

Université de Montréal

**Les oncogènes *NUP98-PHF23* et *NUP98-HOXD13* confèrent un potentiel aberrant
d'auto-renouvellement aux progéniteurs thymiques**

par Magalie Tardif

Programme de biologie moléculaire

Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC)

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc) en biologie moléculaire, option générale

Septembre 2015

© Magalie Tardif, 2015

Résumé

L'initiation de la leucémogénèse dans la leucémie aigue lymphoblastique (LAL)-T résulte de l'activation aberrante de facteurs de transcription de la lignée lymphocytaire T. Nous démontrons que les gènes de fusion *NUP98-PHF23* (*NP23*) et *NUP98-HOXD13* (*NHD13*) reprogramment les thymocytes normaux en cellules souches pré-leucémiques (CS-préL) possédant un potentiel aberrant d'auto-renouvellement. Basé sur des essais de clonalité performés sur des thymocytes transplantés en série, nous avons découvert que cette population est hiérarchisée similairement aux cellules souches hématopoïétiques normales. Ces CS-préL dévoilent un enrichissement du compartiment de précurseurs thymiques immatures KIT^+ où les deux oncogènes, *NP23* et *NHD13*, activent des gènes impliqués dans l'auto-renouvellement, incluant *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Lyl1* et *Hhex*. De plus, l'activité d'auto-renouvellement est abrogée par les ARN interférents contre *Lyl1* et *Hhex*, indiquant leur implication fonctionnelle en aval de *NP23* et *NHD13*. Puisque ces gènes sont aussi activés en aval de trois autres oncogènes dans la LAL-T, *SCL/TAL1*, *LMO1* et *LMO2*, nous concluons que les niveaux d'activation de *Lyl1* et *Hhex* fixent le seuil de reprogrammation des thymocytes normaux en CS-préL. Malgré l'efficacité des traitements de chimiothérapie actuels à diminuer la masse tumorale, les CS-préL sont épargnées, pouvant mener à des rechutes. Nos résultats répondent à ce besoin et proposent de nouvelles avenues permettant de cibler les CS-préL du compartiment de thymocytes immatures dans la LAL-T.

mots clés : leucémie aigue lymphoblastique-T (LAL-T), thymocytes, cellule souche pré-leucémique (CS-préL), *NUP98-PHF23* (*NP23*), *NUP98-HOXD13* (*NHD13*), auto-renouvellement, reprogrammation, souris transgéniques.

Abstract

Early events in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) are regulated mostly by the activation of oncogenic transcription factors in the T lineage. We show that among those, two fusion genes, *NUP98-PHF23* (*NP23*) and *NUP98-HOXD13* (*NHD13*), reprogram normal thymocytes into pre-leukemic stem cells (pre-LSCs) with sustained self-renewal activity. By clonal analysis of serially transplanted thymocytes, we found that this population is organized in a hierarchy much like normal hematopoietic stem cells. These pre-LSCs were enriched in a subset of KIT^+ immature thymocytes in which both *NP23* and *NHD13* activated a stem cell signature that includes *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Lyl1* and *Hhex*. Moreover, self-renewal activity was abrogated by RNA interference against *Lyl1* or *Hhex*, indicating their functional importance downstream of *NP23* or *NHD13*. Since these two genes are also required downstream of three other T-ALL oncogenes, *SCL/TAL1*, *LMO1* and *LMO2*, we conclude that the levels of *Lyl1* and *Hhex* set the threshold for thymocyte reprogramming into pre-LSCs. In light of the evidence that pre-LSCs escape chemotherapy to cause relapse, our results provide new avenues for targeting pre-LSCs in the immature subgroup of T-ALL.

keywords: T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), thymocytes, preleukemic stem cells (pre-LSCs), *NUP98-PHF23* (*NP23*), *NUP98-HOXD13* (*NHD13*), self-renewal, reprogramming, transgenic mice models.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Dédicace	xi
Introduction.....	1
CHAPITRE 1. Hématopoïèse	1
1.1 Évènements précoces de l'hématopoïèse	1
1.1.1 Les essais de transplantions : évaluer l'activité d'auto-renouvellement.....	4
1.2 Thymopoïèse	4
1.2.1 Développement des thymocytes normaux	5
1.2.2 Réarrangement du <i>Tcr</i> par recombinaison V(D)J.....	10
CHAPITRE 2. Leucémogénèse.....	12
2.1 Leucémie aigue lymphoblastique-T	12
2.2 Cellules souches cancéreuses (CSC).....	12
2.3 Altérations génétiques dans la LAL-T	14
2.4. Cluster <i>HOXA</i>	16
2.4.1 Protéines de fusion NUP98 en amont du groupe <i>HOXA</i>	17
Projet de recherche	20
1. Raisonnement	20
2. Hypothèse	21
3. Objectifs.....	22
Manuscrit.....	23
Déclaration de l'étudiant concernant l'article	23
Thymocyte self-renewal induced by NUP98 fusion oncogenes.....	24
Abstract	25

Introduction	26
Results	28
Discussion	42
Materials and methods	45
References	49
Supplementary figures and tables	58
Discussion	61
1. Vue globale du projet	61
2. Thymocytes renouvelables en pré-leucémie	63
2.1 Essais de transplantation : qu'est-ce que nous dit la biologie normale ?	64
3. Identification du compartiment DN2 comme cible de reprogrammation par les oncogènes de fusion <i>NP23</i> et <i>NHD13</i>	66
3.1 Hétérogénéité des collaborateurs oncogéniques	68
4. Une signature d'auto-renouvellement commune pour les oncogènes en LAL-T	70
4.1 Une même thérapie pour tous les oncogènes en LAL-T?	71
Bibliographie	75

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Différenciation hématopoïétique chez l'Homme.....	2
Encadré 1: Hématopoïèse du modèle murin.....	8
Figure 2. Développement lymphocytaire T normal.....	8
Figure 3. Organisation des gènes <i>Hox</i> chez le mammifère.....	16
Figure 4. Structure des protéines de fusion NUP98.	19

Manuscrit

Figure 5. <i>NP23</i> and <i>NHD13</i> oncogenes confer an aberrant self-renewal potential to pre-leukemic thymocytes.....	30
Figure 6. <i>NUP98-PHF23^{tg}</i> and <i>NUP98-HOXD13^{tg}</i> pre-LSCs exhibit short term and long term repopulating activities.....	34
Figure 7. Coordinate control of <i>Hoxa9</i> , <i>Lyl1</i> and <i>Hhex</i> expression by <i>NP23</i> and <i>NHD13</i> in DN2 thymocytes.....	36
Figure 8. Pre-LSCs induced by <i>NUP98</i> fusion genes express <i>KIT</i> and are sensitive to imatinib as well as dexamethasone.....	40

Figures supplémentaires

Figure S1. *NUP98-PHF23* (*NP23*) and *NUP98-HOXD13* (*NHD13*) fusion genes induce acute leukemias in mice.....58

Figure S2. Expansion of *NUP98-PHF23*^{tg} and *NUP98-HOXD13*^{tg} DN2 population after transplantation of purified cells.....59

Figure S3. Fine-tuned identities of immature DN populations in Wt, *NUP98-PHF23*^{tg} and *NUP98-HOXD13*^{tg} mice.....59

Liste des tableaux

Manuscrit

Tableaux supplémentaires

Table SI. Sequence analysis of the D1-J1S4 rearrangement from purified preleukemic *NUP98-PHF23*^{tg} thymocytes after primary and tertiary transplantations.....60

Table SII. Sequences of oligonucleotide primers used for *TCRb* gene rearrangements60

Liste des abréviations

CD	« cluster of differentiation »
CMP	cellules myéloïdes progénitrices
CLP	cellules lymphoïdes progénitrices
CS	cellules souches
CSC	cellules souches cancéreuses
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CS-préL	cellules souches pré-leucémiques
D	« diversity »
DN	double-négatif
DP	double-positif
ETP	« early thymocyte progenitor »
HD	homéodomaine
Hhex	« hematopoietically expressed homeobox »
HOX	«homeobox »
IL	interleukine
IL-7R	récepteur de l'interleukin-7
J	« joining »
LAL-T	leucémie aigue lymphoblastique-T
LMA	leucémie myéloïde aigue
LMO	« lim-only »
Lyl1	« lymphoblastic leukemia-derived sequence 1 »
MPP	progéniteurs multipotents

NHD13	NUP98-HOXD13
NP23	NUP98-PHF23
NUP98	complexe de pore nucléaire 98
PHF23	« plant homeodomain finger protein 23 »
SCF	« stem cell factor »
SCFR	récepteur du « stem cell factor »
SCL	« stem cell leukemia »
SP	simple-positif
TCR	récepteur de cellule T
TLX	« T-cell leukemia homeobox »
V	« variable »

Dédicace

Je remercie d'abord chaleureusement ma directrice de recherche, Trang Hoang, pour sa dévotion, son soutien et la confiance qu'elle m'a démontrée tout au long de ma maîtrise. Je suis reconnaissante envers les membres du laboratoire Hoang, présents et passés, pour leurs encouragements et leur contribution dans mon projet de recherche, particulièrement Véronique Litalien pour sa performance inégalable à l'animalerie, à Magali Humbert pour les « Bravos ! » et à elles deux pour leur franchise et amitié. Un énorme merci à Danièle Gagné et Gaël Dulude pour l'extraordinaire travail à la plateforme de cytométrie en flux et à Christian Charbonneau pour les impressions d'affiche, surtout celles de dernière minute.

Je tiens à remercier mes parents, Nathalie et Stéphane, pour leur amour inconditionnel, pour les débats enflammés et pour la personne sensible, passionnée et persévérante que je suis devenue. Merci aussi à ma sœur Catherine pour l'écoute, le support et sa présence fortement appréciée à mon séminaire de maîtrise. Un clin d'œil à Gisèle, omniprésente pendant la rédaction de mon mémoire. Merci aussi à mes amies « cdf », Camille, Émilie-Pier, Claudie, Marie-Caroline et Marie-Michèle pour la solidarité et les encouragements.

Je remercie spécialement mon collègue du 2^e étage, Simon, pour les innombrables discussions, personnelles et scientifiques, pour les commentaires constructifs, pour le soutien moral, pour la complicité, pour croire en moi, pour m'aimer et vivre avec moi tous les jours.

Parce que j'espère faire une différence...

Introduction

CHAPITRE 1. Hématopoïèse

1.1 Évènements précoces de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus précisément orchestré et hiérarchisé sous l'influence de cytokines et autres facteurs de croissance à l'origine de toutes les lignées cellulaires sanguines. La cellule souche hématopoïétique (CSH) est pluripotente et mère de chacune des composantes sanguines myéloïdes et lymphoïdes, c'est-à-dire les leucocytes, les érythrocytes et les thrombocytes. Les CSH résident d'abord dans le foie au stade fœtal, puis dans la moelle osseuse, particulièrement dans les os longs tels le fémur, le tibia et l'os iliaque, de la naissance à l'âge adulte. Comme toute cellule souche (CS), les CSH harmonisent leur rôle de progéniteur pluripotent à leurs propriétés régénératives, et assurent ainsi la perpétuation de l'hématopoïèse au long de la vie.

Plus précisément, la différenciation hématopoïétique est régulée finement par des facteurs de transcriptions (FT) (**Figure 1, page 2**), majoritairement des facteurs de croissance, soit directement sécrétés par les cellules de la niche médullaire ou indirectement via le transport de FT paracrines par la voie hématogène. « Stem cell factor » (SCF) demeure probablement le plus important médiateur de l'hématopoïèse, puisqu'essentiel à la survie et au développement des cellules souches hématopoïétiques. Dans le processus de différenciation des progéniteurs myéloïdes, on retrouve également une variété de « colony-stimulating

factor » (CSF), granulocytes CSF (G-CSF), macrophage CSF (M-CSF) et granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF), qui activent les CSH et engagent ces dernières dans la lignée cellulaire homonyme. D'un autre côté, dans la régulation de la différenciation lymphocytaire, abordée plus extensivement dans la section 1.3, les cytokines majoritairement impliquées sont « Fms-like tyrosine kinase» (FLT-3) ligand, « tumor necrosis factor » (TNF) alpha et de nombreuses interleukines (IL), principalement l'IL-7.

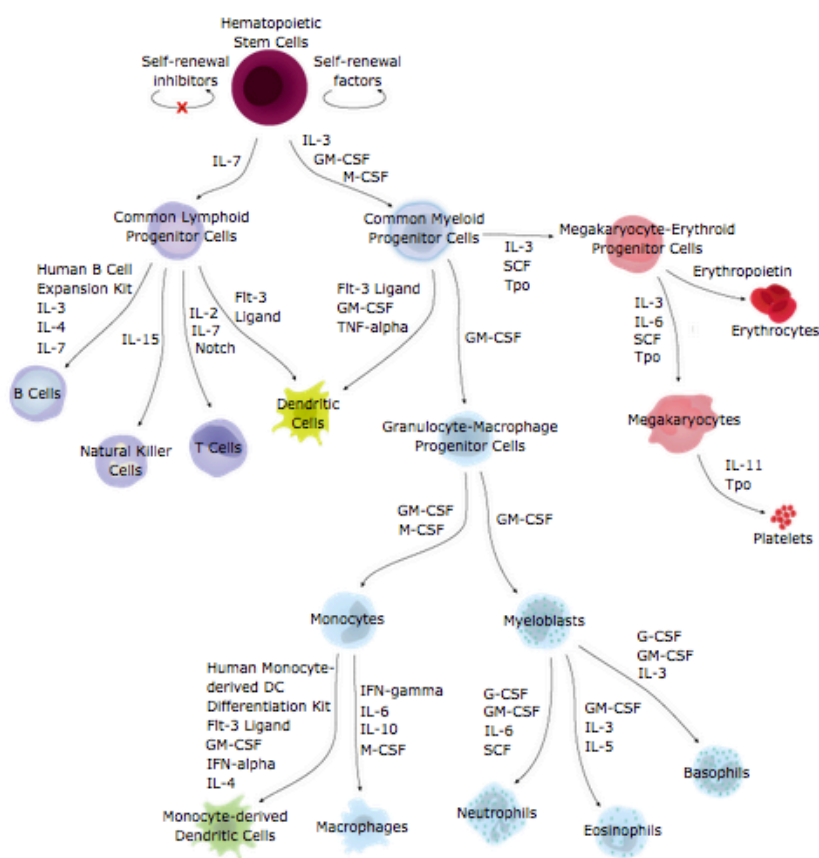


Figure 1. Différenciation hématopoïétique chez l'Homme.

Différenciation d'une cellule souche hématopoïétique en lignées sanguines distinctes, soit lymphoïdes ou myéloïdes, selon des facteurs de transcription spécifiques.

Figure récupérée de R&D Systems Inc., <https://www.rndsystems.com/pathways/hematopoietic-stem-cell-differentiation-pathways-lineage-specific-markers>, janvier 2015.

1.1 Cellules souches et auto-renouvellement

L'auto-renouvellement est une caractéristique de CS et de progéniteurs précoces multipotents qui est absente chez les cellules somatiques différenciées de l'hématopoïèse normale. De ce fait, dans un contexte physiologique en équilibre, le sort de la CSH et de ses descendants est contrôlé à la fois par les exigences en cellules sanguines des systèmes hématologiques et immunitaires et par la déplétion du bassin de progéniteurs dans la moelle osseuse. L'environnement immédiat des CSH et autres précurseurs hématopoïétiques, appelé niche ou stroma, composé majoritairement de fibroblastes, de cellules endothéliales et de cellules mésenchymateuses, joue un rôle essentiel dans le maintien des CSH ainsi que dans la différenciation hématopoïétique en sécrétant des chimiokines et des facteurs de croissance, notamment SCF qui se lie au récepteur KIT présent sur les CSH et permet leur maintien dans la moelle osseuse. La niche médullaire est compartimentée : les CSH et les progéniteurs résident donc dans des environnements spécifiques aux composantes particulières. En réponse à la niche médullaire, la CSH donne naissance à des progéniteurs multipotents (MPP) et pourvus comme elle de propriétés d'auto-renouvellement (Wilson et al., 2008). Ses descendants, les cellules myéloïdes progénitrices (CMP) et les cellules lymphoïdes progénitrices (CLP), sont responsables respectivement et exclusivement des lignées myéloïdes (érythrocytes, thrombocytes, granulocytes et monocytes) et lymphoïdes (lymphocytes T et B). Confrontés aux mêmes enjeux que la CSH, ces progéniteurs oscillent entre deux destins, soit la reconstitution du bassin de cellules progénitrices ou l'engagement dans la différenciation.

1.1.1 Les essais de transplantations : évaluer l'activité d'auto-renouvellement

L'activité d'auto-renouvellement est évaluée par des essais de transplantation chez les modèles murins, où un receveur immunosupprimé, soit préalablement irradié à une dose non mortelle, reçoit les cellules d'un donneur par voie intraveineuse. En fait, les cellules renouvelables ont la capacité de migrer à leur niche d'origine et de rétablir une population cellulaire fonctionnelle chez l'hôte après transplantation, contrairement aux cellules dépourvues de propriétés régénératives qui possèdent une longévité restreinte dans le temps. Quelques semaines post-transplantation, le pourcentage de greffe dans les souris receveuses et le phénotype de ces dernières sont analysés par cytométrie en flux en se référant à la présence du marqueur de surface « cluster of différenciation » (CD) 45. Ce pourcentage reflète le degré de reconstitution de la niche hôte par les cellules dérivées du donneur. Le receveur et le donneur proviennent de fonds génétiques quasi identiques, différant seulement par l'expression de deux isoformes du CD45, respectivement CD45.1 et CD45.2, lesquels permettent une discrimination cellulaire des deux groupes lors de l'analyse phénotypique.

1.2 Thymopoïèse

Les lymphocytes T demeurent les principaux acteurs de la réponse immunitaire acquise, étant impliqués à la fois dans la réponse cellulaire (T CD8+) et humorale (T CD4+). Bien que débutant systématiquement dans la moelle osseuse, la production des cellules T s'achève dans le thymus suite à l'exode médullaire de progéniteurs destinés à la thymopoïèse. La mobilisation de CSH et de progéniteurs précoces dans la voie sanguine est possible grâce à l'inhibition de la rétention médullaire par la chimiokine CXCL12, sécrétée par les cellules

stromales de la moelle osseuse. De plus, MPP et CLP disposent de potentiels de reconnaissance de l'environnement thymique permettant la genèse d'une lignée lymphocytaire T, notamment via les récepteurs CCR9 et CD44 (Bhandoola et al., 2007).

Le thymus est un organe lymphoïde rétro sternal qui se développe dès la naissance et atteint sa pleine maturité à l'enfance. Au cours du vieillissement normal, le développement et l'éducation thymique déclinent et le thymus s'atrophie, réduisant considérablement le compte de cellules et la masse du tissu. Toutefois, certaines pathologies, notamment les leucémies, entraînent la formation de thymome, le résultat d'une prolifération aberrante des thymocytes à un stade précoce de développement. Une surcharge de l'espace thymique découlant de cette prolifération excessive peut éventuellement entraîner l'exode de progéniteurs thymiques immatures dans la circulation sanguine et l'envahissement d'autres organes, tels la rate et le foie, voire l'invasion systémique.

1.2.1 Développement des thymocytes normaux

Les progéniteurs dérivés de la moelle destinés à la lignée lymphoïde T migrent jusqu'au thymus où ils forment des lymphoblastes, cellules hématopoïétiques multipotentes, immatures et indifférenciées ayant perdues leur potentiel d'auto-renouvellement. En d'autres mots, ces cellules sont engagées exclusivement dans la différenciation cellulaire, et sont de ce fait incapables de reconstituer le thymus après transplantation (Goldschneider et al., 1986; Zuniga-Pflucker, 2004). Sous l'influence de la niche thymique, les lymphoblastes, ou thymocytes, poursuivent leur développement jusqu'à l'obtention d'un lymphocyte T mature et pleinement différencié circulant dans le sang et la lymphe à la recherche d'envahisseurs (Petrie and Zuniga-Pflucker, 2007). Les cellules T atteignent la maturité conditionnellement à

leur performance au rigoureux processus de sélection s'assurant que chaque thymocyte possède un potentiel de reconnaissance adéquat aux complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) présentés par les autres cellules du soi sans pour autant être activé par des peptides provenant du soi. Les cellules ne répondant pas à ces deux exercices, désignés respectivement comme sélection positive et sélection négative, sont destinées à l'apoptose tandis que les cellules matures parviennent à quitter le thymus pour patrouiller la circulation sanguine.

À chaque étape de la différenciation dans le thymus, les thymocytes subissent des changements fonctionnels et structurels distincts, obligatoires à la maturation T (Zuniga-Pflucker, 2004). Les facteurs de croissance et cytokines font partie des éléments essentiels qui régulent non seulement le développement lymphocytaire T mais la majorité des lignées cellulaires. Comme susmentionné, SCF est un facteur de croissance cellulaire des CS qui se lie à KIT, ou récepteur du SCF (SCFR). KIT est une tyrosine kinase exprimée à la surface des précurseurs hématopoïétiques lymphoïdes, de la CSH aux thymocytes immatures, et étudiée comme essentiel à la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs thymiques, autant *in vivo* qu'*in vitro* (Martins et al., 2012; Massa et al., 2006; Waskow et al., 2002). L'expression aberrante de KIT a été identifiée chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe (LMA) où jusqu'à 80% des malades démontrent une activité ectopique de la tyrosine kinase dans leurs myéloblastes (Malaise et al., 2009).

En effet, l'activité constitutive et dérégulée de cette tyrosine kinase confère aux cellules cancéreuses des avantages de survie et de croissance non-négligeables et constitue une cible potentielle de traitement de chimiothérapie. L'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, demeure la première ligne de traitement pour la leucémie myéloïde chronique (LMC) et est utilisé pour d'autres cancers solides comme les néoplasies gastro-intestinales. Il agit en

compétition avec l'adénoside triphosphate (ATP) sur les récepteurs à tyrosine kinase, contrecarrant la phosphorylation de ses cibles moléculaires. L'imatinib, ou Glivec®, démontre une efficacité impressionnante chez les patients atteints de LMC en diminuant considérablement le nombre de cellule tumorales dans la moelle osseuse. Selon une étude internationale randomisée (IRIS), le traitement de la LMC dans la phase chronique par l'imatinib montre une survie de 7 ans chez 86% des patients (O'Brien S.G. et al., 2008). Dans les cancers gastro-intestinaux avec activation constitutive de KIT, cet inhibiteur de tyrosine kinase s'avère prometteur avec une réponse thérapeutique chez plus de la moitié des patients (Demetri et al., 2002).

Une autre composante de la niche du thymus, les IL, jouent un rôle important de signalisation cellulaire autocrine et paracrine et sont sécrétées autant par les progéniteurs immunitaires que par les cellules stromales. Un acteur important du développement lymphocytaire T chez l'Homme, l'IL-7, est sécrété par la moelle osseuse et le thymus et est essentiel au développement normal des cellules T (Jiang et al., 2005). En effet, une mutation inactivatrice du récepteur à IL-7 (IL-7R) entraîne une lymphopénie T sévère, suggérant une fonction considérable dans la lymphopoïèse (Noguchi et al., 1993; Puel et al., 1998). De plus, l'IL-7R est exprimé à la surface des thymocytes précoces où il joue un rôle important dans la recombinaison du récepteur de cellule T (TCR) (Chowdhury and Sen, 2003).

Encadré 1. Hématopoïèse du modèle murin.

Le modèle murin présente une hématopoïèse légèrement différente de celle de l'Homme, néanmoins il demeure une référence expérimentale valide, reproductible, et représentative de la biologie du système hématopoïétique humain. Chez la souris, la rate peut servir d'organe hématopoïétique secondaire lorsque la moelle est non fonctionnelle, une propriété non retrouvée chez l'humain. Tant pour l'Homme que l'animal, les différentes phases du développement lymphocytaire T sont caractérisées en fonction de l'expression transitoire des marqueurs de surface (CD) et du réarrangement des chaînes du TCR. Entre autres, les marqueurs de maturité CD4 et CD8 sont révélés tardivement dans la progression de la lignée lymphoïde T, d'abord absents chez les précurseurs désignés comme doubles-négatifs (DN; CD4⁻CD8⁻), subséquemment coexprimés au stade double-positif (DP; CD4⁺CD8⁺), puis finalement exprimés de manière exclusive chez les lymphocytes T matures appelés simples-positifs (SP; CD4⁺ ou CD8⁺).

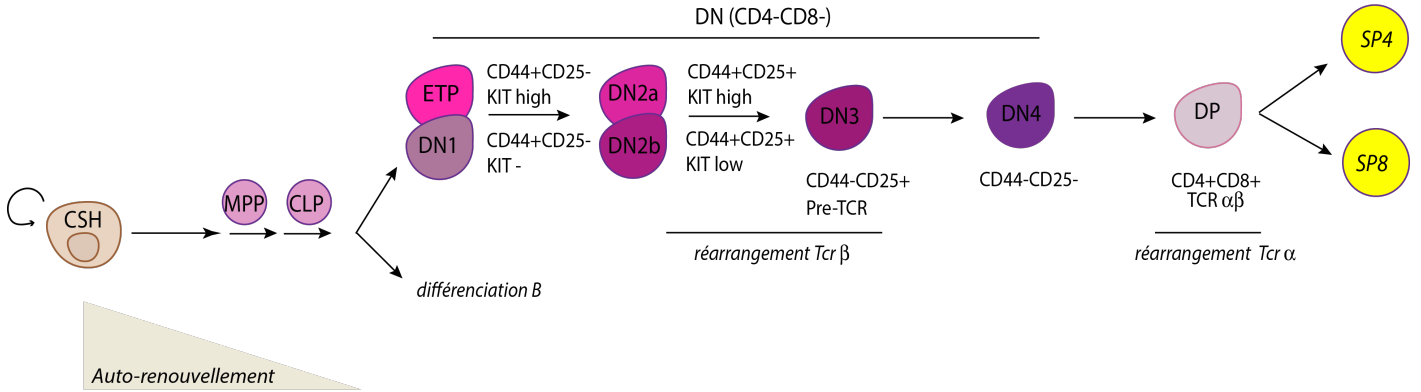


Figure 2. Développement lymphocytaire T normal.

Représentation de la thymopoïèse normale chez le modèle murin. Le potentiel d'auto-renouvellement est absent chez les thymocytes normaux dès le stade DN.

Le compartiment DN, stade le plus précoce du développement lymphocytaire T, comporte des cellules hétérogènes en fonction, en structure et en activité métabolique. Ces progéniteurs sont subdivisés en quatre populations cellulaires plus uniformes, DN1 à DN4, identifiées selon leur chronologie dans la différenciation thymique et isolées selon les marqueurs de surface CD25 et CD44 (**Figure 2, page 8**). Nonobstant, une certaine hétérogénéité est préservée dans chaque compartiment, résultant en une fragmentation du compartiment DN1 en plusieurs sous-groupes, DN1a-e et une population distincte de « early thymocyte progenitor » (ETP), et regroupant les DN2a et DN2b sous la bannière DN2 (Yui et al., 2010). Le stade DN2b signale le début de l'engagement irréversible de la cellule dans la lignée cellulaire T (Zhang et al., 2012b), puisque les protagonistes DN en amont possèdent un potentiel de différenciation multipotent, quoi que limité (Yui et al., 2010). Il est possible de discriminer ces différents groupes d'un point de vue phénotypique par l'expression différentielle de marqueurs de surface cellulaire, IL-7R et KIT. L'IL-7 supporte la survie et la prolifération cellulaire des thymocytes DN précoces, plus précisément des DN1 et DN2, tandis qu'une limitation de la concentration d'IL-7 est nécessaire pour la différenciation de DN3 en DN4, d'où l'expression augmentée de l'IL-7R dans les premiers groupes (Trigueros et al., 2003). Les compartiments ETP et DN2a expriment KIT à haut niveau (KIT^{high}) contrairement aux DN2b et aux DN1 qui démontrent respectivement une expression modérée et une absence du récepteur (KIT^{low} et KIT⁻)(Yui et al., 2010). En plus d'une discrimination phénotypique, le développement lymphocytaire T est étudié sous un angle génétique par l'analyse du réarrangement du *Tcr* ou « essai de clonalité ».

1.2.2 Réarrangement du *Tcr* par recombinaison V(D)J

Dans un contexte physiologique normal et en équilibre, chaque lymphocyte T mature exprime à sa surface un TCR unique et fonctionnel. De plus, les thymocytes possèdent un potentiel illimité de réarrangements des gènes du *Tcr*, donc la distinction d'un nombre illimité d'antigènes, ce qui explique pourquoi le bassin de cellules T est efficace à défendre le système de toute entité appartenant au non-soi. La perturbation de la variabilité et diversité du TCR engendre une faille dans la surveillance et la défense immunitaire et signale un désordre de l'hématopoïèse normale pouvant être causé directement par une dérégulation du processus de recombinaison ou indirectement suite à un blocage dans la différenciation thymique empêchant l'achèvement du réarrangement du *Tcr*. Le TCR est constitué de deux chaînes, majoritairement α et β , comportant toutes les deux une région variable et une région constante. Ces chaînes sont encodées par des gènes du *Tcr* regroupés en loci comportant différents segments, variable (V), diversity (D), joining (J) pour la chaîne β et VJ pour la chaîne α , lesquels se recombinent de manière aléatoire et mutuellement exclusive. Le processus de recombinaison du *Tcr* est méticuleusement régulé et requiert un certain niveau de maturité des thymocytes. Les enzymes RAG1/2 sont responsables du clivage de l'ADN lors de la recombinaison des gènes du TCR et ne peuvent accéder à la chromatine qu'à des stades spécifiques du développement lymphocytaire. Les protéines E, notamment HEB et E2A, sont des facteurs de transcription de type « helix-loop-helix » qui induisent le réarrangement du TCR en concédant l'accès à la chromatine. Initialement, le procédé s'amorce avec le réarrangement des segments DJ de la chaîne β au début du stade DN3, indiquant que les compartiments thymiques antérieurs, DN1 et DN2, présentent un gène *Tcr β* non réarrangés,

c'est à dire en configuration germinale (« germline »). Le réarrangement des segments V et DJ s'ensuit, résultant en une chaîne β réarrangée. La formation du pré-TCR, formé de la chaîne β et d'une chaîne invariante α , précède l'expression du TCR, qui a lieu au stade DP après remaniement de la chaîne α et hétérodimérisation de cette dernière à la composante β (Petrie and Zuniga-Pflucker, 2007).

Les DN3 requièrent l'expression du pré-TCR et l'activation de NOTCH1 pour s'engager irréversiblement et progresser dans la différenciation T (Zuniga-Pflucker, 2004). La formation du pré-TCR est ponctuée de différents points de contrôle précis qui nécessitent temps et énergie, retardant la différenciation T et résultant en un bassin important de DN3 dans le thymus. À l'opposé, les DN2 possèdent un gène *Tcr β* non réarrangé permettant la différenciation rapidement après l'expression de l'IL-7R. Cette population DN2, dite transitoire, est donc retrouvée en proportion restreinte dans le thymus.

CHAPITRE 2. Leucémogénèse

2.1 Leucémie aigue lymphoblastique-T

Plusieurs désordres du système sanguin entraînent des perturbations de l'équilibre homéostatique dans l'hématopoïèse. Ce phénomène est observé dans la leucémie aigue lymphoblastique (LAL), de lignée B ou T, une condition hématologique caractérisée par l'envahissement des systèmes lymphatiques et sanguins par des blastes anormaux faisant obstacle au développement normal des autres lignées hématopoïétiques. La LAL-T constitue respectivement 15% et 25% des cas de LAL infantiles et adultes, avec un taux de récurrence de 15-20% chez les enfants et un taux de survie chez l'adulte de moins de 50% (Van Vlierberghe and Ferrando, 2012). Les traitements de chimiothérapie actuellement utilisés, notamment le dexaméthasone, la vincristine et l'asparaginase, sont efficaces dans le traitement de la LAL-T, surtout chez l'enfant, quoique les récurrences révèlent un très mauvais pronostic. L'invasion systémique de lymphoblastes chez les patients atteints de ce type de leucémie découle d'une prolifération thymique excessive secondaire à la réacquisition de propriétés d'auto-renouvellement chez un thymocyte normalement dépourvu de ce potentiel.

2.2 Cellules souches cancéreuses (CSC)

Le cancer résulte d'une séquence d'altérations génétiques conférant à la cellule des propriétés métaboliques et fonctionnelles aberrantes et avantageuses. Une tumeur est constituée de cellules hétérogènes et hiérarchisées, similaires aux CSH. Cette hétérogénéité se traduit comme un obstacle colossal pour la chimiothérapie actuelle, qui cible essentiellement

des cellules hautement proliférantes (Rich and Bao, 2007). En effet, les thérapies modernes agissent efficacement à démanteler la tumeur en épuisant le bassin de cellules hyperprolifératives mais en épargnant toutefois les CSC (Eppert and Goddard, 2010; Valent et al., 2013), garantes des récives et envahissements métastatiques souvent fatals (Abbott, 2006; Clappier et al., 2011; Gangemi et al., 2009; Mullighan et al., 2008). Effectivement, les CSC jouissent des mêmes avantages que les CS saines et sont pourvues entre autres d'un potentiel intrinsèque régénératif leur permettant de reconstituer la tumeur après traitement et de maintenir la leucémie (Tremblay et al., 2010b). Étonnamment, le clone d'origine de la tumeur peut provenir d'une population cellulaire somatique et de ce fait non-renouvelable, telle que les thymocytes. Plusieurs études s'accordent pour dire que dans le cancer, particulièrement la leucémie, les évènements oncogéniques surviennent conditionnellement à l'acquisition d'un potentiel d'auto-renouvellement aberrant chez les cellules non-renouvelables (Corces-Zimmerman et al., 2014; Shlush et al., 2014). Cette phase d'initiation de la leucémogénèse est appelée phase pré-leucémique, phase à laquelle le patient est asymptomatique. La pré-leucémie est caractérisée par un blocage partiel de différenciation et l'apparition d'une population aberrante capable d'auto-renouvellement (Hong et al., 2008). L'étude des modèles de souris transgéniques nous a permis de démontrer que cette cellule souche pré-leucémique (CS-préL) préserve sa capacité à donner naissance à des cellules différenciées et fonctionnelles (Gerby et al., 2014), bien que ce potentiel de différenciation présente déjà des anomalies (Herblot et al., 2000). L'accès au stade leucémique découle des avantages fonctionnels prolifératifs acquis par les CS-préL, au fil de la transformation. Étant donné que le patient en pré-leucémie ne manifeste aucun symptôme, cette fenêtre de la maladie est peu notoire chez l'Homme. La recherche sur les CS-préL est donc basée sur

l'expérimentation animale, particulièrement sur des souris transgéniques où le cancer est induit et peut être étudié extensivement à chaque étape. Pour ce faire, les altérations génétiques identifiées chez les patients atteints de leucémie sont reproduites chez le modèle murin.

2.3 Altérations génétiques dans la LAL-T

Les mutations activatrices du gène *Notch1* existent parmi les plus fréquentes chez les patients atteints de LAL-T, soit chez plus de la moitié d'entre eux. Les translocations chromosomiques retrouvées chez les patients atteints de LAL-T impliquent majoritairement des facteurs de transcription, comportant entre autres les familles d'oncogènes *stem cell leukemia (SCL)/LIM-only (LMO)*, *T-cell leukemia homeobox (TLX)* et *homeobox (HOX) A* (Hoang and Hoang, 2010; Look, 1997; Souroullas et al.; Van Vlierberghe and Ferrando, 2012). Étonnamment, ces altérations génétiques sont mutuellement exclusives chez les patients leucémiques, suggérant la possibilité d'une fonction commune des oncogènes retrouvés chez les patients atteints de LAL-T (Hoang and Hoang, 2010).

Plusieurs familles d'oncogènes impliquées dans la leucémogénèse T sont étudiées extensivement dans notre laboratoire. Principalement, les oncogènes *SCL* et *LMO1/2* ont été récemment identifiés comme des acteurs importants dans la reprogrammation de précurseurs thymiques non-renouvelables en cellules ayant des capacités d'auto-renouvellement. Ces oncogènes sont réactivés dans la LAL-T principalement par translocations chromosomiques entraînant une juxtaposition de ces gènes à des séquences amplificatrices des gènes de réarrangement du TCR et ultimement à leur surexpression dans les thymocytes immatures.

Durant l'hématopoïèse normale, SCL joue un rôle dans l'activité d'auto-renouvellement des CSH à la fois chez la souris et chez l'humain (Lacombe et al., 2010; Reynaud et al., 2005). Notamment, SCL régule négativement le passage des CSH de G0 à G1, c'est-à-dire en contrôlant la transition vers une phase proliférative et en maintenant à long terme une population de CSH en G0 (Lacombe et al., 2010). D'un point de vue fonctionnel, SCL, tout comme son homologue « *lymphoblastic leukemia-derived sequence 1* » (*Lyl1*), est un facteur de transcription qui recrute les protéines E (E2A ou HEB) via leur domaine « *helix-loop-helix* » et qui ensemble s'associent à LMO dans le noyau pour former un complexe transcriptionnel régulant l'expression de gènes d'auto-renouvellement chez les CSH. Les niveaux de transcription de *Scl* sont abaissés dès les stades précoces du développement lymphocytaire T normal, concordant avec la disparition du potentiel d'auto-renouvellement à cette étape. De plus, quand exprimés de manière ectopique dans le thymus, les oncogènes *SCL* et *LMO1/2* induisent un potentiel aberrant d'auto-renouvellement et une signature de CS chez les progéniteurs thymiques du stade DN3 (Gerby et al., 2014; McCormack et al., 2010). Cette signature d'auto-renouvellement implique des gènes connus comme jouant un rôle dans l'hématopoïèse normale, au niveau de l'activité régénérative intrinsèque des CSH, mais inactivés chez les progéniteurs thymiques et autres cellules différenciées (Tremblay et al., 2010b). Parmi ces acteurs, *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Lyl1* et « *hematopoietically expressed homeodomain* » (*Hhex*) se sont révélés actifs en réponse à l'expression aberrante de ces oncogènes dans le thymus (Aplan et al., 1997; Cleveland et al., 2013; Gerby et al., 2014; Lacombe et al., 2010; Lawrence et al., 1997; Lieu and Reddy, 2009; Magnusson et al., 2007; McCormack et al., 2010; Smith et al., 2014; Souroullas et al., 2009; Thorsteinsdottir et al., 2002). Il est intéressant de noter que l'expression ectopique de *Hhex* dans les thymocytes

suffit à leur conférer un potentiel de reconstitution thymique (McCormack et al., 2010). Ces observations nous amène à nous questionner sur le rôle potentiel des autres familles d'oncogènes dans la reprogrammation de cellules somatiques en cellules comportant des propriétés d'auto-renouvellement.

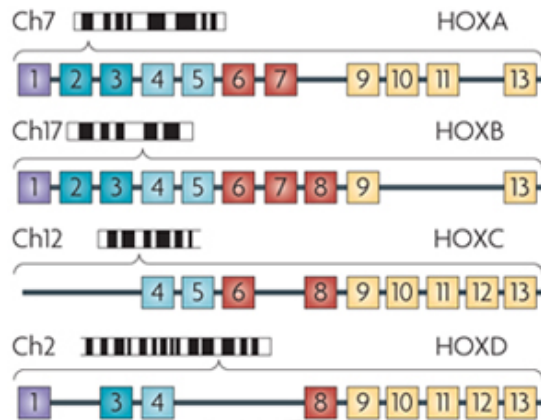


Figure 3. Organisation des gènes *Hox* chez le mammifère.

Schématisation des quatre groupes de gènes *Hox*, soit A, B, C et D, respectivement situés sur les chromosomes 7, 17, 12 et 2.

Figure adaptée de Shah et Sukumar, 2010.

2.4. Cluster *HOXA*

Les gènes *Hox* (Figure 3, p. 16), définis comme quatre groupes chez l'humain (A, B, C et D), encodent des facteurs de transcription se liant à l'ADN via leur homéodomaine (HD), plus spécifiquement au niveau des séquences amplificatrices, résultant en l'activation ou la répression des éléments en aval. Bien que les protéines HOX sont connues principalement

pour leurs fonctions dans l'embryogénèse, elles ont été étudiées dans divers autres procédés biologiques incluant la régulation de l'hématopoïèse (Thorsteinsdottir et al., 1997). En effet, les gènes *Hox*, spécialement le cluster *HOXA* incluant les gènes *HoxA9* et *HoxA10*, sont impliqués dans le contrôle de l'auto-renouvellement et la différenciation chez les CSH et les progéniteurs précoces. Le groupe de gènes *HOXA*, retrouvé dans environ 5% des LAL-T, présente un potentiel oncogénique provenant soit directement par une perturbation de ses activités ou indirectement sous l'influence de régulateurs transcriptionnels en amont, notamment CDX2 et CDX4 (Soulier et al., 2005; Speleman et al., 2005; Bansal et al., 2006). Entre autres, l'expression aberrante de *HoxA9* a été associée à la transformation leucémique chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigue (LMA) (Borrow et al., 1996). Les facteurs de transcription agissant en amont des gènes du groupe *HOXA* et jouant un rôle dans la leucémogénèse comprennent les oncoprotéines de fusion du complexe de pore nucléaire 98 (NUP98), lesquelles ont été fréquemment identifiées dans la LAL-T et la LMA (Gough et al., 2011; Palmqvist et al., 2007; Slape and Aplan, 2004; Van Vlierberghe et al., 2008).

2.4.1 Protéines de fusion NUP98 en amont du groupe *HOXA*

La protéine NUP98, comme son nom l'indique, est une composante de pore nucléaire encodée chez l'humain par le gène *NUP98* et responsable principalement des échanges entre le noyau et le cytoplasme. NUP98 est retrouvé en fusion avec plus de 28 partenaires contenant un HD, où les protéines résultantes sont reportées particulièrement chez les adultes en LAL-T et AML (Gough et al., 2011; Palmqvist et al., 2007). Ces translocations chromosomiques génèrent des protéines de fusion à la structure conservée où les extrémités N-terminale et C-

terminale proviennent respectivement de NUP98 et du HD d'un partenaire de fusion, HOX ou non-HOX (Gough et al., 2011) (**Figure 4, page 19**).

Le gène *plant HD finger protein 23 (PHF23)* est un membre de la famille des gènes *non-HOX* possédant un HD identifié en fusion avec *NUP98* et dont les études récentes suggèrent une contribution dans la transformation leucémique (Gough et al., 2011; Reader et al., 2007; Wang et al., 2009). Récemment, le facteur de transcription PHF23 a été considéré comme partenaire d'un complexe impliqué dans le remodelage de la chromatine et la régulation transcriptionnelle en s'attachant aux queues des histones et en apposant des « marques activatrices » (Reader et al., 2010). Toutefois, PHF23 et sa protéine de fusion, NUP98-PHF23 (NP23), demeurent peu caractérisés quant à leur rôle dans le développement des cellules hématopoïétiques. Le gène de fusion *NUP98-HOXD13 (NHD13)* présente un profil particulièrement intéressant puisque cette altération chromosomique a été reportée de manière récurrente chez les patients leucémiques (Borrow et al., 1996; Gough et al., 2011). De plus, l'expression aberrante de l'oncogène *NHD13* chez la souris a révélé un phénotype de syndrome myélodysplasique entre autres caractérisé par un blocage de différenciation dans le thymus au stade DN perturbant le développement hématopoïétique normal (Choi et al., 2009; Lin et al., 2005).

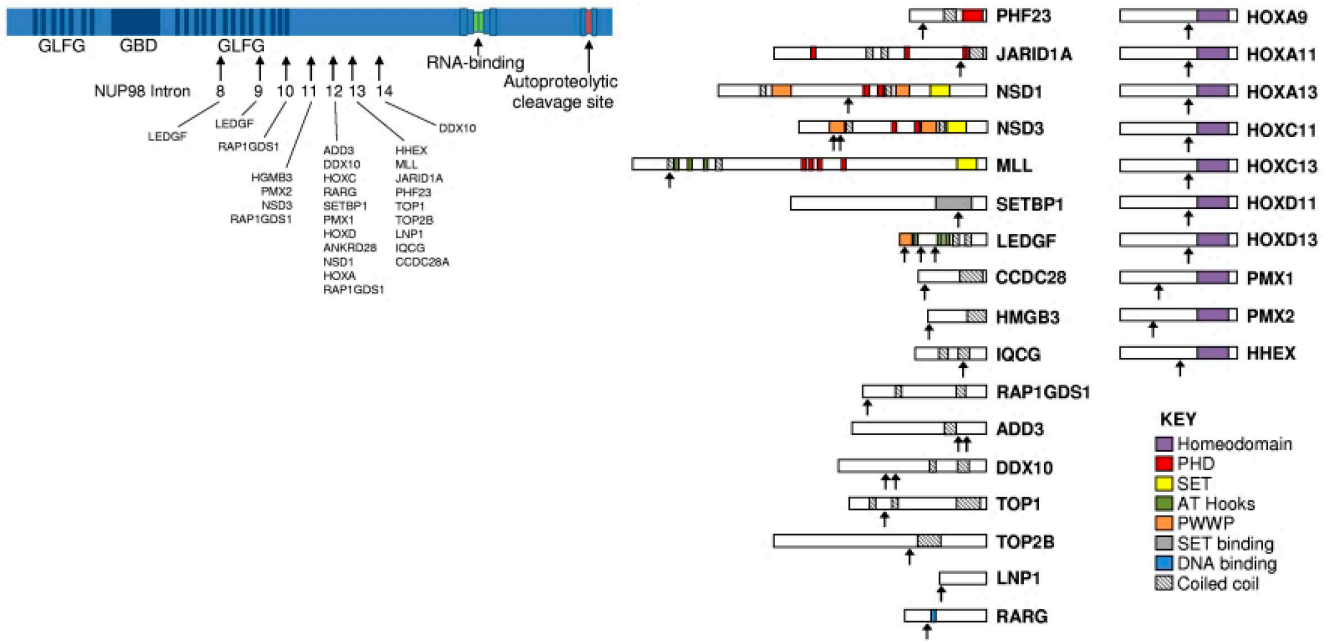


Figure 4. Structure des protéines de fusion NUP98.

Structure de la protéine sauvage NUP98 (*panneau de gauche*) et schématisation des domaines provenant des partenaires de fusion (*panneau de droite*) et du point de fusion avec NUP98 (*indiqué par la flèche*).

Figure et légende adaptées de Gough et al., 2011.

Projet de recherche

1. Raisonnement

Les thérapies actuelles sont inefficaces contre les CSC, résultant en une réémergence des cellules tumorales après un traitement de chimiothérapie. Il est alors essentiel d'identifier et de caractériser cette population de cellules malignes afin de définir des cibles thérapeutiques précises. La leucémogénèse est le résultat d'une accumulation de désordres génétiques, plus spécifiquement une délétion, une amplification, une mutation ponctuelle ou une translocation chromosomique, conférant un gain ou une perte de fonction à la cellule et ultimement une perturbation de l'équilibre cellulaire. *NP23* et *NHD13* sont des oncogènes identifiés de manière récurrente chez les patients atteints de leucémie aigue. *NP23* et *NHD13* sont des facteurs de transcription qui contrôlent l'activité de gènes de la famille *HOXA*. Cette dernière est connue pour son implication dans l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques normales, suggérant une fonction similaire chez les CSC. Cette hypothèse est renforcée par la récente observation que d'autres oncogènes dans la LAL-T, *SCL*, *LMO1* et *LMO2*, confèrent un potentiel aberrant d'auto-renouvellement aux progéniteurs thymiques. En effet, contrairement aux thymocytes exprimant les oncogènes *SCL* et *LMO1/2*, les cellules somatiques normales n'ont pas la capacité de greffer après transplantation et sont donc démunies d'activité d'auto-renouvellement.

2. Hypothèse

L'initiation de la leucémogénèse requiert principalement l'acquisition d'un comportement de CS par les cellules somatiques en pré-leucémie, particulièrement la capacité à s'auto-renouveler. En effet, ce potentiel confère aux progéniteurs, normalement dépourvus de cette capacité, un avantage de croissance palpable en permettant leur expansion clonale. Le pouvoir tumorigénique de ce clone s'accroît avec l'acquisition de mutations additionnelles qui lui attribuent des compétences anti-apoptotiques et hyperprolifératives, ultimement excessives et incontrôlables au stade leucémique. Notre hypothèse est que les oncogènes *NP23* et *NHD13* induisent une activité d'auto-renouvellement aberrante chez les thymocytes en LAL-T. Identifier et caractériser la population de CS-préL dans les souris transgéniques *NP23* et *NHD13* permettra une investigation plus approfondie des mécanismes cellulaires et moléculaires qui permettent l'acquisition de propriétés de CS en pré-leucémie. Ce travail permettra possiblement l'identification de nouvelles cibles pouvant être exploitées comme thérapie contre les CSC chez les patients exprimant ces oncogènes et potentiellement d'autres oncogènes impliqués dans la LAL-T.

3. Objectifs

Nous tenterons de déterminer la fonction de *NP23* et *NHD13* dans la leucémie T et plus particulièrement dans l'acquisition de propriétés de cellules souches.

1. Identifier la présence d'une population thymique renouvelable dans les modèles murins transgéniques *NP23* et *NHD13* au stade pré-leucémique par des essais de transplantation
2. Identifier la population de CS-préL responsable de la leucémogénèse T chez la souris.
3. Évaluer le potentiel d'auto-renouvellement des CS-préL *NP23^{tg}* et *NHD13^{tg}* du point de vue phénotypique et moléculaire.
4. Décrire les mécanismes de reprogrammation des thymocytes par les oncogènes *NP23* et *NHD13*.

Manuscrit

Déclaration de l'étudiant concernant l'article

J'atteste avoir contribué au design expérimental, à l'exécution et à l'analyse expérimentale de ce projet de recherche ainsi qu'à la réalisation des figures du manuscrit (Figures 3, 4, 5B, 6ABC).

Bastien Gerby a participé à ma formation, à la mise en forme, à l'exécution et à l'analyse expérimentale des expériences de caractérisation phénotypique avant et après transplantation primaire et à l'expérience de knockdown de *Lyl1* et *Hhex*.

Diogo Fernandez Veiga a effectué l'analyse bioinformatique et André Haman a contribué à l'exécution et l'analyse expérimentale de l'expérience de traitement des CS-préL par inhibiteur de tyrosine kinase.

Eun Sil Park et Sheryl Gough ont créé les modèles murins transgéniques *NP23* et *NHD13*, et ont performé les essais de clonalité DB1.

Peter D. Aplan a rédigé et corrigé le manuscrit.

Trang Hoang a initié et dirigé le projet, mis en forme les expériences et rédigé le manuscrit.

Thymocyte self-renewal induced by NUP98 fusion oncogenes

Running title: *Pre-leukemic stem cells in acute leukemia*

Bastien Gerby^{1,2}, Magalie Tardif^{1,2,3}, Eun Sil Park⁴, Sheryl Gough⁴, Diogo Fernandez Veiga^{1,3},
Andre Haman¹, Peter D Aplan⁴, Trang Hoang⁵

² : equally contributed to this work

¹Institute for Research in Immunology and Cancer

³Molecular Biology program

⁵Departments of Pharmacology and Biochemistry, University of Montreal, QC, Canada H3C 3J7

⁴Genetics Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, Bethesda

Abstract

Initiating events in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) can be triggered by the activation of oncogenic transcription factors in the T lineage. Here we show that two fusion genes, *NUP98-PHF23* (*NP23*) and *NUP98-HOXD13* (*NHD13*), reprogram normal thymocytes into pre-leukemic stem cells (pre-LSCs) with sustained self-renewal capacity. By clonal analysis of serially transplanted thymocytes, we found that this population is organized in a hierarchy much like normal hematopoietic stem cells, some clones having short term potential while others remained dormant in the short term but became dominant in the longer term. These pre-LSCs were enriched in a subset of $\text{KIT}^+\text{IL7R}^+$ immature thymocytes in which both *NP23* and *NHD13* activated a stem cell signature that includes *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Lyl1* and *Hhex*. Moreover, self-renewal activity was abrogated by RNA interference against *Lyl1* and *Hhex*. Since these two genes are also required downstream of three T-ALL oncogenes, *SCL/TALI*, *LMO1* and *LMO2*, we conclude that the levels of *Lyl1* and *Hhex* set the threshold for thymocyte reprogramming into pre-LSCs. Finally, Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor that targets c-KIT, induced a dose-dependent inhibition of DN thymocytes from *NP23*^{tg} or *NHD13*^{tg} mice. In light of the evidence that pre-LSCs escape chemotherapy to cause relapse, our results provide new avenues for targeting pre-LSCs in the *HOXA* subgroup of T-ALL.

Introduction

More than 70 % of recurring chromosomal translocations in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) involve transcription factors (Hoang and Hoang, 2010; Look, 1997) that are master regulators of cell fate and determine the gene signature and leukemic cell types (Ferrando et al., 2002). Strikingly, these transcription factors belong mostly to three families, basic helix-loop-helix, LIM only and homeobox proteins (Van Vlierberghe and Ferrando, 2012). Within the latter, the HOXA cluster includes a subgroup in which the *HOXA* locus is activated either directly by cytogenetic anomalies of chromosome 7 (Soulier et al., 2005; Speleman et al., 2005) or indirectly by a group of fusion oncogenes (Van Vlierberghe et al., 2008) that includes NUP98 fusion genes (Gough et al., 2011). Together, this group represents 15-20% of pediatric T-ALL (Van Vlierberghe and Ferrando, 2012). The prevalence of these three families is indicative of their dominant mechanisms of transformation (Look, 1997), as evidenced by their oncogenic properties in transgenic mouse models of T-ALL. Whether or not these oncogenic transcription factors belonging to different families may actually share common mechanism(s) of transformation of primary hematopoietic cells remains unknown.

Recent evidence based on highly sensitive DNA sequencing technology uncovered the existence of pre-leukemic mutations that predate multiple secondary mutations in leukemic cells from patients with acute myeloblastic leukemia (Corces-Zimmerman et al., 2014; Shlush et al., 2014). Strikingly, these preleukemic mutations recur at relapse together with another set of secondary mutations. Together, these studies point to the existence of therapy-resistant pre-LSCs within the bulk of leukemic cells that are long lasting and eventually evolve to cause relapse.

Thymocytes lack intrinsic self-renewal capacities (Goldschneider et al., 1986) and thymic output depends on the continuous influx of bone marrow-derived KIT⁺ multipotent progenitors that settle in the thymus (Bhandoola et al., 2007). The importance of KIT signaling for intrathymic production of pro-T cells was revealed by their paucity in viable *Kit*^W mutant mice (Waskow et al., 2002). These early thymocyte progenitors (ETPs) are directed towards the T lineage by the thymic microenvironment (Petrie and Zuniga-Pflucker, 2007). Progression towards CD4⁻CD8⁻ double negative 2 (DN2) cells represents the first commitment step, specifically at the DN2b stage marked by an acquisition of T-lineage identity at the molecular and cellular levels (Zhang et al., 2012b). Subsequently, TCRb rearrangement is completed at the DN3 stage in which signaling through a functional pre-TCR and Notch1 is associated with an irreversible T-lineage commitment, cell survival and proliferation. Cells having passed this beta selection checkpoint progress through the DN4 stage to the double positive (DP) stage to acquire CD4 and CD8 expression while rearranging their TCRA genes (reviewed in (Petrie and Zuniga-Pflucker, 2007)). T-cell production can be mimicked *in vitro* by coculture on OP9-DL1 stromal cells expressing NOTCH1 ligand (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002) and this required KIT signaling (Massa et al., 2006), further confirming the functional importance of KIT in ETP/DN2 thymocytes.

Normal thymocyte progenitors derive from self-renewing hematopoietic stem cells (HSC) that are present in the bone marrow in the adult. Interestingly, several oncogenic transcription factors in T-ALL, i.e. HOXA9/A10, c-MYB, SCL, and LYL-1 control HSC self-renewal (Lacombe et al., 2010; Lawrence et al., 1997; Lieu and Reddy, 2009; Magnusson et al., 2007; Souroullas et al., 2009; Thorsteinsdottir et al., 2002), raising the possibility that these oncogenes could confer aberrant self-renewal potential when inappropriately expressed

in thymocytes. For example, *SCL*, *LYL1* and *LMO1* or *LMO2* become oncogenic when misexpressed in the thymus (Aplan et al., 1997; Kelliher et al., 1996; Smith et al., 2014; Zhong et al., 2007). During the pre-leukemic stage, others and we recently showed that *LMO1/2* together with *SCL/TAL1* reprogram thymocyte progenitors into self-renewing pre-leukemic stem cells by activating *Lyl1* and *Hhex* (Cleveland et al., 2013; Gerby et al., 2014; McCormack et al., 2010). An important role for dysregulated *HOXA* genes in T-ALL was uncovered in the last decade (Palmqvist et al., 2007; Soulier et al., 2005; Van Vlierberghe et al., 2008) (reviewed in (Tremblay et al., 2010a)). Interestingly, *HOXA* genes are commonly upregulated by fusion proteins in T-ALL, including *NUP98* fusion proteins. We previously showed that *NUP98-PHF23* (Gough et al., 2014; Wang et al., 2009) and *NUP98-HOXD13* (Choi et al., 2009; Lin et al., 2005) transgenic mice could develop T-ALL associated with high *Hoxa* gene expression. In the present study, we addressed the question whether *NUP98* fusion genes can reprogram thymocytes into pre-LSCs.

Results

***NUP98*-fusion genes confer sustained self-renewal potential to thymocytes**

Both *NUP98-PHF23* (*NP23*) and *NUP98-HOXD13* (*NHD13*) fusion genes induced acute leukemias in mice with 100% penetrance and the time to leukemia was on average 240-260 days (**Figure S1A**). *NP23* mice developed T-ALL with thymomas and splenomegalies (not shown) that exhibited some degree of phenotypic heterogeneity (Gough et al., 2014). Leukemic cells could be immature CD8 single positive cells (ISP8) with a minor proportion of DN and DP cells (**Figure S1B**). In comparison, *NHD13* mice developed precursor T-cell ALL

as previously reported (Choi et al., 2009) characterized by a majority of DN cells (**Figure S1B**). During the pre-leukemic stage, thymocyte development was impaired with an increase in DN subpopulations, and decreased in DP cells for both *NP23^{tg}* and *NHD13^{tg}* mice (**Figure 5A**).

To determine whether *NUP98* fusion genes induce abnormal self-renewal potential to pre-leukemic thymocytes, total thymocytes from *NP23^{tg}* or *NHD13^{tg}* were transplanted into sublethally irradiated Pep3B mice, a co-isogenic strain expressing the allelic form of CD45 antigen (CD45.1). Thymic reconstitution was monitored six weeks after transplantation using the CD45.2 antigen as a marker for donor-derived cells (**Figure 5B**). Pre-leukemic thymocytes from *NP23^{tg}* or *NHD13^{tg}* mice efficiently engrafted the thymus of host mice, with chimerism varying from 25-90% and 75-98%, respectively while normal thymocytes did not engraft, as expected. When each thymocyte sub-population was calculated over input numbers, we observed that DN2 cells expanded the most in mice transplanted with *NP23^{tg}* thymocytes, whereas all DN populations expanded similarly with *NHD13^{tg}* thymocytes (**Figure 5C**). Therefore, both *NUP98-PHF23* and *NUP98-HOXD13* confer thymic engraftment capacity to DN thymocytes.

The capacity to engraft over serial transplantations is a measure of sustained self-renewal activity, a stem cell hallmark. To assess this, donor *NP23^{tg}* and *NHD13^{tg}* thymocytes that engrafted were recovered from the thymi of primary recipients and retransplanted into secondary and tertiary mice. Both *NP23^{tg}* and *NHD13^{tg}* thymocytes were capable of sustained engraftment through three serial transplantations (**Figure 5D**) without evidence of liver, spleen or bone marrow infiltration in host mice (data not shown), and contained therefore pre-

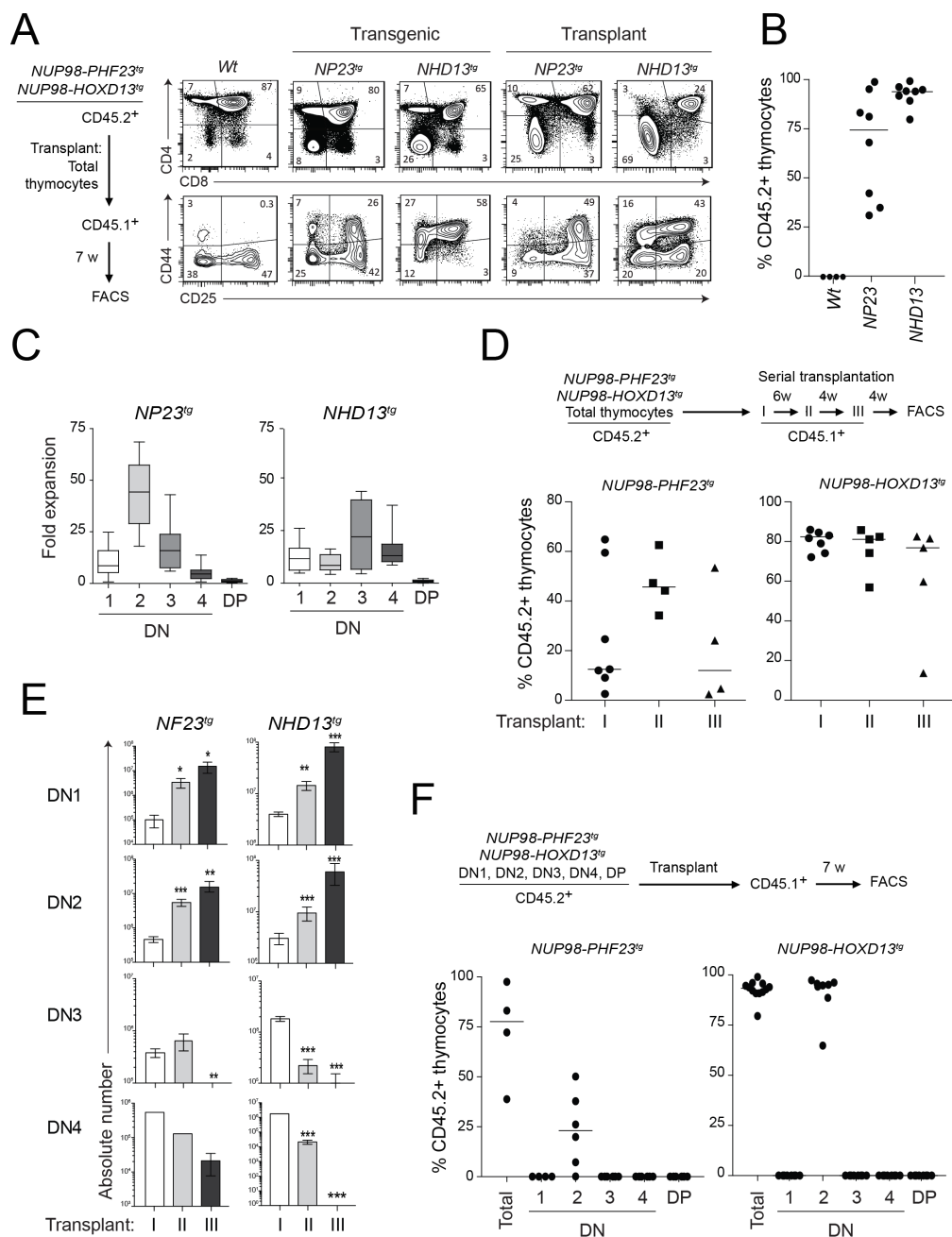


Figure 5. *NUP98-PHF23* and *NUP98-HOXD13* oncogenes confer an aberrant self-renewal potential to pre-leukemic thymocytes.

Pre-leukemic thymocytes from 2 month-old *Nup98-PHF23* and *Nup98-HOXD13* mice (CD45.2+) were intravenously (IV) transplanted into sublethally irradiated (600 cGy)

congenic mice (CD45.1+). **(A)** Representative FACS profiles of engrafted *Nup98-PHF23* and *Nup98-HOXD13* thymocytes before and after transplantation. Normal WT thymocytes were used as a reference. **(B)** Percentage of engraftment in the thymus was determined by flow cytometry 7 weeks post-transplantation for both models. A cohort of 9 mice were transplanted with 10^7 thymocytes from 5 different donors for each genotype. Each dot represents an individual transplanted mouse. The bar represents the median of engraftment. **(C)** The expansion of each thymocyte subpopulations (DN1-DP) after transplantation was calculated as fold over input. **(D)** Pre-leukemic *Nup98-PHF23* and *Nup98-HOXD13* thymocytes exhibit sustained self-renewal potential. 1.5×10^7 pre-leukemic *NUP98-PHF23* and *NUP98-HOXD13* thymocytes (CD45.2+) were transplanted into primary (I), secondary (II) and tertiary (III) recipient mice (CD45.1+ ; 4-7 mice per group). The average percentage of chimerism is shown. **(E)** Donor-derived thymocytes (CD45.1-CD45.2+) in the thymus were analyzed by flow cytometry after each serial transplantation. Shown are the absolute numbers of donor-derived thymocytes. **(F)** Self-renewal activity induced by *NUP98-PHF23* and *NUP98-HOXD13* is enriched in the DN2 population. Purified DN1, DN2, DN3, DN4 and DP thymocytes from *Nup98-PHF23*^{tg} and *Nup98-HOXD13*^{tg} mice were transplanted (3×10^4 and 5×10^4 cells, respectively). Recipient mice were analyzed for engraftment 8 and 9 weeks later, respectively.

leukemic stem cells (pre-LSCs). In addition, we noticed a cumulative expansion of the DN1 and DN2 populations at each transplantation, while the DN3 and DN4 populations decreased sharply at the third transplantation (**Figure 5E**) for both transgenic mouse models. These

observations raised the possibility that the self-renewing population was within the DN1 and/or DN2 subset.

Pre-LSC activity induced by *NUP98*-fusion genes is focused in DN2 thymocytes

An important question in the field is the cell of origin of leukemia. In chronic myeloid leukemias, the cell of origin appears to be at the level of HSCs (reviewed in (Nguyen et al., 2012)) whereas in T-ALL, we and others have observed that the cell of origin is a committed lymphocyte progenitor (Gerby et al., 2014; Hong et al., 2008). In particular, we showed that in the *SCL-LMO1* model, pre-LSCs are enriched in the DN3 population, due to high endogenous *Notch1* activity that collaborates with the *SCL-LMO1* oncogene (Gerby et al., 2014).

To identify the thymocyte sub-population that is enriched in self-renewing pre-LSCs, an equal number of each *NP23*^{tg} and *NHD13*^{tg} thymocyte sub-population were purified and transplanted into sublethally irradiated mice (**Figure 5F**). Under these conditions, self-renewal activity was uniquely confined to the DN2 population (**Figure 5F**) which expanded 10 to 20-fold on average (**Figure S2**), consistent with our phenotypic analyses shown in Figure 1E.

Clonal analysis reveals short term and long term repopulating pre-LSCs

Rearrangements at *Tcrb* loci uniquely mark each individual clone in the T lineage. We therefore took advantage of the *Tcrb* gene rearrangement as a clonal mark to assess the diversity of pre-LSCs in our serial transplantation assays (**Figure 6**). The analysis of D2-J2 rearrangement showed that engrafted *NHD13*^{tg} thymocytes were predominantly germline at both transplant 1 and 3, whereas engrafted *NP23*^{tg} thymocytes were predominantly polyclonal at transplant 1, but germline at transplant 3 (**Figure 6A**). These observations indicate that the

self-renewal activity of *NHD13*^{tg} and *NP23*^{tg} pre-LSCs is associated with a process of clonal selection in the thymus of host mice. Furthermore, the germline configuration of selected self-renewing clones suggests that their selection occurs prior the D2-J2 gene rearrangements. In contrast, most samples exhibited clonal D1-J1 rearrangements at both transplant 1 and 3 (**Figure 6B**). These results suggest that the bias towards D1-J1 in T-ALL arising from these mice (Gough et al., 2014) actually took place during the pre-leukemic stage. Interestingly, engrafted *NHD13*^{tg} thymocytes had a prominent D1-J1S2 and D1-J1S6 rearrangement after the first transplantation while a novel D1-J1S1 rearrangement was found after the third transplantation. These results are consistent with the view that the D1-J1S1 clone was dormant during the first transplantation and expanded at the third transfer, while two clones, D1-J1S2 and D1-J1S6, that were active after the first transplantation became extinct at the third transplantation. Similar analyses performed with engrafted *NP23*^{tg} thymocytes indicate a major clone with D1-J1S4 rearrangement after the first transplantation and clonal D1-J1S4 and D1-J1S3 rearrangements after the third transplantation. However, sequence analysis of the D1-J1S4 rearrangement demonstrated that this band actually represented two different D1-J1S4 rearrangements, both of which were different than the D1-J1S4 rearrangement predominant at transplant 1 (**Table S1**). Detection of three clonal D1-J1 rearrangements at transplant 3 suggest the presence of two dominant clones; overall, these results again indicate that a dormant clone(s) during transplant 1 predominated at transplant 3, while the dominant clone

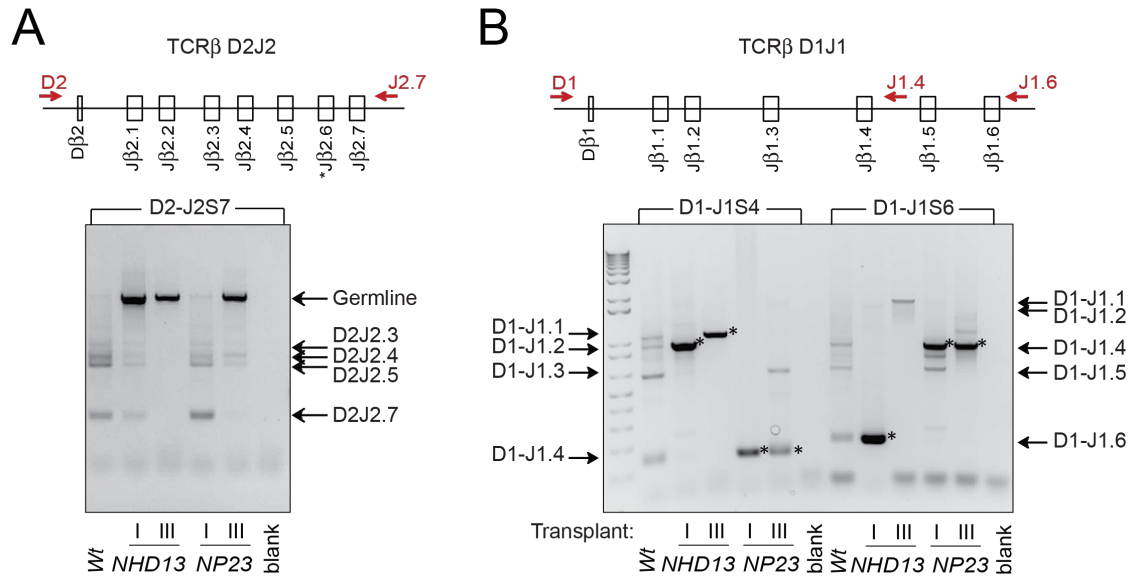


Figure 6. *NUP98-PHF23*^{tg} and *NUP98-HOXD13*^{tg} pre-LSCs exhibit short term and long term repopulating activities.

(A) D2-J2 and (B) D1-J1 rearrangements of *Tcrβ* gene in engrafted and purified preleukemic thymocytes from *NUP98-PHF23*^{tg} and *NUP98-HOXD13*^{tg} mice after primary and tertiary transplantations were analyzed. DNA was amplified by PCR with primers for specific variability segments of *Tcrb*.

present at transplant 1 was undetected at transplant 3. In sum, these results reveal significant heterogeneity within the pool of pre-LSCs, with long term and short term reconstituting cells similar to normal HSCs in both mouse (Jordan and Lemischka, 1990) and human (Guenechea et al., 2001) and surprisingly, of a pool of dormant cells that become apparent at the third transplantation only, again similar to normal HSCs (Wilson et al., 2008). Therefore, pre-LSCs

are organized in a hierarchy with long term and short term repopulating cells, similar to normal HSCs.

***NUP98*-fusion genes upregulates stem cell genes in DN2 thymocytes**

Expression of the major T-ALL oncogenic transcription factors is highly dynamic within the DN2 population, with *Scl*, *Lyl1*, *Lmo2* and *Hoxa9* being down-regulated (Herblot et al., 2000; Zhang et al., 2012b). We analyzed the transcriptome of the thymus of clinically healthy *NP23*^{tg} mice (Gough et al., 2014) and found that the *Hoxa* cluster, and also *Hoxb4* and *Hoxb7*, were upregulated (**Figure 7A**) Interestingly, *NUP98-PHF23* also upregulated *Hhex* and *Nkx2-3*, two targets of *SCL-LMO1/2* (Gerby et al., 2014; McCormack et al., 2013; Smith et al., 2014). We confirmed by RT-PCR analysis that both *NP23* and *NHD13* upregulate *Hoxa9* expression in purified DN2 thymocytes (**Figure 7B**). Moreover, both transgenes also upregulate *Hhex* and *Lyl1* expression, two genes that are downstream effectors of *SCL-LMO1* self-renewal activity in pre-LSCs (Gerby et al., 2014; McCormack et al., 2013; McCormack et al., 2010; Smith et al., 2014).

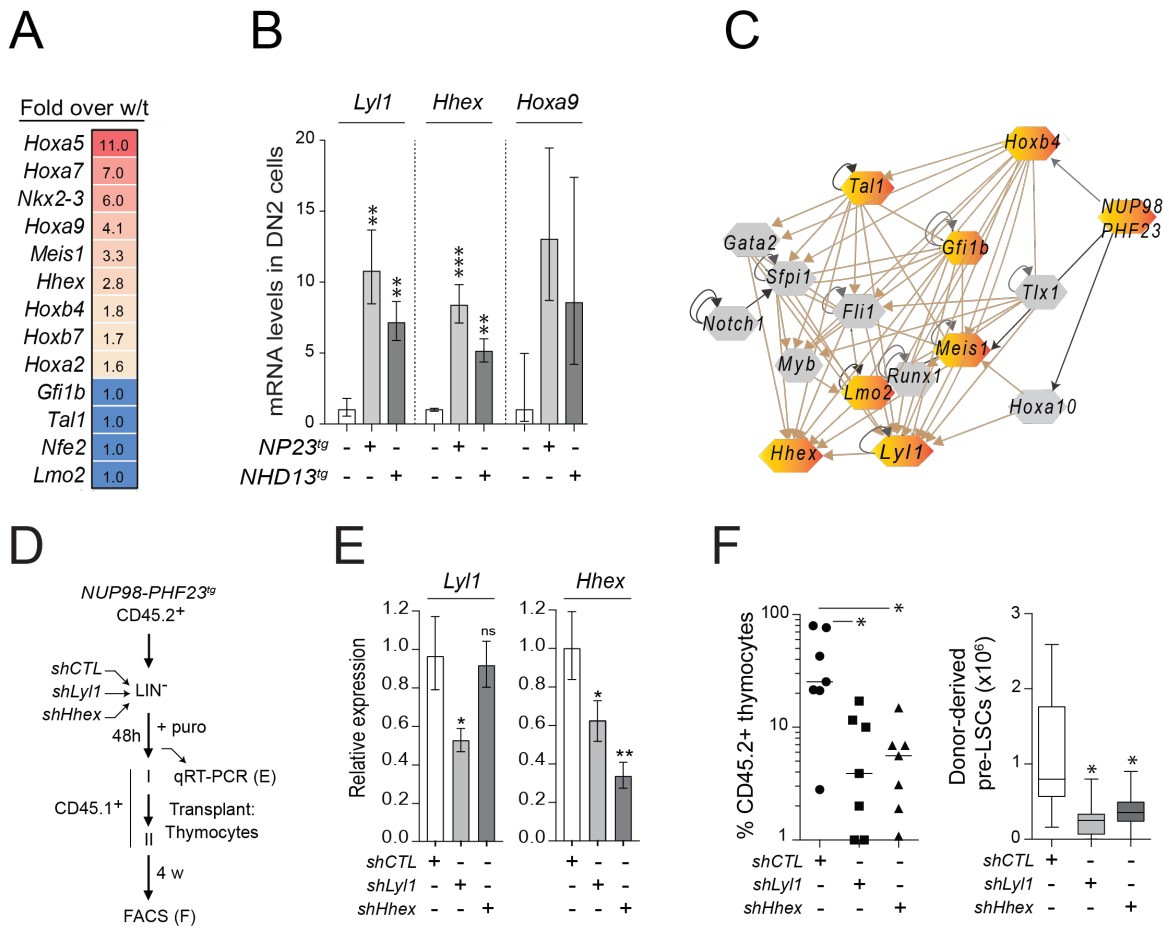


Figure 7. Coordinate control of *Hoxa9*, *Lyl1* and *Hhex* expression by NUP98-PHF23 and NUP98-HOXD13 in DN2 thymocytes.

(A) Heatmap of transcription factor gene expression in the thymus and spleen of clinically healthy *NUP98-PHF23^{tg}* mice (data from GEO; GEO accession: GSE54788). (B) Gene expression in purified DN2 thymocytes. mRNA expression levels were analyzed by qRT-PCR after normalization to b-actin as loading controls. Expression levels in *Wt* DN2 cells were set as 1. Data shown are the mean \pm SD of triplicate determinations. (C) Network analysis of hematopoietic transcription factors implicated in acute leukemias. Highlighted in color are the

genes that were upregulated by NUP98-PHF23. (D-F) *Lyl1* and *Hhex* RNA interference decreases the self-renewal activity of *NP23*^{tg} pre-LSCs. Lineage negative (LIN-) cells (CD45.2+) from *NP23*^{tg} mice were transduced with either sh*Lyl1* and sh*Hhex* lentiviral vectors or non-targeted control (shCTL) (D). Gene expression was analyzed by RT-PCR and normalized to b-actin and expressed as % control cells (shCTL) (E). After lentiviral delivery of the indicated shRNA, LIN- bone marrow cells were transplanted into lethally irradiated hosts (CD45.1+, n=3). Reconstituted pre-leukemic thymocytes (CD45.2+) were harvested 4 weeks later and transplanted into secondary recipients (CD45.1+) (D). Thymic chimerism (F, *left panel*), absolute number of pre-LSCs (DN2b) (F, *right panel*) were analysed by FACS in the recipient thymus 4 weeks after the secondary transplantations (n=7, ** p<0.001).

We next capitalized on a compendium of 55 ChIP-seq datasets of 31 hematopoietic transcription factors in the HemoChIP project (Wilson et al., 2010), of NUP98-PHF23 (Gough et al., 2014) and others as described previously (Gerby et al., 2014), to perform network analysis between the major T-ALL oncogenic transcription factors and those that were upregulated by *NUP98-PHF23* (**Figure 7C**). The hierarchy was determined by the numbers of genes bound by each transcription factor (outgoing peaks) and, conversely, by the numbers of upstream regulators for each transcription factor (incoming peaks) as described in our previous work (Gerby et al., 2014). Thus, *Lyl1*, *Hhex*, *Scl*, *Lmo2*, *Meis1* all have incoming HOXB4 peaks, with *Lyl1* and *Lmo2* also having MEIS1 peaks. Therefore, *Hoxb4* was placed upstream of these regulators. By the same criteria, *Gfi1b* was not downstream of *Hoxb4* but downstream of *Scl*, while *Hhex*, *Lyl1*, *Lmo2* and *Meis1* were all downstream of *Gfi1b*. Together, this

analysis converged on *Hhex* and *Lyl1* as direct or indirect downstream targets of all these transcription regulators.

To directly address the functional importance of *Lyl1* and *Hhex* downstream of NP98-fusion genes, we delivered a *Lyl1*- or *Hhex*-directed shRNA in lineage-depleted bone marrow cells from *NP23^{tg}* mice (**Figure 7D**). The sh*Hhex* affected *Hhex* expression without modifying *Lyl1* expression while the sh*Lyl1* affected both *Lyl1* and *Hhex* expression (**Figure 7E**) confirming that *Hhex* is downstream to *Lyl1* (**Figure 7C**). Following transplantation and thymic reconstitution, thymocytes were then harvested to assess their capacities for engraftment in secondary transplantation (**Figure 7D**). Both *Hhex*- and *Lyl1*-directed shRNA decreased by 5-10 fold the capacity of *NP23^{tg}* thymocytes to engraft the thymus of host mice and to give rise to phenotypic pre-LSCs. Together, we conclude that *Lyl1* and *Hhex* are required downstream of NUP98-fusion proteins for efficient reprogramming of thymocytes into pre-LSCs.

Pre-LSCs induced by *NUP98*-fusion genes requires tyrosine kinase activity

The DN2 population is heterogeneous with regards to KIT expression, as DN2a cells express the same high KIT levels as in ETP cells, whereas DN2b cells express lower levels of KIT (Yui et al., 2010). Under steady state conditions, both transgenes expanded the DN2b population at the expense of the ETP and DN2a populations (**Figure 8A-B and Figure S3**). When transplanted, purified DN2b consistently generated high level thymic reconstitution in all recipients, whereas ETP showed occasional and lower levels of engraftment only (**Figure 8C**).

KIT signaling is essential for HSC self-renewal activity (Kent et al., 2008). To determine the importance of tyrosine kinase activity for the maintenance of pre-LSCs in organotypic cultures, we used imatinib, a drug which is clinically used for the treatment of gastrointestinal tumors with constitutive KIT activation (Demetri et al., 2002), to inhibit KIT tyrosine kinase activity. Strikingly, in contrast with SCL-LMO1 pre-LSCs which are DN3 (Gerby et al., 2014) both *NP23* and *NHD13* pre-LSCs were highly sensitive to nanomolar concentrations of imatinib (**Figure 8D**, *upper panel*). Indeed, the EC50 ranged from 30 to 80 nM, comparable to the Kd of Imatinib binding to KIT *in vitro* (13 nM (Anastassiadis et al., 2011)). Therefore, KIT tyrosine kinase activity is required in *NP23*- and *NHD13*-induced pre-LSCs. These results concur with the identification of DN2 cells as the target of oncogenic reprogramming by *NUP98* fusion genes. These pre-LSCs are highly sensitive to dexamethasone (**Figure 8D**, *lower panel*), a corticosteroid commonly used in T-ALL (Pui and Evans, 2006), consistent with their T-lineage identity. Finally, DN2 from *NP23*^{tg} thymocytes were treated or not *in vitro* during 4 days with 1mM of Imatinib, corresponding to 75% inhibition of cell viability (**Figure 8E**). To determine whether Imatinib alter the self-renewal activity of *NP23*^{tg} pre-LSCs, treated and untreated cells were transplanted into sub-lethally irradiated mice (**Figure 8F**). We observed that Imatinib drastically inhibited the thymic reconstitution (**Figure 8F**, *left panel*) of recipient mice and the pre-LSCs expansion *in vivo* (**Figure 8F**, *right panel*) 6 weeks after transplantation. Together, our results indicated that tyrosine kinase activity is required for pre-LSCs induced by *NUP98*-fusion genes and reveal Imatinib as a drug candidate in the treatment of *HOXA*-induced T-ALL.

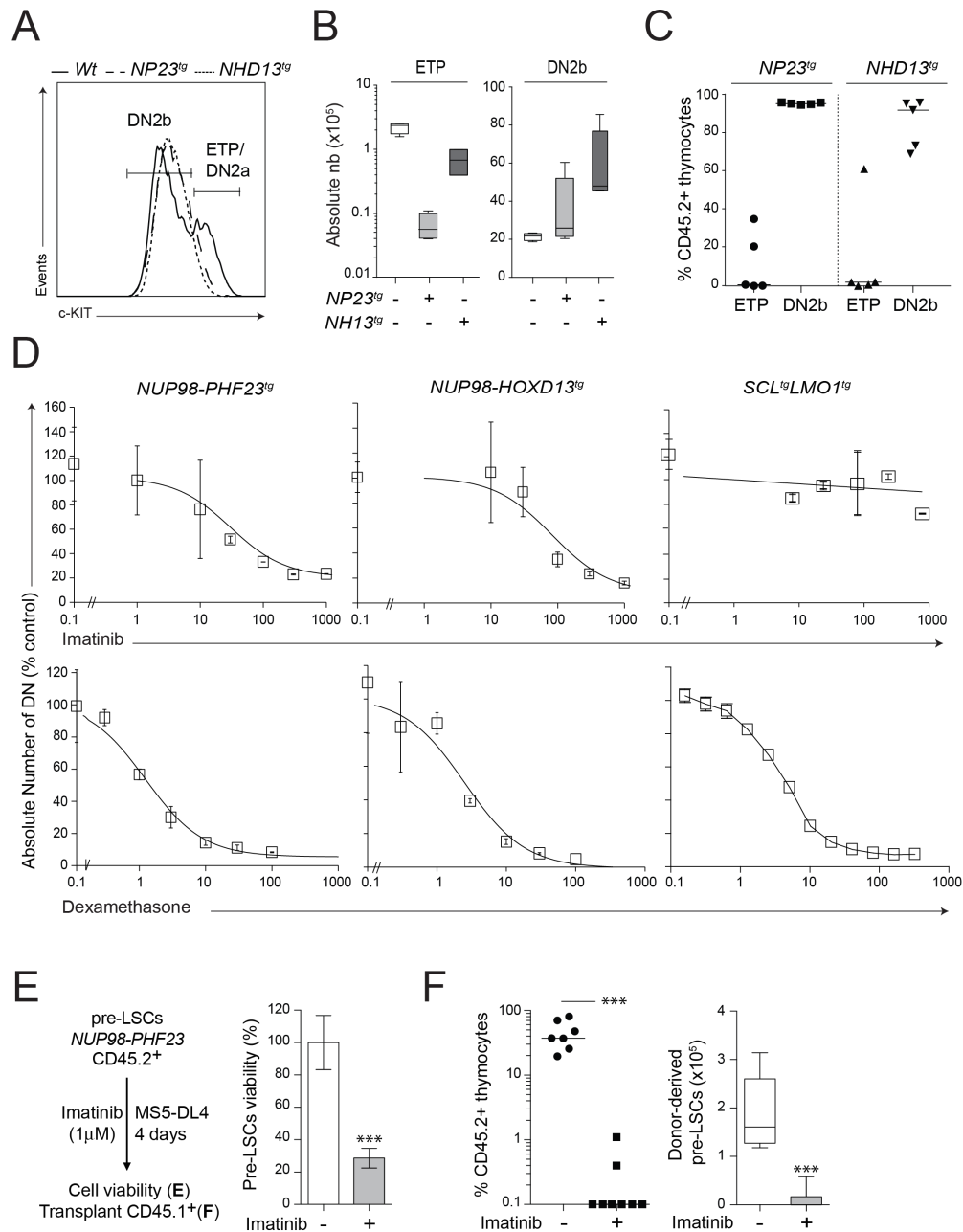


Figure 8. Pre-LSCs induced by *NUP98*-fusion genes express c-KIT and are sensitive to Imatinib as well as Dexamethasone.

(A) KIT expression levels in KIT⁺CD44⁺ DN population of WT, *NUP98-PHF23* and *NUP98-HOXD13* pre-leukemic thymocytes discriminate ETP/DN2a and DN2b subsets. (B) The

absolute numbers of ETP and of DN2b during steady state are shown (n=5, mean±SD) in each transgenic mouse models. (C) Pre-LSCs are enriched in the DN2b population. Mice were transplanted with 3×10^3 ETP/DN2a or 3×10^4 DN2b. Percentage of engraftment in the thymus was determined by flow cytometry 7 weeks post-transplantation. (D) Purified DN thymocytes from *NUP98-PHF23*^{tg}, *NUP98-HOXD13*^{tg} and *SCL-LMO1*^{tg} mice were co-cultured on MS5-DL4 stromal cells and exposed to the indicated dose of Imatinib (*upper panel*) and Dexamethasone (*lower panel*) for 5 days. Shown are the numbers of viable DN thymocytes (Thy1⁺) expressed as % control cultures. Dose-response curves were generated using the ALLFIT curve fitting routine. The EC50 obtained by curve fitting for Imatinib were: 30±41 nM (NP23); 82±68 nM (NHD13); NA (SCL-LMO1) and for Dexamethasone were: 1.2±0.5 nM (NP23); 2.5±1.4 nM (NHD13); 6±1.4 nM (SCL-LMO1). (E-F) Imatinib eradicates the self-renewal activity of pre-LSCs. Purified pre-LSCs from *NUP98-PHF23*^{tg} thymocytes were co-cultured during 4 days on MS5-DL4 stromal cells in presence or not of 1mM Imatinib (E, *left panel*). The percentages of cell viability are shown (E, *right panel*) (Mean ± SD, n=7). Treated and untreated cultured viable cells were then transplanted into sub-lethally irradiated CD45.1⁺ recipient mice (F). The engraftment of donor-derived thymocytes (CD45.2⁺) in the thymus (F, *left panel*) and the pre-LSCs expansion *in vivo* (F, *right panel*) was analyzed 6 weeks after transplantation for each condition.

Discussion

Lyl1 downstream of *NUP98* fusion genes and of *HOX* genes

Hoxa7/9/10, *Hoxb4-9* and *Meis1* are direct targets of NUP98-PHF23 as shown by ChIP-seq analysis (Gough et al., 2014). We now find *Lyl1* downstream of *Hoxb4* and *Meis1*, a finding initially suggested both by network analysis and subsequently confirmed by functional studies. Furthermore, HOXA10 occupies the *Lyl1* promoter, upregulates promoter activity and induces *Lyl1* expression in chromatin in Jurkat T cells (Nagel et al., 2009). Finally, HOXA10 also occupies *Meis1* promoter region (Bei et al., 2011). Together, these observations indicate that *Lyl1* is downstream of the *Hoxa* cluster.

Functionally, *Lyl1* controls the survival of HSCs in a manner which is redundant with *Scf* (Souroullas et al., 2009). However, *Lyl1* becomes critically important in lymphoid specification (Zohren et al., 2012). In the thymus, *Lyl1* is expressed in ETPs and DN2 thymocytes (Ferrando et al., 2004; Zhang et al., 2012b) and controls their survival and expansion (Zohren et al., 2012). While *Lyl1* expression becomes extinct at later stages of differentiation, chromosomal translocations involving *LYL1* drives constitutive and elevated *LYL1* expression (Mellentin et al., 1989) which subsequently collaborates with *LMO1* or *LMO2* to reprogram DN thymocytes into self-renewing pre-LSCs (Gerby et al., 2014). We now provide functional evidence that *Lyl1* is also required downstream of *NUP98* fusion genes, indicating that *Lyl1* is a common denominator between the *HOXA* cluster and the bHLH family. A subgroup of T-ALL with elevated *LYL1* expression was previously identified by Ferrando et al (Ferrando et al., 2002). Interestingly, two of five samples within the group have elevated *HOXA9*, associated with MLL-ENL and NUP98-LNP1 translocations,

respectively, consistent with the proposition that the 3'*HOXA* cluster is upstream of *LYL1*. Additionally, we assigned *Lyl1* as a downstream target of TLX1 by network analysis. In summary, we propose that major oncogenic transcription factors induce T-ALL by reprogramming thymocytes into self-renewing pre-LSCs and that *Lyl1* is a common downstream effector of these major oncogenes.

The *HOXA* cluster and the DN2 population

HOXA related T-ALL samples co-clustered with a stage after the ETP but preceding b-selection, as revealed by hierarchical analysis of the transcriptomes of human T-ALL samples and normal thymocyte subpopulations (Soulier et al., 2005). Interestingly, this corresponds to the DN2 stage in the mouse. This analysis and others were instrumental in revealing the potential role of *HOXA* genes in T-cell transformation. However, it was not clear whether the clustering of T-ALL samples corresponds to specific stages of T-cell differentiation arrest imposed by the oncogenes or to collaborating oncogenic events. In the present study, we show that both *NUP98* fusion genes target DN2 cells for oncogenic reprogramming into self-renewing pre-LSCs. Despite the fact that the *Vav* transgenic cassette directs pan-hematopoietic gene expression, we show that the DN2 stage is susceptible to oncogenic reprogramming due to the complementation of tyrosine kinase signaling with the *NUP98* fusion genes. In contrast to the *NUP98* fusion genes, the *SCL-LMO1* oncogenes target the DN3 population due to oncogene complementation by high endogenous NOTCH1 activity in these cells (Gerby et al., 2014). Together, our results indicate that the nature of the target cell of transformation depends on the complementation of specific signaling pathways with the primary oncogenic transcription factors, *SCL-LMO1/2* requiring high endogenous NOTCH1 activity in DN3

thymocytes whereas *NUP98* fusion genes requiring tyrosine kinase activity in DN2b thymocytes. Interestingly, these cell stages also determine the nature of the cooperating oncogenic lesions. Hence, *SCL-LMO1* in mice and in the human T-ALL are often associated with *Notch1* gain of function mutations. While *Notch1* mutations were also found in the human *HOXA* and ETP subgroups (Zhang et al., 2012a) and commonly found in *NP23*-induced T-ALL (Gough et al., 2014), these cells additionally acquire *Ptpn11* and/or *Ras* mutations (Downing et al., 2012) (unpublished data), two genes that are important for KIT signaling. Finally, *Nras* and *Kras* mutations were also found in *NUP98-HOXD13*-induced acute non lymphoblastic leukemias (Slape et al., 2008).

Identification of pre-leukemic stem cells: Implications for therapy

Current chemotherapy of childhood T-ALL induces long-term remission but is associated with severe side effects and undesirable consequences including reproductive, obesity and musculo-skeletal problems, and second malignant neoplasms (Pui and Evans, 2006; Seibel, 2008). Furthermore, 50-60% of adolescent and adult patients succumb to recurrent T-ALL. In this context, the recognition of pre-LSCs in acute leukemias (Corces-Zimmerman et al., 2014; Shlush et al., 2014) has important clinical implications (Goossens and Van Vlierberghe, 2014). Thus, although current chemotherapy regimens efficiently reduce the tumor burden at time of presentation, it is thought that, a fraction of long-lived pre-LSCs that are spared during treatment might eventually evolve to malignancy (Eppert and Goddard, 2010; Valent et al., 2013) to cause a leukemic relapse (Clappier et al., 2011; Mullighan et al., 2008). The hierarchy of pre-LSCs identified here strongly supports this view. Hence, cells with sustained self-renewal capacity may remain “dormant” during the proliferative stress

imposed by the first transplantation and be activated during the third transplantation. The sensitivity of pre-LSCs identified herein to imatinib suggests a possible benefit for the inclusion of imatinib on treatment protocols for T-ALLs that overexpress *HOXA* cluster genes.

Materials and methods

Mice

All animals were maintained in pathogen-free conditions according to institutional animal care and guidelines set by the Canadian Council on Animal Care. Our protocol entitled “Leukemia induced by oncogenes” was approved by the Ethics Committee of experimentation on animals of the University of Montreal, CDEA (Comité de Déontologie de l’Expérimentation sur les Animaux). Transgenic mice expressing the *NUP98-PHF23* and *NUP98-HOXD13* transgenes driven by the *Vav* transgenic cassette were previously reported (Choi et al., 2009; Gough et al., 2014) and maintained by cross-breeding for more than 10 generations in a C57BL6 background. Pep3b (CD45.1⁺) or C57BL6/Pep3b (CD45.1⁺/CD45.2⁺) was used for transplantation assays.

Immunostaining and flow cytometric analysis

Thymocytes were labeled as described (Gerby et al., 2014). All antibodies were from Pharmingen (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada): CD44 (IM7), CD25 (PC61.5), CD4 (RM4-4), CD8 (53-6.7), Thy1.2 (30-H12) and CD24 (30-F1). Dead cells were excluded by propidium iodide staining (PI)(Lacombe et al., 2013). Where indicated, double negative thymocytes were enriched by negative selection to remove CD4⁺, CD8⁺ and Ter119⁺ cells using rat anti-mouse antibodies and BioMag goat anti-rat beads (1 ml /50 x 10⁶ cells, Qiagen).

Thymocyte subsets were further purified using a BD FACSAria cell sorter and analysed using BD LSR II flow cytometer with Diva software (BD Biosciences). Non-specific staining was blocked by pre-incubation with human immunoglobulin (25 µg/ml in IMDM 10% FCS).

DNA extraction and *Tcr* rearrangement

Thymocyte DNA was extracted with DNAzol, as per the manufacturer's protocol. V, D and J segments of the *TCRβ* locus were amplified using three pairs of primers (InVitrogen) (**Table S2**).

Transplantation assay

Donor and recipient mice were on C57BL6 (Ly6.2) and Pep3b (Ly6.1) (or C57BL6/Pep3b) backgrounds, respectively, allowing for the discrimination of host and donor-derived cells on the basis of CD45 alleles. Donor thymocytes were transplanted IV via tail vein injection into sub-lethally (600 cGy) irradiated recipient mice. Thymic reconstitution was analyzed by flow cytometry six or seven weeks post-transplantation and illustrated as the percentage of donor cells in the recipient thymus.

Cell culture and pharmacological treatment

Double negative thymocytes from clinically healthy mice (8-10 weeks) were enriched by negative selection and plated on MS5-DL4 stromal cells for 24h in 96-well microtiter plates in IMDM/10% foetal calf serum (Gibco) supplemented with IL7 (5 ng/ml) and FLT3 ligand (5 ng/ml), prior to the addition of inhibitors at the indicated concentrations for a total volume of 150 µl/well. Imatinib and Dexamethasone (Sigma) were diluted in DMSO and added to the

cultures at 1/1000 dilution. Control cultures were exposed to DMSO only. After three days, cells were harvested, labeled with antibodies against Thy1, CD4, CD8 and analyzed by flow cytometry. Dead cells were excluded by PI staining. Dose-response curves were analysed by non-linear regression with the ALLFIT curve fitting routine as described (Lia et al., 1996) to extrapolate the half-efficient concentrations (EC50) of each compound.

Collection and analysis of ChIP-Seq datasets

Whole genome chromatin occupancy data for 31 hematopoietic transcription factors were from Wang et al (O'Brodivich et al., 1990) and the HemoChIP project (Hannah et al., 2011). NOTCH1-binding peaks in G4A2 and T6E murine cell lines were mapped to the mm9 mouse genome and computed using the Galaxy tool (Kirkpatrick et al., 2007), as previously reported (Gerby et al., 2014). Peak coordinates for the HemoChIP dataset mapped to the mm9 mouse genome were downloaded from http://hscl.cimr.cam.ac.uk/ChIP-Seq_Compendum/ChIP-Seq_Compendum2.html. Finally, all peaks were associated to their closest transcription start sites in the mouse genome using PeakAnalyzer v.1.4 tool (Walshe et al., 1990). Transcription factor-bound genes used in downstream analyses (Figure 3C) included only those containing at least one peak within the proximal promoter (2 kb region around the transcription start site).

Gene transfer into bone marrow cells

Lineage negative (LIN⁻) cells were enriched by negative selection of total bone marrow cells from two month-old clinically healthy *NUP98-HOXD13^{tg}* or *NUP98-PHF23^{tg}* mice through immunomagnetic bead cell separation as previously described (Lacombe et al., 2010). LIN⁻ cells were plated at a concentration of 1×10^6 cells/mL for 24h in suspension culture in IMDM

supplemented with 15% FCS, 100 ng/mL murine Steel Factor (SF), 10 ng/mL human IL-6, 100 ng/ml human IL-11 and 5 ng/mL murine IL-3 as described (Lacombe et al., 2010). LIN⁻ cells were infected using lentiviral vectors containing either non-targeting shCTL or sh*Ly11* or sh*Hex* (Sigma, TRCN0000028854; St. Louis, Missouri, United States) for 48 h, selected for another 48h with puromycin (1.5 µg/ml) prior to transplantation (Lacombe et al., 2013).

References

- Anastassiadis, T., Deacon, S.W., Devarajan, K., Ma, H., and Peterson, J.R. (2011). Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology* 29, 1039-1045.
- Aplan, P.D., Jones, C.A., Chervinsky, D.S., Zhao, X., Ellsworth, M., Wu, C., McGuire, E.A., and Gross, K.W. (1997). An *scl* gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* 16, 2408-2419.
- Bei, L., Huang, W., Wang, H., Shah, C., Horvath, E., and Eklund, E. (2011). *Hoxa10* activates CDX4 transcription and *Cdx4* activates HOXA10 transcription in myeloid cells. *J Biol Chem* 286, 19047-19064.
- Bhandoola, A., von Boehmer, H., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 26, 678-689.
- Choi, C.W., Chung, Y.J., Slape, C., and Aplan, P.D. (2009). A NUP98-HOXD13 fusion gene impairs differentiation of B and T lymphocytes and leads to expansion of thymocytes with partial TCRB gene rearrangement. *J Immunol* 183, 6227-6235.
- Clappier, E., Gerby, B., Sigaux, F., Delord, M., Touzri, F., Hernandez, L., Ballerini, P., Baruchel, A., Pflumio, F., and Soulier, J. (2011). Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J Exp Med* 208, 653-661.
- Cleveland, S.M., Smith, S., Tripathi, R., Mathias, E.M., Goodings, C., Elliott, N., Peng, D., El-Rifai, W., Yi, D., Chen, X., et al. (2013). *Lmo2* induces hematopoietic stem cell-like features in T-cell progenitor cells prior to leukemia. *Stem Cells* 31, 882-894.

Corces-Zimmerman, M.R., Hong, W.J., Weissman, I.L., Medeiros, B.C., and Majeti, R. (2014). Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 2548-2553.

Demetri, G.D., von Mehren, M., Blanke, C.D., Van den Abbeele, A.D., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Heinrich, M.C., Tuveson, D.A., Singer, S., Janicek, M., et al. (2002). Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347, 472-480.

Downing, J.R., Wilson, R.K., Zhang, J., Mardis, E.R., Pui, C.H., Ding, L., Ley, T.J., and Evans, W.E. (2012). The Pediatric Cancer Genome Project. *Nat Genet* 44, 619-622.

Eppert, H.D., and Goddard, K.B. (2010). Administration of amiodarone during resuscitation of ventricular arrhythmias. *Journal of emergency nursing: JEN : official publication of the Emergency Department Nurses Association* 36, 26-28.

Ferrando, A.A., Herblot, S., Palomero, T., Hansen, M., Hoang, T., Fox, E.A., and Look, A.T. (2004). Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103, 1909-1911.

Ferrando, A.A., Neuberg, D.S., Staunton, J., Loh, M.L., Huard, C., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Pui, C.H., Downing, J.R., Gilliland, D.G., et al. (2002). Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1, 75-87.

Gerby, B., Tremblay, C.S., Tremblay, M., Rojas-Sutterlin, S., Herblot, S., Lemieux, S., Hebert, J., Sauvageau, G., Lecuyer, E., Veiga, D., et al. (2014). SCL, LMO1 and Notch1 reprogram thymocytes into self-renewing cells. *PLoS genetics* Accepted for publication.

Goldschneider, I., Komschlies, K.L., and Greiner, D.L. (1986). Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors. *J Exp Med* 163, 1-17.

Goossens, S., and Van Vlierberghe, P. (2014). Controlling Pre-leukemic Thymocyte Self-Renewal. *PLoS genetics* 10, e1004881.

Gough, S.M., Lee, F., Yang, F., Walker, R.L., Zhu, Y.J., Pineda, M., Onozawa, M., Chung, Y.J., Bilke, S., Wagner, E.K., et al. (2014). NUP98-PHF23 is a chromatin-modifying oncoprotein that causes a wide array of leukemias sensitive to inhibition of PHD histone reader function. *Cancer discovery* 4, 564-577.

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.

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

Hannah, R., Joshi, A., Wilson, N.K., Kinston, S., and Gottgens, B. (2011). A compendium of genome-wide hematopoietic transcription factor maps supports the identification of gene regulatory control mechanisms. *Exp Hematol* 39, 531-541.

Herblot, S., Steff, A.M., Hugo, P., Aplan, P.D., and Hoang, T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* 1, 138-144.

Hoang, T., and Hoang, T. (2010). The T-ALL paradox in cancer. *Nat Med* 16, 1185-1186.

Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., Atzberger, A., Brown, J., Soneji, S., Green, J., Colman, S., Piacibello, W., Buckle, V., et al. (2008). Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319, 336-339.

Jordan, C.T., and Lemischka, I.R. (1990). Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 4, 220-232.

Kelliher, M.A., Seldin, D.C., and Leder, P. (1996). Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *Embo J* 15, 5160-5166.

Kent, D., Copley, M., Benz, C., Dykstra, B., Bowie, M., and Eaves, C. (2008). Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 1926-1930.

Kirkpatrick, J., Marcon, V., Nelson, J., Kremer, K., and Andrienko, D. (2007). Charge mobility of discotic mesophases: a multiscale quantum and classical study. *Physical review letters* 98, 227402.

Lacombe, J., Herblot, S., Rojas-Sutterlin, S., Haman, A., Barakat, S., Iscove, N.N., Sauvageau, G., and Hoang, T. (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood* 115, 792-803.

Lacombe, J., Krosl, G., Tremblay, M., Gerby, B., Martin, R., Aplan, P.D., Lemieux, S., and Hoang, T. (2013). Genetic interaction between KIT and Scl. *Blood* 122, 1150-1161.

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.

Lia, F., Rajotte, D., Clark, S.C., and Hoang, T. (1996). A dominant negative granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha chain reveals the multimeric structure of the receptor complex. *J Biol Chem* 271, 28287-28293.

Lieu, Y.K., and Reddy, E.P. (2009). Conditional c-myc knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21689-21694.

Lin, Y.W., Slape, C., Zhang, Z., and Aplan, P.D. (2005). NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. *Blood* 106, 287-295.

Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059-1064.

Magnusson, M., Brun, A.C., Miyake, N., Larsson, J., Ehinger, M., Bjornsson, J.M., Wutz, A., Sigvardsson, M., and Karlsson, S. (2007). HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood* 109, 3687-3696.

Massa, S., Balciunaite, G., Ceredig, R., and Rolink, A.G. (2006). Critical role for c-kit (CD117) in T cell lineage commitment and early thymocyte development in vitro. *Eur J Immunol* 36, 526-532.

McCormack, M.P., Shields, B.J., Jackson, J.T., Nasa, C., Shi, W., Slater, N.J., Tremblay, C.S., Rabbitts, T.H., and Curtis, D.J. (2013). Requirement for Lyl1 in a model of Lmo2-driven early T-cell precursor ALL. *Blood* 122, 2093-2103.

McCormack, M.P., Young, L.F., Vasudevan, S., de Graaf, C.A., Codrington, R., Rabbitts, T.H., Jane, S.M., and Curtis, D.J. (2010). The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science* 327, 879-883.

Mellentin, J.D., Smith, S.D., and Cleary, M.L. (1989). lyl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell* 58, 77-83.

Mullighan, C.G., Phillips, L.A., Su, X., Ma, J., Miller, C.B., Shurtleff, S.A., and Downing, J.R. (2008). Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322, 1377-1380.

Nagel, S., Venturini, L., Meyer, C., Kaufmann, M., Scherr, M., Drexler, H.G., and Macleod, R.A. (2009). Multiple mechanisms induce ectopic expression of LYL1 in subsets of T-ALL cell lines. *Leuk Res*.

Nguyen, L.V., Vanner, R., Dirks, P., and Eaves, C.J. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 12, 133-143.

O'Brodovich, H., Rafii, B., and Post, M. (1990). Bioelectric properties of fetal alveolar epithelial monolayers. *The American journal of physiology* 258, L201-206.

Palmqvist, L., Pineault, N., Wasslavik, C., and Humphries, R.K. (2007). Candidate genes for expansion and transformation of hematopoietic stem cells by NUP98-HOX fusion genes. *PLoS One* 2, e768.

Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual review of immunology* 25, 649-679.

Pui, C.H., and Evans, W.E. (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354, 166-178.

Schmitt, T.M., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749-756.

Seibel, N.L. (2008). Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 374-380.

Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., et al. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 506, 328-333.

Slape, C., Liu, L.Y., Beachy, S., and Aplan, P.D. (2008). Leukemic transformation in mice expressing a NUP98-HOXD13 transgene is accompanied by spontaneous mutations in *Nras*, *Kras*, and *Cbl*. *Blood* 112, 2017-2019.

Smith, S., Tripathi, R., Goodings, C., Cleveland, S., Mathias, E., Hardaway, J.A., Elliott, N., Yi, Y., Chen, X., Downing, J., et al. (2014). LIM Domain Only-2 (LMO2) Induces T-Cell Leukemia by Two Distinct Pathways. *PLoS One* 9, e85883.

Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.M., Regnault, A., Garcia-Peydro, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.L., and Sigaux, F. (2005). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 106, 274-286.

Souroullas, G.P., Salmon, J.M., Sablitzky, F., Curtis, D.J., and Goodell, M.A. (2009). Adult hematopoietic stem and progenitor cells require either *Lyl1* or *Scl* for survival. *Cell Stem Cell* 4, 180-186.

Speleman, F., Cauwelier, B., Dastugue, N., Cools, J., Verhasselt, B., Poppe, B., Van Roy, N., Vandesompele, J., Graux, C., Uyttebroeck, A., et al. (2005). A new recurrent inversion, *inv(7)(p15q34)*, leads to transcriptional activation of *HOXA10* and *HOXA11* in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 19, 358-366.

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.

Tremblay, C.S., Hoang, T., and Hoang, T. (2010). Early T cell differentiation lessons from T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Prog Mol Biol Transl Sci* 92, 121-156.

Valent, P., Bonnet, D., Wohrer, S., Andreeff, M., Copland, M., Chomienne, C., and Eaves, C. (2013). Heterogeneity of neoplastic stem cells: theoretical, functional, and clinical implications. *Cancer Res* 73, 1037-1045.

Van Vlierberghe, P., and Ferrando, A. (2012). The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 122, 3398-3406.

Van Vlierberghe, P., van Grotel, M., Tchinda, J., Lee, C., Beverloo, H.B., van der Spek, P.J., Stubbs, A., Cools, J., Nagata, K., Fornerod, M., et al. (2008). The recurrent *SET-NUP214* fusion as a new *HOXA* activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 111, 4668-4680.

Walshe, K., Healy, M.J., Speekenbrink, A.B., Keane, C.T., Weir, D.G., and O'Moore, R.R. (1990). Effects of an enteric anaerobic bacterial culture supernatant and deoxycholate on intestinal calcium absorption and disaccharidase activity. *Gut* 31, 770-776.

Wang, G.G., Song, J., Wang, Z., Dormann, H.L., Casadio, F., Li, H., Luo, J.L., Patel, D.J., and Allis, C.D. (2009). Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature* 459, 847-851.

Waskow, C., Paul, S., Haller, C., Gassmann, M., and Rodewald, H.R. (2002). Viable c-KIT(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity* 17, 277-288.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135, 1118-1129.

Wilson, N.K., Foster, S.D., Wang, X., Knezevic, K., Schutte, J., Kaimakis, P., Chilarska, P.M., Kinston, S., Ouwehand, W.H., Dzierzak, E., et al. (2010). Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* 7, 532-544.

Yui, M.A., Feng, N., and Rothenberg, E.V. (2010). Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus. *J Immunol* 185, 284-293.

Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., et al. (2012a). The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481, 157-163.

Zhang, J.A., Mortazavi, A., Williams, B.A., Wold, B.J., and Rothenberg, E.V. (2012b). Dynamic transformations of genome-wide epigenetic marking and transcriptional control establish T cell identity. *Cell* 149, 467-482.

Zhong, Y., Jiang, L., Hiai, H., Toyokuni, S., and Yamada, Y. (2007). Overexpression of a transcription factor LYL1 induces T- and B-cell lymphoma in mice. *Oncogene* 26, 6937-6947.

Zohren, F., Souroullas, G.P., Luo, M., Gerdemann, U., Imperato, M.R., Wilson, N.K., Gottgens, B., Lukov, G.L., and Goodell, M.A. (2012). The transcription factor Lyl-1 regulates lymphoid specification and the maintenance of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 13, 761-769.

Acknowledgements. We thank Danièle Gagné and Gael Dulude for assistance with flow cytometry, Julie Paquette for the Special Pathogen Free facility, Véronique Litalien for mouse husbandry and Raphaëlle Lambert for sequencing.

Author contributions. Contribution: BG, MT, DFTV and AH designed and performed experiments, analyzed the data and made the figures. TH and PDA designed the research, analyzed the data and wrote the paper.

Funding. The work was funded by grants from the Leukemia Lymphoma Society of Canada (TH), the Canadian Cancer Society Research Institute (CCSRI) (T.H.), and the MERST Québec (T.H.), and by studentships from the Cole Foundation (B.G. and D.F.T.V.), the Molecular Biology program (M.T.), FRQS (B.G.), and by the intramural program of the NIH (PDA, ESP). The infrastructure of IRIC is supported in part by a group grant from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Supplementary figures and tables

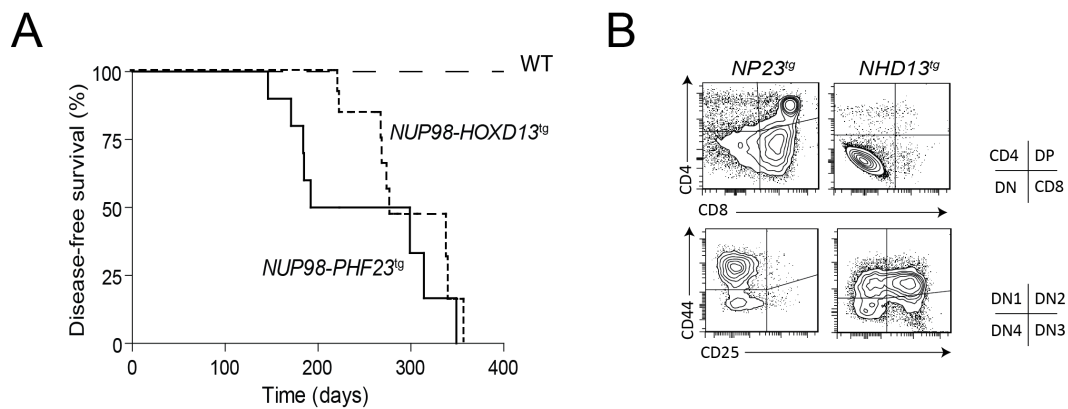


Figure S1. *NUP98-PHF23* (*NP23*) and *NUP98-HOXD13* (*NHD13*) fusion genes induce acute leukemias in mice.

(A) Kaplan-Meier curves of the time to leukemia for *NUP98-PHF23*^{tg} (n=8), *NUP98-HOXD13*^{tg} (n=8) and WT (n=40) mice. (B) Representative FACS profile of leukemic cells from *NUP98-PHF23*^{tg} and *NUP98-HOXD13*^{tg} mice.

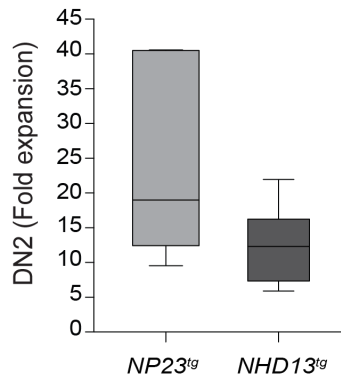


Figure S2. Expansion of *NUP98-PHF23*^{tg} and *NUP98-HOXD13*^{tg} DN2 population after transplantation of purified cells.

Equal number of *NP23*^{tg} and *NHD13*^{tg} DN2 thymocyte sub-population were purified and transplanted into sublethally irradiated mice as described in Figure 1F. Fold expansion *in vivo* of DN2 population was calculated after transplantation.

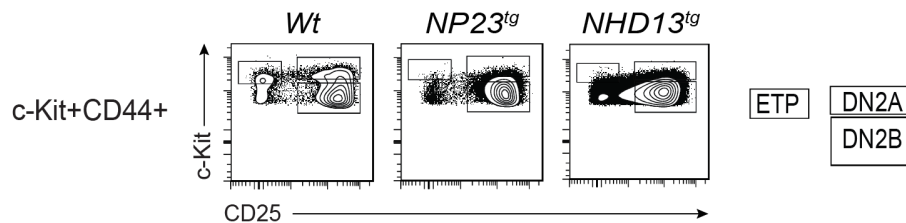


Figure S3. Fine-tuned identities of immature DN populations in Wt, *NUP98-PHF23*^{tg} and *NUP98-HOXD13*^{tg} mice. Representative FACS profile of ETP, DN2a and DN2b populations in Wt, *NUP98-PHF23*^{tg} and *NUP98-HOXD13*^{tg} thymocytes according to their expression of c-KIT and CD25 marker gated in DNc-KIT+CD44+ population.

Table SI : Sequence analysis of the D1-J1S4 rearrangement from purified preleukemic *NUP98-PHF23*^{tg} thymocytes after primary and tertiary transplantations

Sample		D	N	J	
NP23-1	DB1	<u>GGACAGG</u> <u>GGGC</u>	ATG	<u>TTTCCAACGAAAGATTATT</u>	J1S4
NP23-3	DB1	<u>GGACAGG</u> <u>GGGC</u>	GAG	<u>TTTCCAACGAAAGATTATTTTTCGGTCATGGAAC</u> <u>CAAGCTGTCTGTCCTGG</u>	J1S4
NP23-3	DB1	<u>GGACAGG</u> <u>GGGC</u>	AAAAA	<u>TTTCCAACGAAAGATTATTTTTCGGTCATGGAAC</u> <u>CAAGCTGTCTGTCCTGG</u>	J1S4

Nucleotides indicated in red have been deleted from germline D and J segments during the recombination process

Table SII : Sequences of oligonucleotide primers used for *TCRb* gene rearrangements

Oligonucleotide	Sequence
5'TCRBD1.1	CTTATCTGGTGGTTTCTTCCAGC
3'TCRBJ1S4.2	TTACATAACCAGGACAGACAGC
3'TCRBJ1S6.1	AGACCATGGTCATCCAACACAGGC
5'TCRBD2.2	TGTATCACGATGTAACATTGTGG
3'TCRBJ2S4.2	TACTGGGTGTCTTGGTTCACAGC
3'TCRBJ2S7.2	TTGAGAGCTGTCTCCTACTATCG

Discussion

1. Vue globale du projet

La chimiothérapie actuelle traite les cellules hyperprolifératives mais les CSC y échappent, entraînant des récives après traitement. Cette observation met en lumière la nécessité de développer une thérapie complémentaire ciblant les CSC résistantes dans le but d'éradiquer la totalité de la population tumorigène. L'acquisition d'un comportement de CS par les cellules somatiques est un événement oncogénique essentiel à l'initiation de la leucémie. De ce fait, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques abrogeant les CSC demande une compréhension étoffée des mécanismes par lesquelles les cellules somatiques, par exemple les thymocytes, acquièrent des propriétés de SC, notamment l'auto-renouvellement, au cours de la leucémogénèse.

L'objectif principal de mon travail de maîtrise consiste à identifier et définir le rôle des oncogènes *NP23* et *NHD13* dans l'initiation de la leucémogénèse, et plus particulièrement leur implication dans la reprogrammation des précurseurs thymiques en CS-préL. Nous émettons l'hypothèse selon laquelle *NP23* et *NHD13*, deux oncogènes de fusion observés de manière récurrente chez les patients atteints de leucémie aigue, sont impliqués dans le processus d'acquisition de potentiel aberrant d'auto-renouvellement par les progéniteurs thymiques en pré-leucémie. Les différentes familles d'oncogènes identifiées de manière mutuellement exclusive dans la LAL-T et l'implication de trois de ces altérations génétiques, *SCL*, *LMO1* et *LMO2*, dans la reprogrammation des progéniteurs thymiques non-renouvelables en cellules munies de potentiel régénératif suggèrent que les régulateurs en amont du cluster HOXA, spécifiquement les protéines de fusion NUP98, jouent aussi un rôle dans l'acquisition de

propriétés de CS par les thymocytes en pré-leucémie. Identifier et caractériser le compartiment cible d'initiation de la leucémie permettra une exploration approfondie du processus de reprogrammation des thymocytes en CS-préL, compréhension fondamentale à l'élaboration de thérapie ciblée contre les CSC.

Mon projet de recherche a conduit à la caractérisation des CS-préL dans les modèles murins exprimant de manière ectopique les oncogènes *NP23* et *NHD13*, à l'identification d'une voie de signalisation impliquée dans la reprogrammation oncogénique ainsi qu'à la détermination d'un mécanisme moléculaire conférant des propriétés aberrantes d'auto-renouvellement aux progéniteurs thymiques en pré-leucémie.

2. Thymocytes renouvelables en pré-leucémie

La pré-leucémie reste peu caractérisée, particulièrement chez l'Homme, puisqu'elle est asymptomatique chez la plupart des patients. Pourtant, cette phase initiatrice de la leucémogénèse est décisive et indispensable, car en résulte l'émergence des CS-préL, précurseurs des CSC (Corces-Zimmerman et al., 2014). En LAL-T, les CS-préL résident seulement dans un sous-ensemble de la population thymique et possèdent des propriétés anormales de CS, telles l'auto-renouvellement, permettant de maintenir la masse tumorigène dans le temps et l'espace. Afin de discriminer les CS-préL parmi le répertoire hétérogène de progéniteurs thymiques, nous proposons de cibler les thymocytes arborant une activité aberrante d'auto-renouvellement en performant des essais de transplantation en pré-leucémie. En parallèle, l'évolution clonale et les étapes de développement des thymocytes, corroborant l'identification du compartiment tumorigène, pourront être évaluées par essais de clonalité via l'analyse du réarrangement du loci *Tcrβ*. La pré-leucémie a été étudiée efficacement par l'utilisation de modèles murins transgéniques exprimant ectopiquement les oncogènes de fusion humains *NP23* et *NHD13*, clonés en aval du promoteur pan-hématopoïétique *Vav*. En effet, ce dernier permet une expression stable et efficace des transgènes dans tous les compartiments hématopoïétiques, sans affecter les autres types cellulaires, et s'avère tout aussi opérant chez les précurseurs que chez les cellules matures, un avantage non-négligeable pour nos recherches puisque les cellules d'intérêt de l'étude se retrouvent aux stades précoces du développement lymphocytaire T. Les phases pré-leucémiques des souris *NP23^{tg}* et *NHD13^{tg}* ont été estimées à huit semaines et moins, d'abord par l'absence de symptômes à cet âge, le nombre réduit de thymocytes dans le thymus, et par les changements phénotypiques modérés

observés par cytométrie en flux, suggérant respectivement un blocage de différenciation caractéristique de la pré-leucémie et un stade précoce de la leucémogénèse. Puisque mon projet consiste à étudier le comportement des thymocytes en pré-leucémie, les souris utilisées pour toutes les expériences, sauf avis contraire, étaient âgées de huit semaines.

2.1 Essais de transplantation : qu'est-ce que nous dit la biologie normale ?

Les essais de transplantation permettent d'évaluer l'activité d'auto-renouvellement d'une population cellulaire spécifique. Les CS et ses descendants immédiats arborent ce potentiel régénératif intrinsèque, leur permettant de greffer au receveur et de maintenir cette propriété en transplantations sériées. Différemment, les cellules somatiques sont destinées uniquement à la différenciation et à un espace temporel défini, représenté par l'absence de prise de greffe post-transplantation. En d'autres mots, les CS-préL se distinguent des cellules somatiques normales en montrant des propriétés d'auto-renouvellement reflétées par leur capacité à reconstituer son compartiment cellulaire après transplantation.

Les thymocytes sont un exemple de cellules normalement dépourvues de propriété d'auto-renouvellement (Goldschneider et al., 1986). Depuis des décennies, les immunologistes ont tenté de transplanter des thymocytes dans des modèles de souris congéniques, toutefois en vain (Hoang and Hoang, 2010). En découla un dogme en biologie établissant que les thymocytes ont une longévité définie et que la production de lymphocytes T est perpétuée grâce à l'apport continu de progéniteurs provenant de la moelle vers le thymus. D'une part, les thymocytes normaux injectés dans des souris au développement thymique déficient ont démontré un potentiel, quoi que limité, de prise de greffe (Frey et al., 1992; Takeda et al.,

1996). Ce phénomène est expliqué par le fait que les thymocytes ont la capacité de reconstituer le thymus après transplantation dans un contexte où l'espace anormalement inoccupé de la niche thymique et l'absence de compétitivité des thymocytes résidents permettent aux thymocytes dérivés du donneur de coloniser le thymus de l'hôte. Néanmoins, les thymocytes dérivés du donneur ne suffisent pas à maintenir une thymopoïèse normale à long terme, soutenant la théorie de non renouvellement des précurseurs thymiques normaux. En conséquence, ces observations indiquent que les CS-préL impliquées dans l'initiation de la LAL-T proviennent de progéniteurs non-renouvelables reprogrammés précocement dans le processus de leucémogénèse en thymocytes renouvelables.

3. Identification du compartiment DN2 comme cible de reprogrammation par les oncogènes de fusion *NP23* et *NHD13*

Comparativement aux CS leucémiques qui envahissent les systèmes sanguins et lymphatiques, les CS-préL en LAL-T se restreignent au thymus et démontrent un niveau de prolifération ralenti, dû typiquement à un arrêt de la différenciation. La caractérisation phénotypique de la population thymique des souris transgéniques *NP23* et *NHD13* à l'équilibre révèle, pour les deux modèles, une expansion du compartiment DN comparée aux thymocytes sauvages du même âge, suggérant un blocage de différenciation au stade DN en pré-leucémie. Les expériences de transplantation ont révélé un potentiel aberrant de reconstitution thymique chez les thymocytes dérivés des donneurs *NP23^{tg}* et *NHD13^{tg}*, en plus d'un accroissement du compartiment DN post-transplantation, et ce pour tous les sous-groupes DN, spécifiquement chez les DN2 *NP23^{tg}*. Ces résultats proposent que le thymocyte reprogrammé et capable de reconstituer le thymus en transplantation est un progéniteur au profil DN. Les transplantations sériées viennent renforcer cette hypothèse et confirmer les propriétés d'auto-renouvellement d'un sous-groupe de thymocytes transgéniques, en révélant l'amplification des populations immatures DN1 et DN2, et ce pour les deux modèles. Cette exploration phénotypique concorde avec notre approche moléculaire. En effet, les essais de clonalité montrent l'émergence d'une population de thymocytes au *Tcrβ* non-réarrangé, impliquant que le progéniteur ciblé par les oncogènes de fusion précède le stade DN3 durant lequel débute le réarrangement du *Tcrβ*.

En isolant et en transplantant individuellement les populations du stade DN, nous avons évalué l'activité d'auto-renouvellement de chacune d'entre elles. L'analyse phénotypique après transplantation a révélé que seulement les thymocytes en DN2 ont reconstitué le thymus de l'hôte, traduisant du potentiel d'auto-renouvellement de cette population. Ce résultat concorde avec les précédentes observations, soit l'expansion d'un compartiment immature au *Tcrβ* non-réarrangé, et vient confirmer l'identité de la cellule cible de reprogrammation des oncogènes *NP23* et *NHD13*: un thymocyte en DN2. Toutefois, l'augmentation du nombre de cellules en DN1 observée dans les essais de transplantation en série contredit l'absence de greffe, s'expliquant, comme mentionné plus haut, par l'hétérogénéité des DN1. En effet, une proportion du compartiment, les ETP, se distinguent par l'expression du marqueur de surface KIT et ce sont ces précurseurs qui démontrent une progression au cours des transplantations sériées. Le potentiel de reconstitution thymique des ETP s'ajoutant à celui de la sous-population DN2 pourrait expliquer l'écart entre la reconstitution thymique majoritaire après transplantation de thymocytes totaux comparée à la greffe partielle des DN2 purifiés, c'est-à-dire excluant les ETP. De plus, nous avons montré que les DN2b, KIT^{low} , constituaient la majorité des thymocytes dérivés du donneur, permettant un raffinement de la caractérisation des CS-préL. Il semblerait donc que dans les modèles *NP23* et *NHD13*, l'initiation de la leucémogénèse implique un continuum de progéniteurs thymiques au dénominateur commun, KIT, mettant en lumière une potentielle collaboration de la voie de signalisation tyrosine kinase dans la reprogrammation des thymocytes pré-leucémiques. Cependant, il serait essentiel d'isoler DN2a, DN2b et ETP du reste de la population immature et d'évaluer l'auto-renouvellement de manière individuelle pour confirmer l'identité précise des CS-préL. La limitation de cette expérience demeure

l'accessibilité aux cellules DN2 dans les modèles de souris transgéniques mais surtout dans les contrôles sauvages, où la fraction de DN2 dans le thymus est infime (moins de 5%). Bien que le compartiment DN2 s'épande sous l'influence des oncogènes *NP23* et *NHD13*, rappelons qu'il existe un blocage de différenciation résultant en un nombre absolu limité de thymocytes, particulièrement de DN2 en équilibre, soit avant expansion. Une solution serait de cultiver et d'induire la différenciation de progéniteurs précoces *in vitro* sur un stroma propice à la culture cellulaire de thymocytes, soit OP9-DL1 ou MS5-DL4, jusqu'au stade de développement lymphocytaire T désiré (Schmitt and Zuniga-Pflucker, 2002; Yui et al., 2010). Ainsi, il serait possible d'évaluer l'activité d'auto-renouvellement des DN2 sauvages et des DN2 transgéniques en équilibre retrouvés en trop faible compte *in vivo*.

3.1 Hétérogénéité des collaborateurs oncogéniques

Il est crucial d'identifier précisément le sous-groupe de CS-préL puisque ce sont les particularités de ces cellules qui inspireront le design de nouvelles cibles thérapeutiques contre les CSC (Goossens and Van Vlierberghe, 2014). Les événements oncogéniques collaborateurs nécessaires à la survie et à la prolifération tumorigénique varient selon les altérations génétiques initiatrices, lesquelles confèrent un potentiel aberrant d'auto-renouvellement aux cellules somatiques. Dans les modèles *SCL/LMO1* et *LMO2*, les thymocytes pré-leucémiques résident dans le compartiment DN3, ce qui est dû à la collaboration avec NOTCH1 et le pré-TCR qui sont tout deux activés à ce stade (Gerby et al., 2014). Étonnamment, les caractérisations phénotypiques et moléculaires des modèles surexprimant les oncogènes de fusion *NUP98* suggèrent plutôt que la population de CS-préL se situe en DN2b, rendant peu

probable l'identification de mécanismes communs avec les précédents spécimens. De ce fait, puisque le contexte cellulaire modifie l'activité des oncogènes, nous pouvons conclure que l'identité des CS-préL diffère selon l'oncogène de reprogrammation.

En explorant le rôle de KIT dans la leucémogénèse, nous avons découvert que le traitement à l'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, réduisait considérablement le taux de survie et le potentiel de prise de greffe des thymocytes *NP23^{tg}* et *NHD13^{tg}*, proposant que l'activité de KIT est indispensable à la transformation des thymocytes en CS-préL. Il est intéressant de noter qu'une étude des différents inhibiteurs de tyrosine kinase a révélé une affinité importante de l'imatinib envers le récepteur KIT (Anastassiadis et al., 2011). De plus, ce composé est déjà utilisé comme agent chimiothérapeutique pour traiter les tumeurs gastro-intestinales avec activation de KIT (Kent et al., 2008). Ensemble, la grande affinité de ce médicament pour les cellules KIT⁺ et son emploi dans d'autres types de cancer potentialisent une utilisation future de l'imatinib chez les patients atteints de LAL-T et présentant une altération de l'activité des gènes *HOXA*. Une seconde approche dans la considération de la tyrosine kinase comme collaborateur de la reprogrammation des thymocytes en CS-préL consisterait à induire la fonction de KIT dans des progéniteurs *NP23^{tg}* et *NHD13^{tg}* normalement dépourvus de son activité, tels que les thymocytes en DN3 ou DN4. L'acquisition aberrante de propriétés d'auto-renouvellement par ce nouveau compartiment exprimant ectopiquement KIT consoliderait le rôle du récepteur dans la reprogrammation oncogénique en LAL-T et ouvrirait une avenue justifiée à la thérapie ciblée.

4. Une signature d'auto-renouvellement commune pour les oncogènes en LAL-T

Les DN2, potentiellement DN2b, sont les seuls à acquérir une activité d'auto-renouvellement en présence des oncogènes de fusion *NUP98*, rendant pertinente une exploration transcriptionnelle de la population cible de reprogrammation. Les oncogènes *SCL* et *LMO1* ont été étudiés comme effecteur en amont des gènes d'auto-renouvellement *Lyl1* et *Hhex*. En effet, dans les modèles transgéniques du même nom, il a été démontré que ces gènes étaient activés de manière aberrante chez les thymocytes pré-leucémiques, établissant que *Lyl1* et *Hhex* fixent le seuil de reprogrammation des progéniteurs non-renouvelables en CS-préL (Gerby et al., 2014). *Hoxa9* et *Hoxa10*, des gènes d'auto-renouvellement activés dans les CSH mais inactifs dans les progéniteurs thymiques normaux, démontrent une activité importante dans ces derniers en présence des oncogènes de fusion *NUP98* (Novak et al., 2012). Le profil transcriptionnel des CS-préL après transplantation démontre qu'en plus de l'activation de gènes *Hoxa*, la signature de CS des DN2 *NP23^{tg}* et *NHD13^{tg}* correspond à celle observée dans les modèles *SCL-LMO1*, soit un accroissement marqué de *Lyl1* et *Hhex*. De plus, l'activité d'auto-renouvellement est abrogée par les ARN interférents contre *Lyl1* et *Hhex*, indiquant leur implication fonctionnelle en aval de *NP23* et *NHD13*.

D'abord, cette observation consolide la fonction de reprogrammation des oncogènes de fusion ainsi que le potentiel d'auto-renouvellement de la population DN2. Nous proposons que *NP23* et *NHD13* régulent directement l'expression des gènes d'auto-renouvellement en se liant au promoteur de ces derniers via leur HD. Cette hypothèse peut être confirmée par des essais fonctionnels, tels l'immunoprécipitation de la chromatine dirigée contre *Lyl1* et *Hhex*

(McCormack et al., 2010). Des résultats préliminaires par ChIP suggèrent une interaction directe entre la protéine NP23 et ces gènes d'auto-renouvellement, suggérant un mécanisme potentiel de reprogrammation par les oncogènes de fusion NUP98. Ensuite, il est intéressant de signaler la présence d'une signature commune des différents oncogènes en LAL-T. En effet, *Lyl1* et *Hhex* semblent fixer le seuil de reprogrammation des précurseurs thymiques en CS-préL sous l'influence de différents facteurs de transcription ectopiques. Cela suggère que le mécanisme de reprogrammation durant l'initiation de la leucémogénèse est indépendant de l'identité de la cellule cible de reprogrammation, soit la DN3 pour *SCL/LMO1* et la DN2 pour les régulateurs du cluster *HOXA*, apportant des réponses quant à la question de l'exclusivité des oncogènes en LAL-T.

4.1 Une même thérapie pour tous les oncogènes en LAL-T?

La fonction commune des facteurs de transcription dans la reprogrammation des cellules somatiques en thymocytes aux propriétés d'auto-renouvellement met en lumière une cible thérapeutique potentielle dans l'éradication des CS-préL, indépendamment de l'altération génétique initiale. Bien que l'imatinib semble efficace dans l'abrogation des capacités régénératives des thymocytes pré-leucémiques du compartiment DN2, il est peu probable que ce médicament puisse agir dans tous les cas de LAL-T puisque il inhibe une tyrosine kinase active spécifiquement dans les stades immatures du développement thymique normal. De plus, l'inhibiteur de tyrosine kinase est non-spécifique aux CS-préL, au détriment des autres populations cellulaires exprimant le récepteur KIT, telles que les CSH et autres progéniteurs lymphocytaires. Cet inconvénient met de l'avant le besoin d'un traitement ciblant des

propriétés de CS-préL. Nous proposons donc de performer un criblage à haut-débit de composés approuvés par le Food and Drug Administration (FDA) qui ont été précédemment identifiés comme affectant l'auto-renouvellement des cellules initiatrices de leucémie. Cette expérience consiste à incuber les DN2 exprimant ectopiquement les oncogènes NP23 et NHD13 en présence ou absence de médicaments pendant 7 jours pour ensuite observer la viabilité des cellules et le niveau de différenciation cellulaire par cytométrie en flux à haut-débit. Par la suite, nous évaluerons l'effet des inhibiteurs sélectionnés sur l'activité d'auto-renouvellement des CS-préL conféré par les oncogènes NP23 et NHD13 *in vivo* en performant des essais de transplantation. Étant donné que les oncogènes en LAL-T démontrent des fonctions communes, l'impact des composés sur l'auto-renouvellement des CS-préL induit par d'autres familles d'oncogènes sera aussi considéré. Ce projet devrait conduire à la découverte d'une thérapie ciblant spécifiquement la fonction d'auto-renouvellement des thymocytes pré-leucémiques.

Conclusion

Mon travail de maîtrise a conduit à l'évaluation du rôle des oncogènes de fusion en amont du cluster *HOXA*, soit *NP23* et *NHD13*, dans l'initiation de la leucémogénèse T. Les essais de transplantation ont permis d'étudier l'activité aberrante d'auto-renouvellement des thymocytes en pré-leucémie et d'identifier les DN2 comme cellules cibles de reprogrammation chez les modèles murins transgéniques. Ces observations ont été confirmées par des essais de clonalité, où nous avons observé l'émergence d'une population cellulaire au *Tcrβ* non-réarrangé, typique des stades précoces de la thymopoïèse. De plus, nous avons démontré qu'un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique au récepteur KIT, lequel est activé dans les populations immatures ETP et DN2, entraîne une diminution de la survie et de l'auto-renouvellement chez les CS-préL. Cette observation suggère une collaboration oncogénique entre la voie de signalisation tyrosine kinase et les oncogènes de fusion *NUP98*.

D'autre part, le profil transcriptionnel des CS-préL a révélé une signature de CS similaire à celle démontrée dans les modèles *SCL*, *LMO1* et *LMO2*, soit l'activation aberrante des gènes d'auto-renouvellement *Hoxa9*, *Lyl1* et *Hhex*, proposant une fonction commune des différentes familles de facteurs de transcription en LAL-T et ouvrant la voie à une cible thérapeutique visant l'abrogation des cellules initiatrices en leucémie, indépendamment de l'oncogène impliqué. De plus, l'inhibition d'expression de *Lyl1* et *Hhex* résulte en une altération du potentiel de greffe des thymocytes pré-leucémiques *NP23^{tg}* et *NHD13^{tg}*, confirmant leur implication dans la reprogrammation des progéniteurs non-renouvelables en CS-préL. Mon projet de recherche collabore à l'avancement dans la quête d'une thérapie

ciblée contre les CSC et permettra une meilleure compréhension des évènements initiateurs en pré-leucémie, particulièrement en LAL-T.

Bibliographie

Abbott, A. (2006). Cancer: the root of the problem. *Nature* 442, 742-743.

Anastassiadis, T., Deacon, S.W., Devarajan, K., Ma, H., and Peterson, J.R. (2011). Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology* 29, 1039-1045.

Aplan, P.D., Jones, C.A., Chervinsky, D.S., Zhao, X., Ellsworth, M., Wu, C., McGuire, E.A., and Gross, K.W. (1997). An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* 16, 2408-2419.

Bansal, D., Scholl, C., Frohling, S., et al. (2006). Cdx4 dysregulates Hox gene expression and generates acute myeloid leukemia alone and in cooperation with Meis1a in a murine model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(45), 16924-16929.

Bei, L., Huang, W., Wang, H., Shah, C., Horvath, E., and Eklund, E. (2011). Hoxa10 activates CDX4 transcription and Cdx4 activates HOXA10 transcription in myeloid cells. *J Biol Chem* 286, 19047-19064.

Bhandoola, A., von Boehmer, H., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* 26, 678-689.

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.

Choi, C.W., Chung, Y.J., Slape, C., and Aplan, P.D. (2009). A NUP98-HOXD13 fusion gene impairs differentiation of B and T lymphocytes and leads to expansion of thymocytes with partial TCRB gene rearrangement. *Journal of immunology* *183*, 6227-6235.

Chowdhury, D., and Sen, R. (2003). Transient IL-7:IL-7R signaling provides a mechanism for feedback inhibition of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Immunity* *18*, 229-241.

Clappier, E., Gerby, B., Sigaux, F., Delord, M., Touzri, F., Hernandez, L., Ballerini, P., Baruchel, A., Pflumio, F., and Soulier, J. (2011). Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J Exp Med* *208*, 653-661.

Cleveland, S.M., Smith, S., Tripathi, R., Mathias, E.M., Goodings, C., Elliott, N., Peng, D., El-Rifai, W., Yi, D., Chen, X., *et al.* (2013). Lmo2 induces hematopoietic stem cell-like features in T-cell progenitor cells prior to leukemia. *Stem Cells* *31*, 882-894.

Corces-Zimmerman, M.R., Hong, W.J., Weissman, I.L., Medeiros, B.C., and Majeti, R. (2014). Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 2548-2553.

Demetri, G.D., von Mehren, M., Blanke, C.D., Van den Abbeele, A.D., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Heinrich, M.C., Tuveson, D.A., Singer, S., Janicek, M., *et al.* (2002). Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* *347*, 472-480.

Downing, J.R., Wilson, R.K., Zhang, J., Mardis, E.R., Pui, C.H., Ding, L., Ley, T.J., and Evans, W.E. (2012). The Pediatric Cancer Genome Project. *Nat Genet* *44*, 619-622.

Eppert, H.D., and Goddard, K.B. (2010). Administration of amiodarone during resuscitation of ventricular arrhythmias. *Journal of emergency nursing: JEN : official publication of the Emergency Department Nurses Association* 36, 26-28.

Ferrando, A.A., Herblot, S., Palomero, T., Hansen, M., Hoang, T., Fox, E.A., and Look, A.T. (2004). Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103, 1909-1911.

Ferrando, A.A., Neuberg, D.S., Staunton, J., Loh, M.L., Huard, C., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Pui, C.H., Downing, J.R., Gilliland, D.G., *et al.* (2002). Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1, 75-87.

Frey, J.R., Ernest, B., Surh, C.D., and Sprent, J. (1992). Thymus-grafted SCID mice show transient thymopoiesis and limited depletion of V beta 11+ T cells. *Journal of experimental medicine* 175, 1067-1071.

Gangemi, R., Paleari, L., Orengo, A.M., Cesario, A., Chessa, L., Ferrini, S., and Russo, P. (2009). Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance. *Current medicinal chemistry* 16, 1688-1703.

Gerby, B., Tremblay, C.S., Tremblay, M., Rojas-Sutterlin, S., Herblot, S., Lemieux, S., Hebert, J., Sauvageau, G., Lecuyer, E., Veiga, D., *et al.* (2014). SCL, LMO1 and Notch1 reprogram thymocytes into self-renewing cells. *PLoS genetics* *Accepted for publication*.

Goldschneider, I., Komschlies, K.L., and Greiner, D.L. (1986). Studies of thymocytopoiesis in rats and mice. I. Kinetics of appearance of thymocytes using a direct intrathymic adoptive transfer assay for thymocyte precursors. *J Exp Med* 163, 1-17.

Goossens, S., and Van Vlierberghe, P. (2014). Controlling Pre-leukemic Thymocyte Self-Renewal. *PLoS genetics* 10, e1004881.

Gough, S.M., Lee, F., Yang, F., Walker, R.L., Zhu, Y.J., Pineda, M., Onozawa, M., Chung, Y.J., Bilke, S., Wagner, E.K., *et al.* (2014). NUP98-PHF23 is a chromatin-modifying oncoprotein that causes a wide array of leukemias sensitive to inhibition of PHD histone reader function. *Cancer discovery* 4, 564-577.

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.

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

Hannah, R., Joshi, A., Wilson, N.K., Kinston, S., and Gottgens, B. (2011). A compendium of genome-wide hematopoietic transcription factor maps supports the identification of gene regulatory control mechanisms. *Exp Hematol* 39, 531-541.

Herblot, S., Steff, A.M., Hugo, P., Aplan, P.D., and Hoang, T. (2000). SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* 1, 138-144.

Hoang, T., and Hoang, T. (2010). The T-ALL paradox in cancer. *Nat Med* 16, 1185-1186.

Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., Atzberger, A., Brown, J., Soneji, S., Green, J., Colman, S., Piacibello, W., Buckle, V., *et al.* (2008). Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319, 336-339.

Jiang, Q., Li, W.Q., Aiello, F.B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A.R., and Durum, S.K. (2005). Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 513-533.

Jordan, C.T., and Lemischka, I.R. (1990). Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 4, 220-232.

Kelliher, M.A., Seldin, D.C., and Leder, P. (1996). Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *Embo J* 15, 5160-5166.

Kent, D., Copley, M., Benz, C., Dykstra, B., Bowie, M., and Eaves, C. (2008). Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 1926-1930.

Kirkpatrick, J., Marcon, V., Nelson, J., Kremer, K., and Andrienko, D. (2007). Charge mobility of discotic mesophases: a multiscale quantum and classical study. *Physical review letters* 98, 227402.

Lacombe, J., Herblot, S., Rojas-Sutterlin, S., Haman, A., Barakat, S., Iscove, N.N., Sauvageau, G., and Hoang, T. (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood* 115, 792-803.

Lacombe, J., Krosch, G., Tremblay, M., Gerby, B., Martin, R., Aplan, P.D., Lemieux, S., and Hoang, T. (2013). Genetic interaction between KIT and Scl. *Blood* 122, 1150-1161.

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.

Lia, F., Rajotte, D., Clark, S.C., and Hoang, T. (1996). A dominant negative granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha chain reveals the multimeric structure of the receptor complex. *J Biol Chem* 271, 28287-28293.

Lieu, Y.K., and Reddy, E.P. (2009). Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21689-21694.

Lin, Y.W., Slape, C., Zhang, Z., and Aplan, P.D. (2005). NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. *Blood* 106, 287-295.

Look, A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059-1064.

Magnusson, M., Brun, A.C., Miyake, N., Larsson, J., Ehinger, M., Bjornsson, J.M., Wutz, A., Sigvardsson, M., and Karlsson, S. (2007). HOXA10 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and erythroid/megakaryocyte development. *Blood* 109, 3687-3696.

Malaise, M., Steinbach, D. and Corbacioglu, S. (2009). Clinical implications of c-kit mutations in acute myelogenous leukemia. *Curr Hemato Malignancy Reports* 4, 77-82.

Martins, V.C., Ruggiero, E., Schlenner, S.M., Madan, V., Schmidt, M., Fink, P.J., von Kalle, C., and Rodewald, H.R. (2012). Thymus-autonomous T cell development in the absence of progenitor import. *J Exp Med* 209, 1409-1417.

Massa, S., Balciunaite, G., Ceredig, R., and Rolink, A.G. (2006). Critical role for c-kit (CD117) in T cell lineage commitment and early thymocyte development in vitro. *Eur J Immunol* 36, 526-532.

McCormack, M.P., Shields, B.J., Jackson, J.T., Nasa, C., Shi, W., Slater, N.J., Tremblay, C.S., Rabbitts, T.H., and Curtis, D.J. (2013). Requirement for Lyl1 in a model of Lmo2-driven early T-cell precursor ALL. *Blood* 122, 2093-2103.

McCormack, M.P., Young, L.F., Vasudevan, S., de Graaf, C.A., Codrington, R., Rabbitts, T.H., Jane, S.M., and Curtis, D.J. (2010). The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing thymocyte self-renewal. *Science* 327, 879-883.

Mellentin, J.D., Smith, S.D., and Cleary, M.L. (1989). lyl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell* 58, 77-83.

Mullighan, C.G., Phillips, L.A., Su, X., Ma, J., Miller, C.B., Shurtleff, S.A., and Downing, J.R. (2008). Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322, 1377-1380.

Nagel, S., Venturini, L., Meyer, C., Kaufmann, M., Scherr, M., Drexler, H.G., and Macleod, R.A. (2009). Multiple mechanisms induce ectopic expression of LYL1 in subsets of T-ALL cell lines. *Leuk Res.*

Nguyen, L.V., Vanner, R., Dirks, P., and Eaves, C.J. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* *12*, 133-143.

Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H.M., Filipovich, A.H., Adelstein, S., Modi, W.S., and al., e. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* *73*, 147-157.

Novak, R.L., Harper, D.P., Caudell, D., Slape, C., Beachy, S.H., and Aplan, P.D. (2012). Gene expression profiling and candidate gene resequencing identifies pathways and mutations important for malignant transformation caused by leukemogenic fusion genes. *Experimental hematology* *40*, 1016-1027.

O'Brien, S.G., Guilhot F., Goldman J.M., Hochhaus A., Hughes T.P., Radich J.P., et al. (2008). International randomized study of interferon versus STI571 (IRIS) 7-year follow-up: Sustained survival, low rate of transformation and increased rate of major molecular response (MMR) in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib (IM). *Blood* *112*, 76.

O'Brodovich, H., Rafii, B., and Post, M. (1990). Bioelectric properties of fetal alveolar epithelial monolayers. *The American journal of physiology* *258*, L201-206.

Palmqvist, L., Pineault, N., Wasslavik, C., and Humphries, R.K. (2007). Candidate genes for expansion and transformation of hematopoietic stem cells by NUP98-HOX fusion genes. *PloS one* *2*, e768.

Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2007). Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annual review of immunology* *25*, 649-679.

Puel, A., Ziegler, S.F., Buckley, R.H., and Leonard, W.J. (1998). Defective IL7R expression in T(-)B(p)NK(p) severe combined immunodeficiency. *Nature genetics* 20, 394-397.

Pui, C.H., and Evans, W.E. (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354, 166-178.

Reader, J.C., Leng, Q., Rassool, F.V., and Ning, Y. (2010). Regulation of differentiation by a PHD domain in the NUP98-PHF23 fusion protein. *Leukemia research* 34, 1094-1097.

Reader, J.C., Meekins, J.S., Gojo, I., and Ning, Y. (2007). A novel NUP98-PHF23 fusion resulting from a cryptic translocation t(11;17)(p15;p13) in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21, 842-844.

Reynaud, D., Ravet, E., Titeux, M., Mazurier, F., Renia, L., Dubart-Kupperschmitt, A., Romeo, P.H., and Pflumio, F. (2005). SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. *Blood* 106, 2318-2328.

Rich, J.N., and Bao, S. (2007). Chemotherapy and cancer stem cells. *Cell stem cell* 1, 353-355.

Schmitt, T.M., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749-756.

Seibel, N.L. (2008). Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 374-380.

Shah, N. and Sukumar, S. (2010) The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nature Reviews Cancer* 10, 361-371.

Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., *et al.* (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 506, 328-333.

Slape, C., and Aplan, P.D. (2004). The role of NUP98 gene fusions in hematologic malignancy. *Leukemia & lymphoma* 45, 1341-1350.

Slape, C., Liu, L.Y., Beachy, S., and Aplan, P.D. (2008). Leukemic transformation in mice expressing a NUP98-HOXD13 transgene is accompanied by spontaneous mutations in Nras, Kras, and Cbl. *Blood* 112, 2017-2019.

Smith, S., Tripathi, R., Goodings, C., Cleveland, S., Mathias, E., Hardaway, J.A., Elliott, N., Yi, Y., Chen, X., Downing, J., *et al.* (2014). LIM Domain Only-2 (LMO2) Induces T-Cell Leukemia by Two Distinct Pathways. *PLoS One* 9, e85883.

Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.M., Regnault, A., Garcia-Peydro, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.L., and Sigaux, F. (2005). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 106, 274-286.

Souroullas, G.P., Salmon, J.M., Sablitzky, F., Curtis, D.J., and Goodell, M.A. (2009). Adult hematopoietic stem and progenitor cells require either Lyl1 or Scl for survival. *Cell Stem Cell* 4, 180-186.

Speleman, F., Cauwelier, B., Dastugue, N., Cools, J., Verhasselt, B., Poppe, B., Van Roy, N., Vandesompele, J., Graux, C., Uyttbroeck, A., *et al.* (2005). A new recurrent inversion, *inv(7)(p15q34)*, leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 19, 358-366.

Takeda, S., Rodewald, H.R., Arakawa, H., Bluethmann, H., and Shimizu, T. (1996). MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5, 217-228.

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.

Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (1997). Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. *Hematology/oncology clinics of North America* 11, 1221-1237.

Tremblay, C.S., Hoang, T., and Hoang, T. (2010a). Early T cell differentiation lessons from T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Prog Mol Biol Transl Sci* 92, 121-156.

Tremblay, M., Tremblay, C.S., Herblot, S., Aplan, P.D., Hebert, J., Perreault, C., and Hoang, T. (2010b). Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes & development* 24, 1093-1105.

Trigueros, C., Hozumi, K., Silva-Santos, B., Bruno, L., Hayday, A.C., Owen, M.J., and Pennington, D.J. (2003). Pre-TCR signaling regulates IL-7 receptor alpha expression promoting thymocyte survival at the transition from the double-negative to double-positive stage. *European journal of immunology* 33, 1968-1977.

Valent, P., Bonnet, D., Wohrer, S., Andreeff, M., Copland, M., Chomienne, C., and Eaves, C. (2013). Heterogeneity of neoplastic stem cells: theoretical, functional, and clinical implications. *Cancer research* 73, 1037-1045.

Van Vlierberghe, P., and Ferrando, A. (2012). The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation* 122, 3398-3406.

Van Vlierberghe, P., van Grotel, M., Tchinda, J., Lee, C., Beverloo, H.B., van der Spek, P.J., Stubbs, A., Cools, J., Nagata, K., Fornerod, M., *et al.* (2008). The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 111, 4668-4680.

Walshe, K., Healy, M.J., Speekenbrink, A.B., Keane, C.T., Weir, D.G., and O'Moore, R.R. (1990). Effects of an enteric anaerobic bacterial culture supernatant and deoxycholate on intestinal calcium absorption and disaccharidase activity. *Gut* 31, 770-776.

Wang, G.G., Song, J., Wang, Z., Dormann, H.L., Casadio, F., Li, H., Luo, J.L., Patel, D.J., and Allis, C.D. (2009). Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature* *459*, 847-851.

Waskow, C., Paul, S., Haller, C., Gassmann, M., and Rodewald, H.R. (2002). Viable c-KIT(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity* *17*, 277-288.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., *et al.* (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* *135*, 1118-1129.

Wilson, N.K., Foster, S.D., Wang, X., Knezevic, K., Schutte, J., Kaimakis, P., Chilarska, P.M., Kinston, S., Ouwehand, W.H., Dzierzak, E., *et al.* (2010). Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* *7*, 532-544.

Yui, M.A., Feng, N., and Rothenberg, E.V. (2010). Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus. *Journal of immunology* *185*, 284-293.

Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., *et al.* (2012a). The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* *481*, 157-163.

Zhang, J.A., Mortazavi, A., Williams, B.A., Wold, B.J., and Rothenberg, E.V. (2012b). Dynamic transformations of genome-wide epigenetic marking and transcriptional control establish T cell identity. *Cell* *149*, 467-482.

Zhong, Y., Jiang, L., Hiai, H., Toyokuni, S., and Yamada, Y. (2007). Overexpression of a transcription factor LYL1 induces T- and B-cell lymphoma in mice. *Oncogene* *26*, 6937-6947.

Zohren, F., Souroullas, G.P., Luo, M., Gerdemann, U., Imperato, M.R., Wilson, N.K., Gottgens, B., Lukov, G.L., and Goodell, M.A. (2012). The transcription factor Lyl-1 regulates lymphoid specification and the maintenance of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 13, 761-769.

Zuniga-Pflucker, J.C. (2004). T-cell development made simple. *Nature reviews Immunology* 4, 67-72.

