental cell* *33*, 478-488.
- Gibbons, G.S., Owens, S.R., Fearon, E.R., and Nikolovska-Coleska, Z. (2015). Regulation of Wnt signaling target gene expression by the histone methyltransferase DOT1L. *ACS chemical biology* *10*, 109-114.
- Giotopoulos, G., Chan, W.I., Horton, S.J., Ruau, D., Gallipoli, P., Fowler, A., Crawley, C., Papaemmanuil, E., Campbell, P.J., Gottgens, B., *et al.* (2016). The epigenetic regulators CBP and p300 facilitate leukemogenesis and represent therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Oncogene* *35*, 279-289.
- Go, M.J., and Artavanis-Tsakonas, S. (1998). A genetic screen for novel components of the notch signaling pathway during *Drosophila* bristle development. *Genetics* *150*, 211-220.
- Goessling, W., North, T.E., Loewer, S., Lord, A.M., Lee, S., Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Puder, M., Daley, G.Q., Moon, R.T., *et al.* (2009). Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell* *136*, 1136-1147.
- Gold, K.S., and Bruckner, K. (2015). Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in immunology* *27*, 357-368.
- Golic, K.G., and Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* *59*, 499-509.
- Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., *et al.* (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* *286*, 531-537.
- Gonzalez-Herrero, I., Rodriguez-Hernandez, G., Luengas-Martinez, A., Isidro-Hernandez, M., Jimenez, R., Garcia-Cenador, M.B., Garcia-Criado, F.J., Sanchez-Garcia, I., and Vicente-Duenas, C. (2018). The Making of Leukemia. *International journal of molecular sciences* *19*.

- Goodliffe, J.M., Wieschaus, E., and Cole, M.D. (2005). Polycomb mediates Myc autorepression and its transcriptional control of many loci in *Drosophila*. *Genes & development* *19*, 2941-2946.
- Goodrich, L.V. (2008). The plane facts of PCP in the CNS. *Neuron* *60*, 9-16.
- Gough, S.M., Slape, C.I., and Aplan, P.D. (2011). NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood* *118*, 6247-6257.
- Goyama, S., and Kitamura, T. (2017). Epigenetics in normal and malignant hematopoiesis: An overview and update 2017. *Cancer science* *108*, 553-562.
- Gratz, S.J., Cummings, A.M., Nguyen, J.N., Hamm, D.C., Donohue, L.K., Harrison, M.M., Wildonger, J., and O'Connor-Giles, K.M. (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* *194*, 1029-1035.
- Gratz, S.J., Rubinstein, C.D., Harrison, M.M., Wildonger, J., and O'Connor-Giles, K.M. (2015). CRISPR-Cas9 Genome Editing in *Drosophila*. *Current protocols in molecular biology* *111*, 31.32.31-20.
- Greenspan, R.J. (1997). *Fly Pushing: The Theory and Practice of Drosophila genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- Griffis, E.R., Altan, N., Lippincott-Schwartz, J., and Powers, M.A. (2002). Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics. *Molecular biology of the cell* *13*, 1282-1297.
- Griffis, E.R., Xu, S., and Powers, M.A. (2003). Nup98 localizes to both nuclear and cytoplasmic sides of the nuclear pore and binds to two distinct nucleoporin subcomplexes. *Molecular biology of the cell* *14*, 600-610.
- Grigorian, M., Liu, T., Banerjee, U., and Hartenstein, V. (2013). The proteoglycan Trol controls the architecture of the extracellular matrix and balances proliferation and differentiation of blood progenitors in the *Drosophila* lymph gland. *Developmental biology* *384*, 301-312.
- Grigorian, M., Mandal, L., and Hartenstein, V. (2011). Hematopoiesis at the onset of metamorphosis: terminal differentiation and dissociation of the *Drosophila* lymph gland. *Development genes and evolution* *221*, 121-131.
- Gueguen, G., Kalamarz, M.E., Ramroop, J., Uribe, J., and Govind, S. (2013). Polydnviral ankyrin proteins aid parasitic wasp survival by coordinate and selective inhibition of

- hematopoietic and immune NF-kappa B signaling in insect hosts. *PLoS pathogens* 9, e1003580.
- Gummalla, M., Maeda, R.K., Castro Alvarez, J.J., Gyurkovics, H., Singari, S., Edwards, K.A., Karch, F., and Bender, W. (2012). abd-A regulation by the iab-8 noncoding RNA. *PLoS genetics* 8, e1002720.
- Habas, R., and Dawid, I.B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *Journal of biology* 4, 2.
- Hagemeyer, A., and van der Plas, D.C. (1990). Clinical relevance of cytogenetics in acute leukemia. *Haematology and blood transfusion* 33, 23-30.
- Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W.J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-1792.
- Hanoun, M., Maryanovich, M., Arnal-Estape, A., and Frenette, P.S. (2015). Neural regulation of hematopoiesis, inflammation, and cancer. *Neuron* 86, 360-373.
- Hao, Y., and Jin, L.H. (2017). Dual role for Jumu in the control of hematopoietic progenitors in the *Drosophila* lymph gland. *eLife* 6.
- Harrison, D.A., Binari, R., Nahreini, T.S., Gilman, M., and Perrimon, N. (1995). Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *The EMBO journal* 14, 2857-2865.
- Hartenstein, V. (2006). Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annual review of cell and developmental biology* 22, 677-712.
- Hartenstein, V., and Mandal, L. (2006). The blood/vascular system in a phylogenetic perspective. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 28, 1203-1210.
- Hazelett, D.J., Bourouis, M., Walldorf, U., and Treisman, J.E. (1998). decapentaplegic and wingless are regulated by eyes absent and eyegone and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc. *Development* 125, 3741-3751.
- He, N., Zhang, L., Cui, J., and Li, Z. (2014). Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone marrow research* 2014, 128436.
- He, S., Nakada, D., and Morrison, S.J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 377-406.

- He, X., Yan, Y.L., Eberhart, J.K., Herpin, A., Wagner, T.U., Schartl, M., and Postlethwait, J.H. (2011). miR-196 regulates axial patterning and pectoral appendage initiation. *Developmental biology* 357, 463-477.
- Heberlein, U., and Moses, K. (1995). Mechanisms of *Drosophila* retinal morphogenesis: the virtues of being progressive. *Cell* 81, 987-990.
- Heberlein, U., Singh, C.M., Luk, A.Y., and Donohoe, T.J. (1995). Growth and differentiation in the *Drosophila* eye coordinated by hedgehog. *Nature* 373, 709-711.
- Heberlein, U., Wolff, T., and Rubin, G.M. (1993). The TGF beta homolog dpp and the segment polarity gene hedgehog are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell* 75, 913-926.
- Heidel, F.H., Bullinger, L., Arreba-Tutusa, P., Wang, Z., Gaebel, J., Hirt, C., Niederwieser, D., Lane, S.W., Dohner, K., Vasioukhin, V., *et al.* (2013). The cell fate determinant *Llg1* influences HSC fitness and prognosis in AML. *The Journal of experimental medicine* 210, 15-22.
- Heideman, M.R., Lancini, C., Proost, N., Yanover, E., Jacobs, H., and Dannenberg, J.H. (2014). Sin3a-associated Hdac1 and Hdac2 are essential for hematopoietic stem cell homeostasis and contribute differentially to hematopoiesis. *Haematologica* 99, 1292-1303.
- Heigwer, F., Port, F., and Boutros, M. (2018). RNA Interference (RNAi) Screening in *Drosophila*. *Genetics* 208, 853-874.
- Heitzler, P., Haenlin, M., Ramain, P., Calleja, M., and Simpson, P. (1996). A genetic analysis of *pannier*, a gene necessary for viability of dorsal tissues and bristle positioning in *Drosophila*. *Genetics* 143, 1271-1286.
- Hess, J.L., Bittner, C.B., Zeisig, D.T., Bach, C., Fuchs, U., Borkhardt, A., Frampton, J., and Slany, R.K. (2006). c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood* 108, 297-304.
- Ho, L.L., Sinha, A., Verzi, M., Bernt, K.M., Armstrong, S.A., and Shivdasani, R.A. (2013). DOT1L-mediated H3K79 methylation in chromatin is dispensable for Wnt pathway-specific and other intestinal epithelial functions. *Molecular and cellular biology* 33, 1735-1745.

- Ho, Y.H., Lien, M.T., Lin, C.M., Wei, S.Y., Chang, L.H., and Hsu, J.C. (2010). Echinoid regulates Flamingo endocytosis to control ommatidial rotation in the *Drosophila* eye. *Development* *137*, 745-754.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., and Klapper, R. (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* *130*, 4955-4962.
- Honti, V., Csordas, G., Kurucz, E., Markus, R., and Ando, I. (2014). The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Developmental and comparative immunology* *42*, 47-56.
- Honti, V., Csordas, G., Markus, R., Kurucz, E., Jankovics, F., and Ando, I. (2010). Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Molecular immunology* *47*, 1997-2004.
- Hrycaj, S.M., Dye, B.R., Baker, N.C., Larsen, B.M., Burke, A.C., Spence, J.R., and Wellik, D.M. (2015). Hox5 Genes Regulate the Wnt2/2b-Bmp4-Signaling Axis during Lung Development. *Cell reports* *12*, 903-912.
- Huang, J., Nguyen-McCarty, M., Hexner, E.O., Danet-Desnoyers, G., and Klein, P.S. (2012). Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways. *Nature medicine* *18*, 1778-1785.
- Huang, X., Spencer, G.J., Lynch, J.T., Ciceri, F., Somerville, T.D., and Somerville, T.C. (2014). Enhancers of Polycomb EPC1 and EPC2 sustain the oncogenic potential of MLL leukemia stem cells. *Leukemia* *28*, 1081-1091.
- Irving, P., Ubeda, J.M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., and Meister, M. (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cellular microbiology* *7*, 335-350.
- Isaacs, H.V., Pownall, M.E., and Slack, J.M. (1998). Regulation of Hox gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. *The EMBO journal* *17*, 3413-3427.
- Iwasaki, M., Kuwata, T., Yamazaki, Y., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Osato, M., Ito, Y., Kroon, E., Sauvageau, G., and Nakamura, T. (2005). Identification of cooperative genes for NUP98-HOXA9 in myeloid leukemogenesis using a mouse model. *Blood* *105*, 784-793.

- Iyer, J., Wang, Q., Le, T., Pizzo, L., Gronke, S., Ambegaokar, S.S., Imai, Y., Srivastava, A., Troisi, B.L., Mardon, G., *et al.* (2016). Quantitative Assessment of Eye Phenotypes for Functional Genetic Studies Using *Drosophila melanogaster*. *G3* 6, 1427-1437.
- Jeganathan, K.B., Malureanu, L., and van Deursen, J.M. (2005). The Rae1-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature* 438, 1036-1039.
- Jin, M., Aibar, S., Ge, Z., Chen, R., Aerts, S., and Mardon, G. (2016). Identification of novel direct targets of *Drosophila* *Sine oculis* and *Eyes absent* by integration of genome-wide data sets. *Developmental biology* 415, 157-167.
- Johnston, L.A., and Schubiger, G. (1996). Ectopic expression of wingless in imaginal discs interferes with decapentaplegic expression and alters cell determination. *Development* 122, 3519-3529.
- Jung, S.H., Evans, C.J., Uemura, C., and Banerjee, U. (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132, 2521-2533.
- Kalverda, B., Pickersgill, H., Shloma, V.V., and Fornerod, M. (2010). Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm. *Cell* 140, 360-371.
- Kampen, K.R., Ter Elst, A., and de Bont, E.S. (2013). Vascular endothelial growth factor signaling in acute myeloid leukemia. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 1307-1317.
- Kamps, M.P., Murre, C., Sun, X.H., and Baltimore, D. (1990). A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* 60, 547-555.
- Kane, N.S., Vora, M., Varre, K.J., and Padgett, R.W. (2017). Efficient Screening of CRISPR/Cas9-Induced Events in *Drosophila* Using a Co-CRISPR Strategy. *G3* 7, 87-93.
- Kaplan, N.A., and Tolwinski, N.S. (2010). Spatially defined Dsh-Lgl interaction contributes to directional tissue morphogenesis. *Journal of cell science* 123, 3157-3165.
- Karim, F.D., Chang, H.C., Therrien, M., Wassarman, D.A., Laverty, T., and Rubin, G.M. (1996). A screen for genes that function downstream of Ras1 during *Drosophila* eye development. *Genetics* 143, 315-329.



- Kasper, L.H., Brindle, P.K., Schnabel, C.A., Pritchard, C.E., Cleary, M.L., and van Deursen, J.M. (1999). CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Molecular and cellular biology* *19*, 764-776.
- Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* *95*, 1017-1026.
- Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* *18*, 896-898.
- Kessel, M., and Gruss, P. (1990). Murine developmental control genes. *Science* *249*, 374-379.
- Khadilkar, R.J., Rodrigues, D., Mote, R.D., Sinha, A.R., Kulkarni, V., Magadi, S.S., and Inamdar, M.S. (2014). ARF1-GTP regulates Asrij to provide endocytic control of *Drosophila* blood cell homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 4898-4903.
- Kim, M.J., and Choe, K.M. (2014). Basement membrane and cell integrity of self-tissues in maintaining *Drosophila* immunological tolerance. *PLoS genetics* *10*, e1004683.
- Kim, S., You, S., and Hwang, D. (2011). Aminoacyl-tRNA synthetases and tumorigenesis: more than housekeeping. *Nature reviews Cancer* *11*, 708-718.
- Kim, S.N., Jeibmann, A., Halama, K., Witte, H.T., Walte, M., Matzat, T., Schillers, H., Faber, C., Senner, V., Paulus, W., *et al.* (2014). ECM stiffness regulates glial migration in *Drosophila* and mammalian glioma models. *Development* *141*, 3233-3242.
- Kim, T.K., Gore, S.D., and Zeidan, A.M. (2015). Epigenetic Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current and Future Directions. *Seminars in hematology* *52*, 172-183.
- Ko, S.Y., Barengo, N., Ladanyi, A., Lee, J.S., Marini, F., Lengyel, E., and Naora, H. (2012). HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts. *The Journal of clinical investigation* *122*, 3603-3617.
- Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., *et al.* (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* *123*, 335-346.

- Kongsuwan, K., Webb, E., Housiaux, P., and Adams, J.M. (1988). Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian haemopoietic lineages. *The EMBO journal* *7*, 2131-2138.
- Kooh, P.J., Fehon, R.G., and Muskavitch, M.A. (1993). Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* *117*, 493-507.
- Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., *et al.* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* *442*, 818-822.
- Kroon, E., Kros, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A.M., and Sauvageau, G. (1998). *Hoxa9* transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with *Meis1a* but not *Pbx1b*. *The EMBO journal* *17*, 3714-3725.
- Kroon, E., Thorsteinsdottir, U., Mayotte, N., Nakamura, T., and Sauvageau, G. (2001). NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *The EMBO journal* *20*, 350-361.
- Krzemien, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., and Crozatier, M. (2007). Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* *446*, 325-328.
- Krzemien, J., Oyallon, J., Crozatier, M., and Vincent, A. (2010). Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Developmental biology* *346*, 310-319.
- Kulkarni, V., Khadilkar, R.J., Magadi, S.S., and Inamdar, M.S. (2011). *Asrij* maintains the stem cell niche and controls differentiation during *Drosophila* lymph gland hematopoiesis. *PloS one* *6*, e27667.
- Kung, A.L., Rebel, V.I., Bronson, R.T., Ch'ng, L.E., Sieff, C.A., Livingston, D.M., and Yao, T.P. (2000). Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes & development* *14*, 272-277.
- Kurata, S., Go, M.J., Artavanis-Tsakonas, S., and Gehring, W.J. (2000). Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 2117-2122.

- Kurucz, E., Vaczi, B., Markus, R., Laurinyecz, B., Vilmos, P., Zsamboki, J., Csorba, K., Gateff, E., Hultmark, D., and Ando, I. (2007). Definition of *Drosophila* hemocyte subsets by cell-type specific antigens. *Acta biologica Hungarica 58 Suppl*, 95-111.
- Lam, V., Tokusumi, T., Tokusumi, Y., and Schulz, R.A. (2014). bantam miRNA is important for *Drosophila* blood cell homeostasis and a regulator of proliferation in the hematopoietic progenitor niche. *Biochemical and biophysical research communications 453*, 467-472.
- Lane, S.W., Wang, Y.J., Lo Celso, C., Ragu, C., Bullinger, L., Sykes, S.M., Ferraro, F., Shterental, S., Lin, C.P., Gilliland, D.G., *et al.* (2011). Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia progression. *Blood 118*, 2849-2856.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental biology 230*, 243-257.
- Laslo, P., Pongubala, J.M., Lancki, D.W., and Singh, H. (2008). Gene regulatory networks directing myeloid and lymphoid cell fates within the immune system. *Seminars in immunology 20*, 228-235.
- Lawrence, H.J., Christensen, J., Fong, S., Hu, Y.L., Weissman, I., Sauvageau, G., Humphries, R.K., and Largman, C. (2005). Loss of expression of the *Hoxa-9* homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood 106*, 3988-3994.
- Lawrence, H.J., Helgason, C.D., Sauvageau, G., Fong, S., Izon, D.J., Humphries, R.K., and Largman, C. (1997). Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene *HOXA9* have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood 89*, 1922-1930.
- Lawrence, H.J., Rozenfeld, S., Cruz, C., Matsukuma, K., Kwong, A., Komuves, L., Buchberg, A.M., and Largman, C. (1999). Frequent co-expression of the *HOXA9* and *MEIS1* homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia 13*, 1993-1999.
- Le Douarin, N.M., Dieterlen-Lièvre, F., and Oliver, P.D. (1984). Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am J Anat 170*, 261-299.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science 288*, 146-149.

- Lebestky, T., Jung, S.H., and Banerjee, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes & development* *17*, 348-353.
- Lee, D., and Shin, C. (2012). MicroRNA-target interactions: new insights from genome-wide approaches. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1271*, 118-128.
- Lee, H., and Adler, P.N. (2004). The grainy head transcription factor is essential for the function of the frizzled pathway in the *Drosophila* wing. *Mechanisms of development* *121*, 37-49.
- Lee, J.T. (2012). Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science* *338*, 1435-1439.
- Legent, K., and Treisman, J.E. (2008). Wingless signaling in *Drosophila* eye development. *Methods in molecular biology* *469*, 141-161.
- Leitao, A.B., and Sucena, E. (2015). *Drosophila* sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. *eLife* *4*.
- Letourneau, M., Lapraz, F., Sharma, A., Vanzo, N., Waltzer, L., and Crozatier, M. (2016). *Drosophila* hematopoiesis under normal conditions and in response to immune stress. *FEBS letters* *590*, 4034-4051.
- Levine, M., and Hoey, T. (1988). Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* *55*, 537-540.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* *276*, 565-570.
- Lin, S., Zhao, R., Xiao, Y., and Li, P. (2015). Mechanisms determining the fate of hematopoietic stem cells. *Stem cell investigation* *2*, 10.
- Liu, Y., and Montell, D.J. (1999). Identification of mutations that cause cell migration defects in mosaic clones. *Development* *126*, 1869-1878.
- Loges, S., Fehse, B., Brockmann, M.A., Lamszus, K., Butzal, M., Guckenbiehl, M., Schuch, G., Ergun, S., Fischer, U., Zander, A.R., *et al.* (2004). Identification of the adult human hemangioblast. *Stem cells and development* *13*, 229-242.
- Lohnes, D. (2003). The Cdx1 homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *25*, 971-980.
- Loke, J., Assi, S.A., Imperato, M.R., Ptasinska, A., Cauchy, P., Grabovska, Y., Soria, N.M., Raghavan, M., Delwel, H.R., Cockerill, P.N., *et al.* (2017). RUNX1-ETO and RUNX1-

- EV11 Differentially Reprogram the Chromatin Landscape in t(8;21) and t(3;21) AML. *Cell reports* *19*, 1654-1668.
- Luo, H., Hanratty, W.P., and Dearolf, C.R. (1995). An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *The EMBO journal* *14*, 1412-1420.
- Luo, H., Rose, P.E., Roberts, T.M., and Dearolf, C.R. (2002). The Hopscotch Jak kinase requires the Raf pathway to promote blood cell activation and differentiation in *Drosophila*. *Molecular genetics and genomics* : MGG *267*, 57-63.
- Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P.A., and Moses, K. (1993). The segment polarity gene hedgehog is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell* *75*, 927-938.
- Maeder, M.L., and Gersbach, C.A. (2016). Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *24*, 430-446.
- Mahmoudi, T., Boj, S.F., Hatzis, P., Li, V.S., Taouatas, N., Vries, R.G., Teunissen, H., Begthel, H., Korving, J., Mohammed, S., *et al.* (2010). The leukemia-associated Mllt10/Af10-Dot11 are Tcf4/beta-catenin coactivators essential for intestinal homeostasis. *PLoS biology* *8*, e1000539.
- Mahoney, M.B., Parks, A.L., Ruddy, D.A., Tiong, S.Y., Esengil, H., Phan, A.C., Philandrinis, P., Winter, C.G., Chatterjee, R., Huppert, K., *et al.* (2006). Presenilin-based genetic screens in *Drosophila melanogaster* identify novel notch pathway modifiers. *Genetics* *172*, 2309-2324.
- Makhijani, K., Alexander, B., Tanaka, T., Rulifson, E., and Bruckner, K. (2011). The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. *Development* *138*, 5379-5391.
- Makki, R., Meister, M., Pennetier, D., Ubeda, J.M., Braun, A., Daburon, V., Krzemien, J., Bourbon, H.M., Zhou, R., Vincent, A., *et al.* (2010). A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response. *PLoS biology* *8*, e1000441.
- Malhotra, S., and Kincade, P.W. (2009). Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell stem cell* *4*, 27-36.

- Mallo, M., and Alonso, C.R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development* *140*, 3951-3963.
- Mallo, M., Wellik, D.M., and Deschamps, J. (2010). Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Developmental biology* *344*, 7-15.
- Maloof, J.N., Whangbo, J., Harris, J.M., Jongeward, G.D., and Kenyon, C. (1999). A Wnt signaling pathway controls hox gene expression and neuroblast migration in *C. elegans*. *Development* *126*, 37-49.
- Mandal, L., Banerjee, U., and Hartenstein, V. (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nature genetics* *36*, 1019-1023.
- Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., Evans, C.J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2007). A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* *446*, 320-324.
- Mann, R.S., and Chan, S.K. (1996). Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends in genetics : TIG* *12*, 258-262.
- Mann, R.S., Lelli, K.M., and Joshi, R. (2009). Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Current topics in developmental biology* *88*, 63-101.
- Marcogliese, P.C., and Wangler, M.F. (2018). *Drosophila* as a Model for Human Diseases. eLS John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Mardon, G., Solomon, N.M., and Rubin, G.M. (1994). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* *120*, 3473-3486.
- Mark, M., Rijli, F.M., and Chambon, P. (1997). Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatric research* *42*, 421-429.
- Markus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, E., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., Somogyi, K., Kronhamn, J., Hultmark, D., and Ando, I. (2009). Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 4805-4809.

- Marshall, H., Morrison, A., Studer, M., Popperl, H., and Krumlauf, R. (1996). Retinoids and Hox genes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *10*, 969-978.
- Martinez-Agosto, J.A., Mikkola, H.K., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2007). The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes & development* *21*, 3044-3060.
- Martinis, S.A., Plateau, P., Cavarelli, J., and Florentz, C. (1999). Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. *Mittelwihr, France, October 10-15, 1999. The EMBO journal* *18*, 4591-4596.
- Masucci, J.D., Miltenberger, R.J., and Hoffmann, F.M. (1990). Pattern-specific expression of the *Drosophila* decapentaplegic gene in imaginal disks is regulated by 3' cis-regulatory elements. *Genes & development* *4*, 2011-2023.
- Matsuoka, Y., Takagi, M., Ban, T., Miyazaki, M., Yamamoto, T., Kondo, Y., and Yoneda, Y. (1999). Identification and characterization of nuclear pore subcomplexes in mitotic extract of human somatic cells. *Biochemical and biophysical research communications* *254*, 417-423.
- Maurel-Zaffran, C., and Treisman, J.E. (2000). *pannier* acts upstream of *wingless* to direct dorsal eye disc development in *Drosophila*. *Development* *127*, 1007-1016.
- Maves, L., and Schubiger, G. (1998). A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between *wingless* and *decapentaplegic* signaling. *Development* *125*, 115-124.
- May-Simera, H.L., and Kelley, M.W. (2012). Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton. *Cilia* *1*, 7.
- Mayotte, N., Roy, D.C., Yao, J., Kroon, E., and Sauvageau, G. (2002). Oncogenic interaction between BCR-ABL and NUP98-HOXA9 demonstrated by the use of an in vitro purging culture system. *Blood* *100*, 4177-4184.
- McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1960). The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice. *Radiation Research* *13*, 115-125.

- McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A., and Gehring, W.J. (1984a). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* *37*, 403-408.
- McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A., and Gehring, W.J. (1984b). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* *308*, 428-433.
- McGlinn, E., Yekta, S., Mansfield, J.H., Soutschek, J., Bartel, D.P., and Tabin, C.J. (2009). In ovo application of antagomiRs indicates a role for miR-196 in patterning the chick axial skeleton through Hox gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 18610-18615.
- McMahon, K.A., Hiew, S.Y., Hadjur, S., Veiga-Fernandes, H., Menzel, U., Price, A.J., Kioussis, D., Williams, O., and Brady, H.J. (2007). Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell stem cell* *1*, 338-345.
- McNeill, H., Yang, C.H., Brodsky, M., Ungos, J., and Simon, M.A. (1997). mirror encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes & development* *11*, 1073-1082.
- Meister, M., and Lagueux, M. (2003). *Drosophila* blood cells. *Cellular microbiology* *5*, 573-580.
- Melki, J.R., Vincent, P.C., and Clark, S.J. (1999). Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer research* *59*, 3730-3740.
- Mendelson, A., and Frenette, P.S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature medicine* *20*, 833-846.
- Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Morata, G., Martinez, C., and Torres, M. (1999). Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* *402*, 425-429.
- Miller, D.T., and Cagan, R.L. (1998). Local induction of patterning and programmed cell death in the developing *Drosophila* retina. *Development* *125*, 2327-2335.
- Miller, M.E., Rosten, P., Lemieux, M.E., Lai, C., and Humphries, R.K. (2016). Meis1 Is Required for Adult Mouse Erythropoiesis, Megakaryopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Expansion. *PloS one* *11*, e0151584.



- Milne, T.A., Briggs, S.D., Brock, H.W., Martin, M.E., Gibbs, D., Allis, C.D., and Hess, J.L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Molecular cell* *10*, 1107-1117.
- Milton, C.C., Grusche, F.A., Degoutin, J.L., Yu, E., Dai, Q., Lai, E.C., and Harvey, K.F. (2014). The Hippo pathway regulates hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*. *Current biology : CB* *24*, 2673-2680.
- Min, C., Moore, N., Shearstone, J.R., Quayle, S.N., Huang, P., van Duzer, J.H., Jarpe, M.B., Jones, S.S., and Yang, M. (2017). Selective Inhibitors of Histone Deacetylases 1 and 2 Synergize with Azacitidine in Acute Myeloid Leukemia. *PloS one* *12*, e0169128.
- Minakhina, S., Tan, W., and Steward, R. (2011). JAK/STAT and the GATA factor Pannier control hemocyte maturation and differentiation in *Drosophila*. *Developmental biology* *352*, 308-316.
- Mirande, M. (2017). The Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex. *Sub-cellular biochemistry* *83*, 505-522.
- Mirantes, C., Passegue, E., and Pietras, E.M. (2014). Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Experimental cell research* *329*, 248-254.
- Mirouse, V., Dastugue, B., and Couderc, J.L. (2005). The *Drosophila* Toucan protein is a new mitotic microtubule-associated protein required for spindle microtubule stability. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* *10*, 37-46.
- Misquitta, L., and Paterson, B.M. (1999). Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 1451-1456.
- Mitelman, F., and Brandt, L. (1974). Chromosome banding patterns in acute myeloid leukaemia. *Scand J Haematol* *13*, 321-330.
- Mlodzik, M., Fjose, A., and Gehring, W.J. (1985). Isolation of caudal, a *Drosophila* homeo box-containing gene with maternal expression, whose transcripts form a concentration gradient at the pre-blastoderm stage. *The EMBO journal* *4*, 2961-2969.
- Mohan, M., Herz, H.M., Takahashi, Y.H., Lin, C., Lai, K.C., Zhang, Y., Washburn, M.P., Florens, L., and Shilatifard, A. (2010). Linking H3K79 trimethylation to Wnt signaling

- through a novel Dot1-containing complex (DotCom). *Genes & development* 24, 574-589.
- Mondal, B.C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C.J., Sinenko, S.A., Martinez-Agosto, J.A., and Banerjee, U. (2011). Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* 147, 1589-1600.
- Mondal, B.C., Shim, J., Evans, C.J., and Banerjee, U. (2014). Pvr expression regulators in equilibrium signal control and maintenance of *Drosophila* blood progenitors. *eLife* 3, e03626.
- Monteagudo, S., Cornelis, F.M.F., Aznar-Lopez, C., Yibmantasiri, P., Guns, L.A., Carmeliet, P., Cailotto, F., and Lories, R.J. (2017). DOT1L safeguards cartilage homeostasis and protects against osteoarthritis. *Nature communications* 8, 15889.
- Moore, M.A., and Owen, J.J. (1967). Chromosome marker studies in the irradiated chick embryo. *Nature* 215, 1081-1082.
- Morin-Poulard, I., Sharma, A., Louradour, I., Vanzo, N., Vincent, A., and Crozatier, M. (2016). Vascular control of the *Drosophila* haematopoietic microenvironment by Slit/Robo signalling. *Nature communications* 7, 11634.
- Moskow, J.J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I.O., and Buchberg, A.M. (1995). Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Molecular and cellular biology* 15, 5434-5443.
- Mukherjee, T., Kim, W.S., Mandal, L., and Banerjee, U. (2011). Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of *Drosophila* blood cells. *Science* 332, 1210-1213.
- Munier, A.I., Doucet, D., Perrodou, E., Zachary, D., Meister, M., Hoffmann, J.A., Janeway, C.A., Jr., and Lagueux, M. (2002). PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in *Drosophila* larvae. *EMBO reports* 3, 1195-1200.
- Muratoglu, S., Garratt, B., Hyman, K., Gajewski, K., Schulz, R.A., and Fossett, N. (2006). Regulation of *Drosophila* friend of GATA gene, u-shaped, during hematopoiesis: a direct role for serpent and lozenge. *Developmental biology* 296, 561-579.
- Murphy, R., Watkins, J.L., and Wenthe, S.R. (1996). GLE2, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* export factor RAE1, is required for

- nuclear pore complex structure and function. *Molecular biology of the cell* 7, 1921-1937.
- Nakahata, S., Saito, Y., Hamasaki, M., Hidaka, T., Arai, Y., Taki, T., Taniwaki, M., and Morishita, K. (2009). Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events leading to development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer* 48, 768-776.
- Nakamura, T. (2005). NUP98 fusion in human leukemia: dysregulation of the nuclear pore and homeodomain proteins. *International journal of hematology* 82, 21-27.
- Nakamura, T., Largaespada, D.A., Lee, M.P., Johnson, L.A., Ohyashiki, K., Toyama, K., Chen, S.J., Willman, C.L., Chen, I.M., Feinberg, A.P., *et al.* (1996). Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nature genetics* 12, 154-158.
- Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T., and Misawa, S. (1996). Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1911-1918.
- Nelson, K.N., Peiris, M.N., Meyer, A.N., Siari, A., and Donoghue, D.J. (2017). Receptor Tyrosine Kinases: Translocation Partners in Hematopoietic Disorders. *Trends in molecular medicine* 23, 59-79.
- Nelson, R.E., Fessler, L.I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D.R., Olson, P.F., Parker, C.G., and Fessler, J.H. (1994). Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *The EMBO journal* 13, 3438-3447.
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L.I., and Rosbash, M. (1997). The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Current biology : CB* 7, 767-775.
- Newsome, T.P., Asling, B., and Dickson, B.J. (2000). Analysis of *Drosophila* photoreceptor axon guidance in eye-specific mosaics. *Development* 127, 851-860.
- Nguyen, K.T., Holloway, M.P., and Altura, R.A. (2012). The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease. *International journal of biochemistry and molecular biology* 3, 137-151.

- Ni, J.Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L.P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H.S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., *et al.* (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nature methods* 8, 405-407.
- Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Oittinen, M., Popp, A., Kurppa, K., Lindfors, K., Maki, M., Kaikkonen, M.U., and Viiri, K. (2017). Polycomb Repressive Complex 2 Enacts Wnt Signaling in Intestinal Homeostasis and Contributes to the Instigation of Stemness in Diseases Entailing Epithelial Hyperplasia or Neoplasia. *Stem cells* 35, 445-457.
- Oka, M., Asally, M., Yasuda, Y., Ogawa, Y., Tachibana, T., and Yoneda, Y. (2010). The mobile FG nucleoporin Nup98 is a cofactor for Crm1-dependent protein export. *Molecular biology of the cell* 21, 1885-1896.
- Oka, M., Mura, S., Yamada, K., Sangel, P., Hirata, S., Maehara, K., Kawakami, K., Tachibana, T., Ohkawa, Y., Kimura, H., *et al.* (2016). Chromatin-prebound Crm1 recruits Nup98-HoxA9 fusion to induce aberrant expression of Hox cluster genes. *eLife* 5, e09540.
- Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature reviews Genetics* 1, 57-64.
- Osman, D., Gobert, V., Ponthan, F., Heidenreich, O., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2009). A *Drosophila* model identifies calpains as modulators of the human leukemogenic fusion protein AML1-ETO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12043-12048.
- Owusu-Ansah, E., and Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537-541.
- Oyallon, J., Vanzo, N., Krzemien, J., Morin-Poulard, I., Vincent, A., and Crozatier, M. (2016). Two Independent Functions of Collier/Early B Cell Factor in the Control of *Drosophila* Blood Cell Homeostasis. *PloS one* 11, e0148978.
- Pabst, T., Mueller, B.U., Zhang, P., Radomska, H.S., Narravula, S., Schnittger, S., Behre, G., Hiddemann, W., and Tenen, D.G. (2001). Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nature genetics* 27, 263-270.

- Pai, C.Y., Kuo, T.S., Jaw, T.J., Kurant, E., Chen, C.T., Bessarab, D.A., Salzberg, A., and Sun, Y.H. (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes & development* *12*, 435-446.
- Palis, J., and Yoder, M.C. (2001). Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Experimental hematology* *29*, 927-936.
- Pandey, U.B., and Nichols, C.D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews* *63*, 411-436.
- Park, S.J., Kim, S.H., Choi, H.S., Rhee, Y., and Lim, S.K. (2009). Fibroblast growth factor 2-induced cytoplasmic asparaginyl-tRNA synthetase promotes survival of osteoblasts by regulating anti-apoptotic PI3K/Akt signaling. *Bone* *45*, 994-1003.
- Parsons, B., and Foley, E. (2013). The *Drosophila* platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor-receptor related (Pvr) protein ligands Pvf2 and Pvf3 control hemocyte viability and invasive migration. *The Journal of biological chemistry* *288*, 20173-20183.
- Parsons, B., and Foley, E. (2016). Cellular immune defenses of *Drosophila melanogaster*. *Developmental and comparative immunology* *58*, 95-101.
- Pascual-Garcia, P., Jeong, J., and Capelson, M. (2014). Nucleoporin Nup98 associates with Trx/MLL and NSL histone-modifying complexes and regulates Hox gene expression. *Cell reports* *9*, 433-442.
- Peifer, M., and Wieschaus, E. (1990). Mutations in the *Drosophila* gene extradenticle affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes & development* *4*, 1209-1223.
- Pennetier, D., Oyallon, J., Morin-Poulard, I., Dejean, S., Vincent, A., and Crozatier, M. (2012). Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 3389-3394.
- Pereira, P.S., Pinho, S., Johnson, K., Couso, J.P., and Casares, F. (2006). A 3' cis-regulatory region controls wingless expression in the *Drosophila* eye and leg primordia.

Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 235, 225-234.

- Perez-Caro, M., Cobaleda, C., Gonzalez-Herrero, I., Vicente-Duenas, C., Bermejo-Rodriguez, C., Sanchez-Beato, M., Orfao, A., Pintado, B., Flores, T., Sanchez-Martin, M., *et al.* (2009). Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment. *The EMBO journal* 28, 8-20.
- Perkins, A.C., and Cory, S. (1993). Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *The EMBO journal* 12, 3835-3846.
- Perkins, L.A., Holderbaum, L., Tao, R., Hu, Y., Sopko, R., McCall, K., Yang-Zhou, D., Flockhart, I., Binari, R., Shim, H.S., *et al.* (2015). The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation. *Genetics* 201, 843-852.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Riley, K.M., Hodgson, J., Schweisguth, F., Hirose, S., Jaynes, J.B., Brock, H.W., and Mazo, A. (2006). Transcription of bxd noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. *Cell* 127, 1209-1221.
- Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K.H., Xiao, J., Garrity, P.A., and Zipursky, S.L. (1997). The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in Drosophila eye development. *Cell* 91, 881-891.
- Pignoni, F., and Zipursky, S.L. (1997). Induction of Drosophila eye development by decapentaplegic. *Development* 124, 271-278.
- Pineault, N., Helgason, C.D., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (2002). Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Experimental hematology* 30, 49-57.
- Pownall, M.E., Tucker, A.S., Slack, J.M., and Isaacs, H.V. (1996). eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in Xenopus. *Development* 122, 3881-3892.
- Prince, F., Katsuyama, T., Oshima, Y., Plaza, S., Resendez-Perez, D., Berry, M., Kurata, S., and Gehring, W.J. (2008). The YPWM motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery. *Development* 135, 1669-1679.

- Pritchard, C.E., Fornerod, M., Kasper, L.H., and van Deursen, J.M. (1999). RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *The Journal of cell biology* *145*, 237-254.
- Qi, J., Dong, Z., Liu, J., and Zhang, J.T. (2014). EIF3i promotes colon oncogenesis by regulating COX-2 protein synthesis and beta-catenin activation. *Oncogene* *33*, 4156-4163.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W.J. (1994). Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* *265*, 785-789.
- Ratheesh, A., Belyaeva, V., and Siekhaus, D.E. (2015). *Drosophila* immune cell migration and adhesion during embryonic development and larval immune responses. *Current opinion in cell biology* *36*, 71-79.
- Rauskolb, C., and Wieschaus, E. (1994). Coordinate regulation of downstream genes by extradenticle and the homeotic selector proteins. *The EMBO journal* *13*, 3561-3569.
- Rebay, I., Chen, F., Hsiao, F., Kolodziej, P.A., Kuang, B.H., Lavery, T., Suh, C., Voas, M., Williams, A., and Rubin, G.M. (2000). A genetic screen for novel components of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway that interact with the yan gene of *Drosophila* identifies split ends, a new RNA recognition motif-containing protein. *Genetics* *154*, 695-712.
- Rebel, V.I., Kung, A.L., Tanner, E.A., Yang, H., Bronson, R.T., and Livingston, D.M. (2002). Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 14789-14794.
- Rehorn, K.P., Thelen, H., Michelson, A.M., and Reuter, R. (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* *122*, 4023-4031.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome research* *11*, 1114-1125.
- Rhinn, M., and Dolle, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development* *139*, 843-858.

- Rieckhof, G.E., Casares, F., Ryoo, H.D., Abu-Shaar, M., and Mann, R.S. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* *91*, 171-183.
- Rinn, J.L., and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual review of biochemistry* *81*, 145-166.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Bruggmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., *et al.* (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* *129*, 1311-1323.
- Rio-Machin, A., Gomez-Lopez, G., Maiques-Diaz, A., Alvarez, S., Calasanz, M.J., Fitzgibbon, J., and Cigudosa, J.C. (2016). HDAC Inhibitors As Novel Targeted Therapies for NUP98-HOXA9 AML Patients. *Blood* *128*, 2685.
- Rio-Machin, A., Gomez-Lopez, G., Munoz, J., Garcia-Martinez, F., Maiques-Diaz, A., Alvarez, S., Salgado, R.N., Shrestha, M., Torres-Ruiz, R., Haferlach, C., *et al.* (2017). The molecular pathogenesis of the NUP98-HOXA9 fusion protein in acute myeloid leukemia. *Leukemia* *31*, 2000-2005.
- Rizki, T.M., and Rizki, R.M. (1984). The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. *Insect Ultrastructure* *2*, 579-604.
- Rosin, D., Schejter, E., Volk, T., and Shilo, B.Z. (2004). Apical accumulation of the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor ligands provides a mechanism for triggering localized actin polymerization. *Development* *131*, 1939-1948.
- Rotstein, B., and Paululat, A. (2016). On the Morphology of the *Drosophila* Heart. *Journal of cardiovascular development and disease* *3*.
- Royet, J., and Finkelstein, R. (1997). Establishing primordia in the *Drosophila* eye-antennal imaginal disc: the roles of decapentaplegic, wingless and hedgehog. *Development* *124*, 4793-4800.
- Rubin, G.M. (1991). Signal transduction and the fate of the R7 photoreceptor in *Drosophila*. *Trends in genetics* : TIG *7*, 372-377.
- Rux, D.R., and Wellik, D.M. (2017). Hox genes in the adult skeleton: Novel functions beyond embryonic development. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists *246*, 310-317.



- Salinas, P.C. (2007). Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical Wnt pathway. *Trends in cell biology* *17*, 333-342.
- Salsi, V., Fantini, S., and Zappavigna, V. (2016). NUP98 fusion oncoproteins interact with the APC/C(Cdc20) as a pseudosubstrate and prevent mitotic checkpoint complex binding. *Cell cycle* *15*, 2275-2287.
- Salsi, V., Ferrari, S., Gorello, P., Fantini, S., Chiavolelli, F., Mecucci, C., and Zappavigna, V. (2014). NUP98 fusion oncoproteins promote aneuploidy by attenuating the mitotic spindle checkpoint. *Cancer research* *74*, 1079-1090.
- Sapiro, A.L., Ihry, R.J., Buhr, D.L., Konieczko, K.M., Ives, S.M., Engstrom, A.K., Wleklinski, N.P., Kopish, K.J., and Bashirullah, A. (2013). Rapid recombination mapping for high-throughput genetic screens in *Drosophila*. *G3* *3*, 2313-2319.
- Sato, A., and Tomlinson, A. (2007). Dorsal-ventral midline signaling in the developing *Drosophila* eye. *Development* *134*, 659-667.
- Sauvageau, G., Lansdorp, P.M., Eaves, C.J., Hogge, D.E., Dragowska, W.H., Reid, D.S., Largman, C., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 12223-12227.
- Schmid, M.R., Anderl, I., Vesala, L., Vanha-aho, L.M., Deng, X.J., Ramet, M., and Hultmark, D. (2014). Control of *Drosophila* blood cell activation via Toll signaling in the fat body. *PloS one* *9*, e102568.
- Schneeberger, K. (2014). Using next-generation sequencing to isolate mutant genes from forward genetic screens. *Nature reviews Genetics* *15*, 662-676.
- Schuettengruber, B., and Cavalli, G. (2009). Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* *136*, 3531-3542.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* *128*, 735-745.
- Schuettengruber, B., Martinez, A.M., Iovino, N., and Cavalli, G. (2011). Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nature reviews Molecular cell biology* *12*, 799-814.

- Seifert, A., Werheid, D.F., Knapp, S.M., and Tobiasch, E. (2015). Role of Hox genes in stem cell differentiation. *World journal of stem cells* 7, 583-595.
- Seimiya, M., and Gehring, W.J. (2000). The *Drosophila* homeobox gene *optix* is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development* 127, 1879-1886.
- Seto, E., and Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6, a018713.
- Shanower, G.A., Muller, M., Blanton, J.L., Honti, V., Gyurkovics, H., and Schedl, P. (2005). Characterization of the *grappa* gene, the *Drosophila* histone H3 lysine 79 methyltransferase. *Genetics* 169, 173-184.
- Shen, W.F., Montgomery, J.C., Rozenfeld, S., Moskow, J.J., Lawrence, H.J., Buchberg, A.M., and Largman, C. (1997). AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Molecular and cellular biology* 17, 6448-6458.
- Shen, W.F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Kom ves, L.G., Lawrence, H.J., and Largman, C. (1999). HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Molecular and cellular biology* 19, 3051-3061.
- Shestakova, E.A., Boutin, M., Bourassa, S., Bonneil, E., and Bijl, J.J. (2017). [Identification of proteins associated with transcription factors HOXA9 and E2A-PBX1 by tandem affinity purification]. *Molekuliarnaia biologiiia* 51, 490-501.
- Shim, J., Mukherjee, T., and Banerjee, U. (2012). Direct sensing of systemic and nutritional signals by haematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Nature cell biology* 14, 394-400.
- Shim, J., Mukherjee, T., Mondal, B.C., Liu, T., Young, G.C., Wijewarnasuriya, D.P., and Banerjee, U. (2013). Olfactory control of blood progenitor maintenance. *Cell* 155, 1141-1153.
- Shima, Y., Yumoto, M., Katsumoto, T., and Kitabayashi, I. (2017). MLL is essential for NUP98-HOXA9-induced leukemia. *Leukemia* 31, 2200-2210.
- Shrestha, R., and Gateff, E. (1982). Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and haemolymph of *Drosophila melanogaster*. *Dev Growth Differ* 24, 65-82.
- Simon, M.A. (1994). Signal transduction during the development of the *Drosophila* R7 photoreceptor. *Developmental biology* 166, 431-442.

- Sinenko, S.A., Hung, T., Moroz, T., Tran, Q.M., Sidhu, S., Cheney, M.D., Speck, N.A., and Banerjee, U. (2010). Genetic manipulation of AML1-ETO-induced expansion of hematopoietic precursors in a *Drosophila* model. *Blood* *116*, 4612-4620.
- Sinenko, S.A., Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., and Banerjee, U. (2009). Dual role of wingless signaling in stem-like hematopoietic precursor maintenance in *Drosophila*. *Developmental cell* *16*, 756-763.
- Sinenko, S.A., Shim, J., and Banerjee, U. (2011). Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*. *EMBO reports* *13*, 83-89.
- Singh, A., Lim, J., and Choi, K.W. (2005). Dorso-ventral boundary is required for organizing growth and planar polarity in the *Drosophila* eye. *Planar Cell Polarization during Development: Advances in Developmental Biology and Biochemistry Elsevier Science and Technology Books*, 59-91.
- Skvarova Kramarzova, K., Fiser, K., Mejstrikova, E., Rejlova, K., Zaliova, M., Fornerod, M., Drabkin, H.A., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Stary, J., Trka, J., *et al.* (2014). Homeobox gene expression in acute myeloid leukemia is linked to typical underlying molecular aberrations. *Journal of hematology & oncology* *7*, 94.
- Small, C., Ramroop, J., Otazo, M., Huang, L.H., Saleque, S., and Govind, S. (2014). An unexpected link between notch signaling and ROS in restricting the differentiation of hematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Genetics* *197*, 471-483.
- Small, K.M., and Potter, S.S. (1993). Homeotic transformations and limb defects in Hox A11 mutant mice. *Genes & development* *7*, 2318-2328.
- Smith-Berdan, S., Nguyen, A., Hassanein, D., Zimmer, M., Ugarte, F., Ciriza, J., Li, D., Garcia-Ojeda, M.E., Hinck, L., and Forsberg, E.C. (2011). Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell stem cell* *8*, 72-83.
- Somervaille, T.C., and Cleary, M.L. (2006). Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer cell* *10*, 257-268.
- Sorrentino, R.P., Melk, J.P., and Govind, S. (2004). Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics* *166*, 1343-1356.

- Spahn, P., Huelsmann, S., Rehorn, K.P., Mischke, S., Mayer, M., Casali, A., and Reuter, R. (2014). Multiple regulatory safeguards confine the expression of the GATA factor *Serpent* to the hemocyte primordium within the *Drosophila* mesoderm. *Developmental biology* *386*, 272-279.
- Spradling, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E.J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S., and Rubin, G.M. (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* *153*, 135-177.
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature reviews Genetics* *3*, 176-188.
- Staal, F.J., Famili, F., Garcia Perez, L., and Pike-Overzet, K. (2016). Aberrant Wnt Signaling in Leukemia. *Cancers* *8*.
- Stankunas, K., Berger, J., Ruse, C., Sinclair, D.A., Randazzo, F., and Brock, H.W. (1998). The enhancer of polycomb gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein conserved in yeast and mammals. *Development* *125*, 4055-4066.
- Statistiques du National Cancer Institute (2018). Acute Myeloid Leukemia - SEER Stat Facts.
- Stefani, G., and Slack, F.J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nature reviews Molecular cell biology* *9*, 219-230.
- Stofanko, M., Kwon, S.Y., and Badenhorst, P. (2010). Lineage tracing of lamellocytes demonstrates *Drosophila* macrophage plasticity. *PloS one* *5*, e14051.
- Su, M.A., Wisotzkey, R.G., and Newfeld, S.J. (2001). A screen for modifiers of decapentaplegic mutant phenotypes identifies *lilliputian*, the only member of the *Fragile-X/Burkitt's Lymphoma* family of transcription factors in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *157*, 717-725.
- Subramanian, V., Meyer, B.I., and Gruss, P. (1995). Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of *Hox* genes. *Cell* *83*, 641-653.
- Sugimura, R., He, X.C., Venkatraman, A., Arai, F., Box, A., Semerad, C., Haug, J.S., Peng, L., Zhong, X.B., Suda, T., *et al.* (2012). Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell* *150*, 351-365.

- Swerdlow, S.H., Campo, E., and Harris, N.L., et al., (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press *Fourth Edition*.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal* *17*, 5497-5508.
- Takeda, A., Goolsby, C., and Yaseen, N.R. (2006). NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells. *Cancer research* *66*, 6628-6637.
- Takeda, A., Sarma, N.J., Abdul-Nabi, A.M., and Yaseen, N.R. (2010). Inhibition of CRM1-mediated nuclear export of transcription factors by leukemogenic NUP98 fusion proteins. *The Journal of biological chemistry* *285*, 16248-16257.
- Takeda, A., and Yaseen, N.R. (2014). Nucleoporins and nucleocytoplasmic transport in hematologic malignancies. *Seminars in cancer biology* *27*, 3-10.
- Takeuchi, J., Ohshima, T., and Amaki, I. (1981). Cytogenetic studies in adult acute leukemias. *Cancer genetics and cytogenetics* *4*, 293-302.
- Tan, K.L., Goh, S.C., and Minakhina, S. (2012). Genetic screen for regulators of lymph gland homeostasis and hemocyte maturation in *Drosophila*. *G3* *2*, 393-405.
- Tennessen, J.M., and Thummel, C.S. (2011). Coordinating growth and maturation - insights from *Drosophila*. *Current biology : CB* *21*, R750-757.
- Tepass, U., Fessler, L.I., Aziz, A., and Hartenstein, V. (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* *120*, 1829-1837.
- Terriente-Felix, A., Li, J., Collins, S., Mulligan, A., Reekie, I., Bernard, F., Krejci, A., and Bray, S. (2013). Notch cooperates with Lozenge/Runx to lock haemocytes into a differentiation programme. *Development* *140*, 926-937.
- Thaker, H.M., and Kankel, D.R. (1992). Mosaic analysis gives an estimate of the extent of genomic involvement in the development of the visual system in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *131*, 883-894.

- Theisen, H., Haerry, T.E., O'Connor, M.B., and Marsh, J.L. (1996). Developmental territories created by mutual antagonism between Wingless and Decapentaplegic. *Development* *122*, 3939-3948.
- Therrien, M., Morrison, D.K., Wong, A.M., and Rubin, G.M. (2000). A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics* *156*, 1231-1242.
- Thomas, B.J., Gunning, D.A., Cho, J., and Zipursky, L. (1994). Cell cycle progression in the developing *Drosophila* eye: roughex encodes a novel protein required for the establishment of G1. *Cell* *77*, 1003-1014.
- Thomas, B.J., and Wassarman, D.A. (1999). A fly's eye view of biology. *Trends in genetics* : *TIG* *15*, 184-190.
- Thorsteinsdottir, U., Kroon, E., Jerome, L., Blasi, F., and Sauvageau, G. (2001). Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Molecular and cellular biology* *21*, 224-234.
- Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H.J., Humphries, K., and Sauvageau, G. (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* *99*, 121-129.
- Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* *14*, 213-222.
- Tokusumi, T., Tokusumi, Y., Brahier, M.S., Lam, V., Stoller-Conrad, J.R., Kroeger, P.T., and Schulz, R.A. (2017a). Screening and Analysis of Janelia FlyLight Project Enhancer-Gal4 Strains Identifies Multiple Gene Enhancers Active During Hematopoiesis in Normal and Wasp-Challenged *Drosophila* Larvae. *G3* *7*, 437-448.
- Tokusumi, T., Tokusumi, Y., Hopkins, D.W., and Schulz, R.A. (2015). Bag of Marbles controls the size and organization of the *Drosophila* hematopoietic niche through interactions with the Insulin-like growth factor pathway and Retinoblastoma-family protein. *Development* *142*, 2261-2267.
- Tokusumi, T., Tokusumi, Y., Hopkins, D.W., Shoue, D.A., Corona, L., and Schulz, R.A. (2011). Germ line differentiation factor Bag of Marbles is a regulator of hematopoietic progenitor maintenance during *Drosophila* hematopoiesis. *Development* *138*, 3879-3884.

- Tokusumi, Y., Tokusumi, T., and Schulz, R.A. (2017b). The nociception genes *painless* and *Piezo* are required for the cellular immune response of *Drosophila* larvae to wasp parasitization. *Biochemical and biophysical research communications* 486, 893-897.
- Tokusumi, Y., Tokusumi, T., Shoue, D.A., and Schulz, R.A. (2012). Gene regulatory networks controlling hematopoietic progenitor niche cell production and differentiation in the *Drosophila* lymph gland. *PloS one* 7, e41604.
- Toyota, M., Kopecky, K.J., Toyota, M.O., Jair, K.W., Willman, C.L., and Issa, J.P. (2001). Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 97, 2823-2829.
- Treisman, J.E., and Rubin, G.M. (1995). *wingless* inhibits morphogenetic furrow movement in the *Drosophila* eye disc. *Development* 121, 3519-3527.
- Truitt, M.L., and Ruggero, D. (2016). New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nature reviews Cancer* 16, 288-304.
- Tsai, Y.C., Yao, J.G., Chen, P.H., Posakony, J.W., Barolo, S., Kim, J., and Sun, Y.H. (2007). Upd/Jak/STAT signaling represses *wg* transcription to allow initiation of morphogenetic furrow in *Drosophila* eye development. *Developmental biology* 306, 760-771.
- Vicente-Duenas, C., Hauer, J., Ruiz-Roca, L., Ingenhag, D., Rodriguez-Meira, A., Auer, F., Borkhardt, A., and Sanchez-Garcia, I. (2015). Tumoral stem cell reprogramming as a driver of cancer: Theory, biological models, implications in cancer therapy. *Seminars in cancer biology* 32, 3-9.
- Wada, T., Kikuchi, J., Nishimura, N., Shimizu, R., Kitamura, T., and Furukawa, Y. (2009). Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. *The Journal of biological chemistry* 284, 30673-30683.
- Waltzer, L., Bataille, L., Peyrefitte, S., and Haenlin, M. (2002). Two isoforms of *Serpent* containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* haematopoiesis. *The EMBO journal* 21, 5477-5486.
- Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataille, L., and Haenlin, M. (2003). Cooperation between the GATA and RUNX factors *Serpent* and *Lozenge* during *Drosophila* hematopoiesis. *The EMBO journal* 22, 6516-6525.

- Waltzer, L., Gobert, V., Osman, D., and Haenlin, M. (2010). Transcription factor interplay during *Drosophila* haematopoiesis. *The International journal of developmental biology* 54, 1107-1115.
- Wang, G.G., Pasillas, M.P., and Kamps, M.P. (2006). Persistent transactivation by meis1 replaces hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of meis1-pbx and hox-pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Molecular and cellular biology* 26, 3902-3916.
- Wang, K.C., Yang, Y.W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B.R., Protacio, A., Flynn, R.A., Gupta, R.A., *et al.* (2011). A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* 472, 120-124.
- Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International journal of pharmaceutics* 289, 1-30.
- Wang, Y., Krivtsov, A.V., Sinha, A.U., North, T.E., Goessling, W., Feng, Z., Zon, L.I., and Armstrong, S.A. (2010). The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science* 327, 1650-1653.
- Wangler, M.F., Yamamoto, S., and Bellen, H.J. (2015). Fruit flies in biomedical research. *Genetics* 199, 639-653.
- Wellik, D.M., Hawkes, P.J., and Capecchi, M.R. (2002). Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes & development* 16, 1423-1432.
- Welman, A., Serrels, A., Brunton, V.G., Ditzel, M., and Frame, M.C. (2010). Two-color photoactivatable probe for selective tracking of proteins and cells. *The Journal of biological chemistry* 285, 11607-11616.
- Wiersdorff, V., Lecuit, T., Cohen, S.M., and Mlodzik, M. (1996). Mad acts downstream of Dpp receptors, revealing a differential requirement for dpp signaling in initiation and propagation of morphogenesis in the *Drosophila* eye. *Development* 122, 2153-2162.
- Williams, M.J. (2007). *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *Journal of immunology* 178, 4711-4716.
- Wilting, R.H., Yanover, E., Heideman, M.R., Jacobs, H., Horner, J., van der Torre, J., DePinho, R.A., and Dannenberg, J.H. (2010). Overlapping functions of Hdac1 and Hdac2 in cell cycle regulation and haematopoiesis. *The EMBO journal* 29, 2586-2597.



- Wolff, T., and Ready, D.F. (1991). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* *113*, 841-850.
- Wong, R.W. (2010). Interaction between Rae1 and cohesin subunit SMC1 is required for proper spindle formation. *Cell cycle* *9*, 198-200.
- Wong, R.W., Blobel, G., and Coutavas, E. (2006). Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 19783-19787.
- Xu, F., Xu, C.Z., Gu, J., Liu, X., Liu, R., Huang, E., Yuan, Y., Zhao, G., Jiang, J., Xu, C., *et al.* (2016a). Eukaryotic translation initiation factor 3B accelerates the progression of esophageal squamous cell carcinoma by activating beta-catenin signaling pathway. *Oncotarget* *7*, 43401-43411.
- Xu, H., Valerio, D.G., Eisold, M.E., Sinha, A., Koche, R.P., Hu, W., Chen, C.W., Chu, S.H., Brien, G.L., Park, C.Y., *et al.* (2016b). NUP98 Fusion Proteins Interact with the NSL and MLL1 Complexes to Drive Leukemogenesis. *Cancer cell* *30*, 863-878.
- Xu, S., and Powers, M.A. (2010). Nup98-homeodomain fusions interact with endogenous Nup98 during interphase and localize to kinetochores and chromosome arms during mitosis. *Molecular biology of the cell* *21*, 1585-1596.
- Xu, T., Rebay, I., Fleming, R.J., Scottgale, T.N., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The Notch locus and the genetic circuitry involved in early *Drosophila* neurogenesis. *Genes & development* *4*, 464-475.
- Xu, T., and Rubin, G.M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* *117*, 1223-1237.
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., and Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* *121*, 1053-1063.
- Yallowitz, A.R., Hrycaj, S.M., Short, K.M., Smyth, I.M., and Wellik, D.M. (2011). Hox10 genes function in kidney development in the differentiation and integration of the cortical stroma. *PloS one* *6*, e23410.

- Yamamoto, J.F., and Goodman, M.T. (2008). Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer causes & control* : CCC *19*, 379-390.
- Yamamoto, M., Takai, D., Yamamoto, F., and Yamamoto, F. (2003). Comprehensive expression profiling of highly homologous 39 hox genes in 26 different human adult tissues by the modified systematic multiplex RT-pCR method reveals tissue-specific expression pattern that suggests an important role of chromosomal structure in the regulation of hox gene expression in adult tissues. *Gene expression* *11*, 199-210.
- Yang, H., Kronhamn, J., Ekstrom, J.O., Korkut, G.G., and Hultmark, D. (2015). JAK/STAT signaling in *Drosophila* muscles controls the cellular immune response against parasitoid infection. *EMBO reports* *16*, 1664-1672.
- Yang, Y., and Mlodzik, M. (2015). Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind (Wnt). *Annual review of cell and developmental biology* *31*, 623-646.
- Yeh, J.R., Munson, K.M., Elagib, K.E., Goldfarb, A.N., Sweetser, D.A., and Peterson, R.T. (2009). Discovering chemical modifiers of oncogene-regulated hematopoietic differentiation. *Nature chemical biology* *5*, 236-243.
- Yeung, J., Esposito, M.T., Gandillet, A., Zeisig, B.B., Griessinger, E., Bonnet, D., and So, C.W. (2010). beta-Catenin mediates the establishment and drug resistance of MLL leukemic stem cells. *Cancer cell* *18*, 606-618.
- Yin, Y., Long, J., Sun, Y., Li, H., Jiang, E., Zeng, C., and Zhu, W. (2018). The function and clinical significance of eIF3 in cancer. *Gene* *673*, 130-133.
- Young, T., and Deschamps, J. (2009). Hox, Cdx, and anteroposterior patterning in the mouse embryo. *Current topics in developmental biology* *88*, 235-255.
- Yu, S., Luo, F., and Jin, L.H. (2018). The *Drosophila* lymph gland is an ideal model for studying hematopoiesis. *Developmental and comparative immunology* *83*, 60-69.
- Yum, M.K., Kang, J.S., Lee, A.E., Jo, Y.W., Seo, J.Y., Kim, H.A., Kim, Y.Y., Seong, J., Lee, E.B., Kim, J.H., *et al.* (2016). AIMP2 Controls Intestinal Stem Cell Compartments and Tumorigenesis by Modulating Wnt/beta-Catenin Signaling. *Cancer research* *76*, 4559-4568.

- Zettervall, C.J., Anderl, I., Williams, M.J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I., and Hultmark, D. (2004). A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 14192-14197.
- Zhan, T., Rindtorff, N., and Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene* *36*, 1461-1473.
- Zhang, C.U., and Cadigan, K.M. (2017). The matrix protein Tiggrin regulates plasmacyte maturation in *Drosophila* larva. *Development* *144*, 2415-2427.
- Zhang, J., Yue, J., and Wu, X. (2017). Spectraplakins family proteins - cytoskeletal crosslinkers with versatile roles. *Journal of cell science* *130*, 2447-2457.
- Zolotukhin, A.S., and Felber, B.K. (1999). Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *Journal of virology* *73*, 120-127.
- Zon, L.I. (2008). Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature* *453*, 306-313.



