UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

ERL CNRS 7001 - Équipe « Niche Leucémique et métabolisme Oxydatif »

EA 7501 Groupe Innovation et Ciblage Cellulaire

THÈSE présentée par :

Margaux DEYNOUX

soutenue le : **16 décembre 2019**

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

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

Incidence de l'hypoxie sur le métabolisme oxydatif des leucémies aiguës myéloïdes

Établissement et caractérisation d'un modèle *in vitro* de niche leucémique

THÈSE dirigée par :

M. MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche Inserm, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme HADDAD Rima	Maître de Conférences, HDR, Université Paris XI
M. PEYRON Jean-François	Directeur de Recherche Inserm, Université Côte d'Azur

---

JURY :

M. AURRAND-LIONS Michel	Chargé de Recherche Inserm, HDR, Aix-Marseille Université
Mme CORONAS Valérie	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Mme HADDAD Rima	Maître de Conférences, HDR, Université Paris XI
M. MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche, Université de Tours
M. PEYRON Jean-François	Directeur de Recherche, Université Côte d'Azur
M. VANDIER Christophe	Professeur des Universités, Université de Tours

Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ?
Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie, sans idée préconçue des conséquences éventuelles.

Marie Curie

Remerciements

C’est avec beaucoup d’émotion que je tiens à remercier toutes les personnes, qui de près ou de loin ont contribué, et grandement aidé, à la réalisation de ces quatre années de thèse.

Aux membres du jury,

Je tiens tout d’abord à remercier tous les membres du jury de m’avoir fait l’honneur de juger ce travail de thèse. Merci à **Madame Rima Haddad**, **Monsieur Jean-François Peyron**, **Madame Valérie Coronas**, **Monsieur Michel Aurrand-Lions** et **Monsieur Christophe Vandier**. Veuillez trouver ici l’assurance de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Au responsable de l’équipe LNOx,

Je tiens particulièrement à remercier le **Professeur Olivier Hérault** de m’avoir accueillie et permis de faire ma thèse au sein de son équipe. Pour votre disponibilité et vos conseils avisés, soyez assuré de toute ma gratitude et mon respect.

À mon directeur de thèse,

Un grand merci au **Docteur Frédéric Mazurier** de m’avoir encadré et encouragé dans ce travail. La thèse est un long chemin compliqué et laborieux à arpenter, et le faire à vos côtés aura été un réel plaisir, tant scientifiquement qu’humainement. Merci pour la disponibilité, la bienveillance et la confiance que vous avez eu à mon égard. Soyez assuré de ma plus vive reconnaissance et de mon plus profond respect.

Aux autres membres de l’équipe,

Je remercie également le **Professeur Jorge Domenech** et le **Professeur Emmanuel Gyan** pour leur bienveillance et leurs précieux conseils lors des réunions de laboratoire. Merci également à **Fabrice et Florence** de l’intérêt qu’ils ont porté à mon travail, de leurs conseils judicieux et de leur disponibilité pour discuter de points scientifiques. Merci aussi pour toutes les discussions non scientifiques qui étaient sûrement encore plus importantes !

Je tiens ensuite à remercier **Elfi** et **Sophie**, qui pour moi sont les piliers de ce labo. Merci pour tout ce que vous faites pour tout le monde au quotidien. Sans vous, le laboratoire perdrait autant sur le plan technique que sur le plan humain. Merci pour votre gentillesse, votre sympathie,

cette ambiance agréable, toutes ces discussions de cheval, marathon et j'en passe, et tous ces fous rires !

Merci à **Nicola** pour tout ! Tu m'as accueillie si chaleureusement et gentiment dans l'équipe à mon arrivée. C'est toi qui m'auras tout montré dès le début. Toujours là pour m'aider, tu as été un vrai repère pour moi. Merci pour ta disponibilité, ta bienveillance, ta précieuse aide et toutes ces corrections de l'anglais !

Maya et **Farah** je vous remercie pour votre bonne humeur communicative, vos fous rires et toutes les photos de chat ! J'ai aimé participer à vos « premières » fois tourangelles, au canoë sous le pont de Chenonceau, aux énormes cocktails du Corsaire ou au décor de Mamie Bigoude. Je vous souhaite un avenir rempli de bonnes choses à toutes les deux.

Mention spéciale pour le meilleur stagiaire de master 2 ever ! Merci à toi **Nicolas** pour les fous rires, les soirées tardives au labo, ton stock de PFA (qu'on utilise encore aujourd'hui !), la sortie canoë où tu nous auras bien fait rire. On rêverait d'avoir des stagiaires comme ça tout le temps. Je te souhaite le meilleur pour la suite, tant professionnellement que sur le plan personnel, tu le mérites amplement.

Merci aussi à toi **Marie** d'avoir été là dès le début. On a commencé ensemble cette aventure, binôme de bureau comme on disait ! J'espère que tu trouveras un poste sur Tours que tu convoites tant, pour que tu puisses rester avec ta jolie famille dans la région.

Merci aussi à tous les autres membres du labo qui sont partis ou arrivés au cours de ma thèse : **Hassan**, **Christelle, Elodie**, **Myriam**, **Rawan 1 et 2**, **Noémie, Alban**. Merci pour votre aide et tous les bons moments passés au labo.

Je remercie aussi toute l'équipe du côté hôpital : **Jérôme**, **Frédéric**, **Amélie** et **Nathalie**. Merci pour votre aide, vos précieux conseils et votre sympathie.

Aux membres des autres équipes qui m'ont chaleureusement accueillie,

Je remercie toute l'équipe du CRCM de Marseille avec qui j'ai pu réaliser les manips *in vivo*. Merci à **Michel**, **Florence** et **Julien**, et un merci tout particulier à **Insaf** qui a initié et suivi ces manips. Merci pour ton aide précieuse et ton accueil si chaleureux.

Merci à **Lucie Brisson** du N2C, qui m'a gentiment appris à utiliser le microscope pour faire du time-lapse. Merci pour ta disponibilité et ton aide précieuse.

À ceux qui me sont les plus chers,

Merci à mes trois grognasses, **Camille**, **Magali** et **Anne-Charlotte,** de toujours me supporter après tant d'années ! Malgré Prague, Madrid, l'Argentine, l'Australie ou l'Irlande, on se voit toujours autant, si ce n'est plus. Merci pour tous ces fous rires, ces week-ends et ces soirées à refaire le monde. Cette année, remplie d'émotions, nous aura grandement rapproché. Je mesure ma chance de vous avoir à mes côtés.

Certains vont rire, mais je ne peux pas remercier tous les gens qui m'ont aidé ou soutenu lors de cette thèse, sans dire un mot sur mes animaux ! **Nala** d'abord, car c'est un pur produit de cette thèse. Merci à toi **Elfi**, d'avoir fait rentrer cette petite boule d'amour dans ma vie. Et puis **mon poney**, qui m'aura fait décompresser et oublier les résultats négatifs en deux secondes durant ces quatre années. D'ailleurs merci à **Elise** et **Nicolas**, pour avoir créé ce petit coin de paradis pour nos chevaux. Ce que vous faites pour eux est formidable.

Merci à **Ma Grand-Mère**, pour tous ses soutiens téléphoniques et son optimisme indéfectible sur ma thèse et mon avenir. Merci mille fois Mamie. **Papi** tu me manques énormément, mais je suis certaine que tu veilles sur nous de là-haut.

Arrive maintenant les personnes les plus importantes, **Mes Parents** et **Ma Sœur**, ceux qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci pour votre soutien depuis toutes ces années, merci d'avoir été là dans les moments compliqués et douloureux du passé. Vous avez toujours cru en moi et su me booster pour aller toujours plus loin. Je vous serais éternellement reconnaissante de tout ce que vous avez fait pour moi. Petite mention supplémentaire pour vous **Mes Plouquettes**, pour votre présence, votre écoute et votre amour inconditionnel. Je ne vous le dis pas assez souvent, mais qu'est-ce que je vous aime !

Pour finir, merci à toi **Quentin**, tu es rentré dans ma vie avec beaucoup de simplicité et d'évidence. Je ne te remercierai jamais assez pour ta patience et ton soutien, surtout lors de ces six derniers mois !

Résumé

Dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), un taux élevé d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est connu pour favoriser la prolifération de blastes, alors qu'un niveau faible promeut la quiescence des cellules souches leucémiques. La faible oxygénation, ou hypoxie, de la niche médullaire pourrait contribuer à la chimiorésistance des LAM en diminuant le stress oxydatif. Les facteurs induits par l'hypoxie (HIF) sont impliqués dans le contrôle du métabolisme et des enzymes antioxydantes. Leur inhibition conduit à un stress et à la mort des cellules de LAM. Mon objectif était d'étudier un lien entre l'hypoxie, le métabolisme oxydatif et la chimiorésistance dans un modèle *in vitro* de culture de cellules de LAM. L'acquisition d'un profil hypoxique par les cellules souches hématopoïétiques (CSH), cultivées avec des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) médullaires, a été montrée. Nous avons postulé que les cellules leucémiques pouvaient également l'acquérir en coculture avec des CSM humaines. Pour le démontrer, nous avons cultivé des cellules de LAM primaires ou de la lignée MV4-11 sur des CSM humaines primaires ou de la lignée HS-27a. A l'instar des CSH, nous avons identifié trois populations leucémiques en fonction de leur capacité d'adhérence sur les CSM : en suspension, adhérentes aux CSM et nichées dans les CSM. Les cellules nichées, les plus adhérentes, ont une plus forte expression du CXCR4 que les autres. Elles sont aussi plus résistantes de 2 à 7 fois à la cytarabine. Cependant, aucune modification du phénotype souche et des capacités clonogéniques, de repopulation ou de xénogreffe, n'a pu être associée aux cellules nichées comparées aux deux autres populations. En revanche, les cellules nichées présentent un profil hypoxique, une plus faible prolifération avec une augmentation de la phase G_0, et de plus faibles niveaux de ROS en lien avec une masse mitochondriale diminuée. Ceci suggère donc un lien entre la chimiorésistance et l'hypoxie ou le métabolisme, plutôt qu'avec une capacité souche. Nous avons aussi montré que l'acriflavine, un inhibiteur non spécifique des HIF, pouvait avoir un effet synergique avec la cytarabine sur les cellules nichées chimiorésistantes. Nos résultats montrent que le surnageant ou le simple contact avec les CSM ne suffisent pas à induire le changement métabolique et la résistance à la cytarabine. Nous pensons que l'hypoxie dans la niche peut moduler le métabolisme oxydatif et donc la chimiorésistance par des mécanismes directs et/ou indirects via l'expression de CXCR4, montré récemment comme impliqué dans la régulation du stress oxydatif des CSH.

Mots clés : Chimiorésistance, Hypoxie, Leucémie aiguë myéloïde, Métabolisme oxydatif, Microenvironnement

Abstract

In acute myeloid leukemia, a high level of ROS is known to favor blasts proliferation, whereas a low level promotes stem cells quiescence. The low oxygenation, or hypoxia, of the bone marrow niche could contribute to chemoresistance of AML cells by reducing the oxidative stress. Hypoxia-inducible factors (HIF) are involved in the control of the cell metabolism and antioxidant enzymes. HIFs inhibition leads to AML cells stress and death. The purpose of this work was to study a link between hypoxia, oxidative metabolism and chemoresistance in an *in vitro* model of leukemic cell culture. The acquisition of a hypoxic profile by hematopoietic stem cells (HSC) cultured with medullary mesenchymal stromal cells (MSC), has been shown. We hypothesized that AML cells may also acquire such profile in a coculture with human MSCs. To demonstrate that, we cultivated primary AML cells or the MV4-11 cell line on primary human MSCs or the HS-27a cell line. Like HSCs, we identified three leukemic populations according to their adhesion capacity to MSCs: in suspension, adherent to MSCs and embedded in MSCs. Embedded cells, the most adherent, have stronger CXCR4 expression compared to the others. They are also 2- to 7-fold more resistance to cytarabine. However, no change in the stem cell phenotype profile and in the clonogenic, repopulation or xenograft capacities, could be associated with the embedded cells compared to other populations. In contrast, embedded cells present a hypoxic profile, a weak proliferation with increased G_0 phase, and lower ROS level that may rely on lower mitochondrial mass. This suggests that chemoresistance mainly relies on hypoxia or cell metabolism rather than a higher stem cell capacity. Furthermore, we have shown that acriflavine, a non-specific HIF inhibitor, could synergize with the cytarabine to eliminate embedded chemoresistant cells. Our results show that the MSC supernatant or a simple contact are not sufficient to induce metabolic change and resistance to cytarabine. We assume that hypoxia in the niche may modulate the oxidative metabolism and the chemoresistance by direct mechanisms and/or indirect ones through CXCR4 expression, a chemokine receptor shown to be involved in the regulation of the oxidative stress in HSC.

Keywords: Chemoresistance, Hypoxia, Acute myeloid leukemia, Oxidative metabolism, Microenvironment

Table des matières

Remerciements 5
Résumé 8
Abstract 9
Table des matières 10
Liste des tableaux 13
Liste des annexes 16
Liste des abréviations 17
Introduction 21
I. La leucémie aiguë myéloïde 23
A. Description 24
1. Epidémiologie 24
2. Symptômes et diagnostic 24
3. Différents types de leucémies aiguës myéloïdes 25
B. Stratégies thérapeutiques et leurs limites 30
1. Chimiothérapie intensive 30
2. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques 31
3. Traitements pour les patients inéligibles à la chimiothérapie intensive 32
4. Thérapies ciblées 32
5. Cellules souches leucémiques 34
II. Le microenvironnement de la moelle osseuse 37
A. Concept de niches hématopoïétiques 37
1. Niche endostéale 37
2. Niche vasculaire 38
3. Autres constituants de la moelle osseuse 39
B. Niche hématopoïétique leucémique 40
1. Niche remodelée par les cellules leucémiques 41
2. Leucémie initiée par la niche 42
C. Modélisation de la niche hématopoïétique 43
1. Modèles de niches murines 43
2. Modèles de niches humanisées 44
3. Modèles de niches humaines 46
D. Un microenvironnement hypoxique 48

1. Teneur en oxygène dans la moelle osseuse normale 48
2. Teneur en oxygène dans la moelle osseuse leucémique 50
III. Les facteurs induits par l'hypoxie 51
A. Structure des HIF 51
B. Régulation des facteurs HIF 54
1. Régulation dépendante du niveau d'oxygène 54
2. Régulation indépendante du taux d'oxygène 55
C. Rôles et fonctions des HIF 56
1. En condition physiologique 56
2. En condition pathologique 58
D. Ciblage thérapeutique des facteurs HIF 61
1. Inhibiteurs des facteurs HIF 61
2. Drogues activées en hypoxie 62
IV. Le métabolisme oxydatif 64
A. Les espèces réactives de l'oxygène 64
1. Sources de ROS 65
2. Systèmes antioxydants 66
3. Les ROS dans l'hématopoïèse normale et leucémique 67
B. Rôle de l'hypoxie sur le métabolisme oxydatif 67
1. Dans un contexte physiologique 67
2. Dans un contexte leucémique 69
Objectifs 71
Première partie Caractérisation de sous-populations cellulaires de LAM dans un modèle de coculture : chimiorésistance, hypoxie, métabolisme oxydant 75
A. Introduction 75
B. Matériels et méthodes 75
1. Culture cellulaire 75
2. Système de coculture 76
3. Cellules MV4-11 exprimant la GFP 77
4. Analyse du cycle cellulaire 77
5. Tests de résistance aux traitements 78
6. Analyse de marqueurs spécifiques de surface 78
7. Tests clonogénique et de repopulation 79
8. Xénogreffe 79

9. Mesure de la teneur en oxygène 79
10. Mesure des ROS cytoplasmiques 80
11. Mesure des ROS mitochondriales, du potentiel de membrane mitochondrial et de la masse mitochondriale 81
12. Analyse statistique 81
C. Résultats 81
1. Preuve de concept : coculture de la lignée MV4-11 / CSM primaires 81
2. Prolifération des trois populations leucémiques 84
3. Etude de la résistance à la cytarabine 88
4. Etude phénotypique et fonctionnelle du caractère souche 91
5. Caractérisation du profil hypoxique 94
6. Caractérisation du métabolisme oxydatif 97
7. Caractérisation de l'adhérence cellulaire 100
D. Conclusion 103
Deuxième partie Etude comparative de la capacité de lignées cellulaires stromales mésenchymateuses à former des sphéroïdes 105
A. Introduction de l'article 105
Discussion 139
Conclusion et perspectives 149
Annexes 185
Résumé 202
Abstract 202

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des LAM selon les anomalies génétiques..... 27
Tableau 2. Stratification du risque pronostique selon les anomalies génétiques par l'*European LeukemiaNet*..... 30
Tableau 3. Liste non exhaustive des différents marqueurs de surface des CSL. 36
Tableau 4. Caractéristiques des différents patients et lignées de LAM. 86

Liste des figures

Figure 1. Modèles au cours du temps de la hiérarchie de l ’hématopoïèse. 22
Figure 2. Hématopoïèse normale *versus* leucémique. 23
Figure 3. Classification FAB selon le type cellulaire et le stade de différenciation des cellules blastiques observées. 25
Figure 4. Mutations retrouvées dans les LAM. 26
Figure 5. Schéma de l’évolution clonale d’une leucémie. 28
Figure 6. Arbre décisionnel du choix du conditionnement pour une transplantation de CSH. 31
Figure 7. La niche hématopoïétique dans la moelle osseuse. 40
Figure 8. Différentes méthodes permettant la formation de sphéroïdes. 46
Figure 9. Schéma représentant les différents modèles du gradient d'oxygène au sein de la moelle osseuse. 49
Figure 10. Structure des domaines composant les protéines HIF-1α et HIF-2α, avec les différentes fonctions et les positions des différents résidus hydroxylés. 52
Figure 11. Structure des domaines composant les différents variants HIF-3α. 53
Figure 12. Structure des domaines composant les protéines ARNT et ARNT2. 53
Figure 13. Schéma de la régulation des facteurs HIF en fonction de l'oxygène. 55
Figure 14. Schéma récapitulatif d’une partie de la signalisation induite par le complexe HIF1 en condition normale. 57
Figure 15. Les différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS). 64
Figure 16. Schéma récapitulatif des différentes sources de ROS et des systèmes antioxydants intra- et extracellulaires. 66
Figure 17. Schéma récapitulatif du statut hypoxique et métabolique des CSH comparées aux progéniteurs. 68
Figure 18. Identification des deux premières populations leucémiques au sein de la coculture par microscopie à contraste de phase. 82
Figure 19. Visualisation par microscopie à fluorescence de cellules MV4-11 nichées. 83
Figure 20. Distinction entre les cellules MV4-11 et les CSM primaires. 83
Figure 21. Prolifération des trois populations leucémiques. 84
Figure 22. Analyse du cycle cellulaire. 87
Figure 23. Détermination de l'IC_{50} de la lignée MV4-11 envers l’Ara-C cultivée en RPMI ou en MEM alpha. 88

Figure 24. Les cellules nichées sont plus résistantes à l'Ara-C que les cellules adhérentes et non-adhérentes. 89
Figure 25. La doxorubicine est présente dans les trois populations. 90
Figure 26. Phénotypage des trois populations selon l'expression des marqueurs CD34 et CD38. 92
Figure 27. Tests fonctionnels des capacités souches des trois populations. 93
Figure 28. Caractérisation du niveau d'oxygène dans la coculture et de l'hypoxie dans les trois populations. 95
Figure 29. Effet de l'inhibition des facteurs HIF en traitement avec la cytarabine. 96
Figure 30. Mesure des ROS cytoplasmiques et mitochondriales. 98
Figure 31. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial et de la masse mitochondriale dans les trois populations. 100
Figure 32. Expression de molécules d'adhésion dans les trois populations. 101
Figure 33. Impact de l'inhibition de CXCR4. 102
Figure 34. Schéma de conclusion. 147

Liste des annexes

Annexe 1 : Revue publiée en 2016 dans *Frontiers in Oncology* 185
Annexe 2 : Liste des communications orales et affichées..... 197

Liste des abréviations

Δψ : Potentiel de membrane mitochondrial

A

ABCG2 : ATP-Binding Cassette super-family G member 2
ACF : Acriflavine
AQP : Aquaporine
Ara-C : Cytarabine
ARNT : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ASXL1 : Additional Sex combs-Like 1
ATG5 : Autophagy related 5
ATM : Ataxia Telangectasia Mutated
ATRA : Acide tout trans-rétinoïque

B

BCL-2 : B Cell Lymphoma-2
BCL-XL : B Cell Lymphoma-extra Large
bHLH : basic Helix-Loop-Helix
BNIP3 : BCL-2 Interacting Protein 3

C

CAFC : Cobblestone-Area Forming Cell
CAR : CXCL12-Abundant Reticular
CAT : Catalase
CCL3 : C-C motif Chemokine Ligand 3
CD : Cellules Dendritiques
CFU-C : Colony-Forming Unit Cell
CFU-S : Colony-Forming Unit Spleen
CIL : Cellule Initiatrice de Leucémie
CIR : Conditionnement d'Intensité Réduite
CLL-1 : C-type Lectin-Like molecule-1
CLP : Common Lymphoid Progenitor
CMP : Common Myeloid Progenitor
CNMA : Conditionnement Non-Myéloablatif
CNT : Concentrative Nucleoside Transporter
CMA : Conditionnement Myéloablatif
COX : Cyclooxygénase
CRL : Cellule Régénératrice de Leucémie
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CSL : Cellule Souche Leucémique
CSM : Cellule Souche/Stromale Mésenchymateuse
CTAD : C-terminal Transactivation Domain
CTE : Chaîne de Transport des Electrons
CTGF : Connective Tissue Growth Factor
CXCL4/12 : CXC-Chemokine Ligand 4/12
CXCR4 : CXC-Chemokine Receptor type 4
CYP : Cytochrome P450

D

DDL1 : Delta-Like 1
DNMT3A : DNA (cytosine-5)-Methyltransferase 3 Alpha

E

EGF : Epidermal Growth Factor
ELN : European LeukemiaNet
ENT : Equilibrative Nucleoside Transporter
EPAS1 : Endothelial Per-ARNT-Sim (PAS) protein 1
EoBP : Eosinophil-Basophil Progenitor
Eosino : Eosinophile
EPO : Erythropoïétine
ERK : Extracellular signal-Regulating Kinase

Erythro : Erythrocyte

F

FAB : Franco-Américano-Britannique
FGF-2 : Recombinant human FGF Basic
FIH : Factor Inhibiting HIF1
FLT3 : Fms-Like Tyrosine kinase 3
FLT3-ITD : FLT3-Internal Tandem Duplication
FLT3-TKD : FLT3-Tyrosine Kinase Domain
FoxO : Forkhead O
FUNDC1 : FUN14 Domain-Containing protein 1

G

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
GM-CSF : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GMP : Granulocyte-Monocyte Progenitor
GPX : Glutathione Péroxydase
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

H

H_2O_2 : Péroxyde d'hydrogène
HIF : Hypoxia-Inducible Factor
HO-1 : Heme Oxygenase-1
HOCl : Acide hypochloreux
HRE : Hypoxia-Response Element

I

IDH : Isocitrate Déshydrogénase
IL : Interleukine
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ISCT : International Society for Cellular Therapy

J

JAG1 : Jagged 1
JAK2 : Janus Kinase 2

K

KO : Knockout

L

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
LAP : Leucémie Promyélocytaire
LC3 : Microtubule-associated proteins 1A/1B Light Chain 3B
LepR : Leptin-Receptor
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LMPP : Lymphoid-primed Multipotent Progenitor
LT : Long Term
LTC-IC : Long-Term Culture-Initiating Cells
LZIP : Leucine Zipper

M

MØ : Macrophage
M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor
MDR1 : Multidrug Resistance 1
Méga : Mégacaryocyte
MEIS1 : Myeloid Ecotropic viral Integration Site 1
MEP : Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor
MM : Myélome Multiple
MO : Moelle Osseuse

MOC : Multi-Organ-Chip
Mono : Monocyte
MPO : Myéloperoxydase
MPP : Multipotent Progenitor

N

N-Acétyl-L-Cystéine
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
Nes : Nestine
Neutro : Neutrophile
NK : Natural Killer
NPM1 : Nucleophosmin 1
NOD : Non Obese Diabetic
NOX : NADPH Oxydase
NRAS : Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NRF2 : Nuclear factor erythroid-derived 2-Related Factor 2
NSG : NOD-SCID Gamma c
NTAD : N-terminal Transactivation Domain

O

$^{\bullet}O_2^-$: Ion superoxyde
ODDD : Oxygen-Dependent Degradation Domain
$^{\bullet}OH$: Radical hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPN : Ostéopontine
OXPHOS : Phosphorylation oxydative

P

p53 : tumor Protein 53
PAS : Per-ARNT-Sim
PDH : Pyruvate Dehydrogenase
PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1
PF4 : Platelet Factor 4
PHD1-3 : Prolyl Hydroxylase Domain 1-3
PI3K/AKT : Phosphoinositide 3 Kinase/AKT
PIM : Proviral Integration site for Moloney murine leukemia virus
PRDX : Peroxirédoxine
PML : Promyelocytic Leukemia

R

RARA : Retinoic Acid Receptor A
RB : Retinoblastoma protein
RC : Rémission Complète
ROS : Reactive Oxygen Species ou Espèces Réactives de l'Oxygène

S

SCF : Stem Cell Factor
SCID : Severe Combined Immunodeficiency
SDF-1 : Stromal Derived Factor-1
SDH : Succinate Déshydrogénase
SG : Survie Globale
SH : Short Term
SIRPα : Signal Regulatoty Protein α
SIRT1 : Sirtuine 1
SMD : Syndrome Myélodysplasique
SOD1-3 : Superoxyde Dismutase 1-3
SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TCSH : Transplantation de CSH
TET2 : Ten-Eleven-Translocation 2
TGF-β : Transforming Growth Factor-β
TIM-3 ou HAVcr-2 : Hepatitis A virus receptor-2
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α
TPO : Thrombopoïétine

V

VEGF(A) : Vascular Endothelial Growth Factor (A)

VHL : von Hippel-Lindau

X

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

XO : Xanthine Oxydase

Introduction

Chaque jour, la moelle osseuse produit plusieurs milliards de cellules sanguines. C'est grâce à l'hématopoïèse, qui est l'ensemble des mécanismes permettant la production de tous les types cellulaires des lignées sanguines, que notre organisme conserve un niveau stable de ces cellules tout au long de la vie (Pinho & Frenette, 2019). Au sommet de sa hiérarchie se trouvent les cellules souches hématopoïétiques (CSH) immatures, qui par des étapes de division et différenciation génèrent des progéniteurs, qui engendrent eux-mêmes les cellules matures, telles que les lymphocytes B et T, les érythrocytes, les mégacaryocytes ou les monocytes (**Figure 1**) (Laurenti & Göttgens, 2018). Outre cette capacité de multipotence, elles ont comme propriété de s'autorenouveler pour maintenir un pool constant de CSH, qui pourrait être épuisé par la différenciation (Kumar & Geiger, 2017). Celles-ci, relativement quiescentes, sont maintenues grâce au microenvironnement de la moelle osseuse (MO), appauvri en oxygène, au sein des niches hématopoïétiques (Schepers, Campbell, & Passegué, 2015). La régulation de l'hématopoïèse est minutieusement orchestrée par les différents constituants de ces niches, sécrétant des facteurs de croissance et des cytokines, qui gouvernent la balance entre la quiescence et l'expansion des cellules hématopoïétiques (Kumar & Geiger, 2017; Pinho & Frenette, 2019; Schepers et al., 2015). Cependant, au cours de la vie d'un individu, de multiples facteurs peuvent affecter ce processus, comme des anomalies cytogénétiques ou mutations dans des gènes clés de l'hématopoïèse. Celles-ci peuvent apparaître au cours du vieillissement cellulaire ou être induites par des facteurs environnementaux, conduisant à des hémopathies malignes. De même que pour les CSH normales, les niches hématopoïétiques jouent un rôle de soutien des cellules cancéreuses, et les protègent des traitements. Caractériser le dialogue entre le microenvironnement et les cellules malignes est donc essentiel pour mieux comprendre les mécanismes engendrant ces pathologies, et ainsi trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

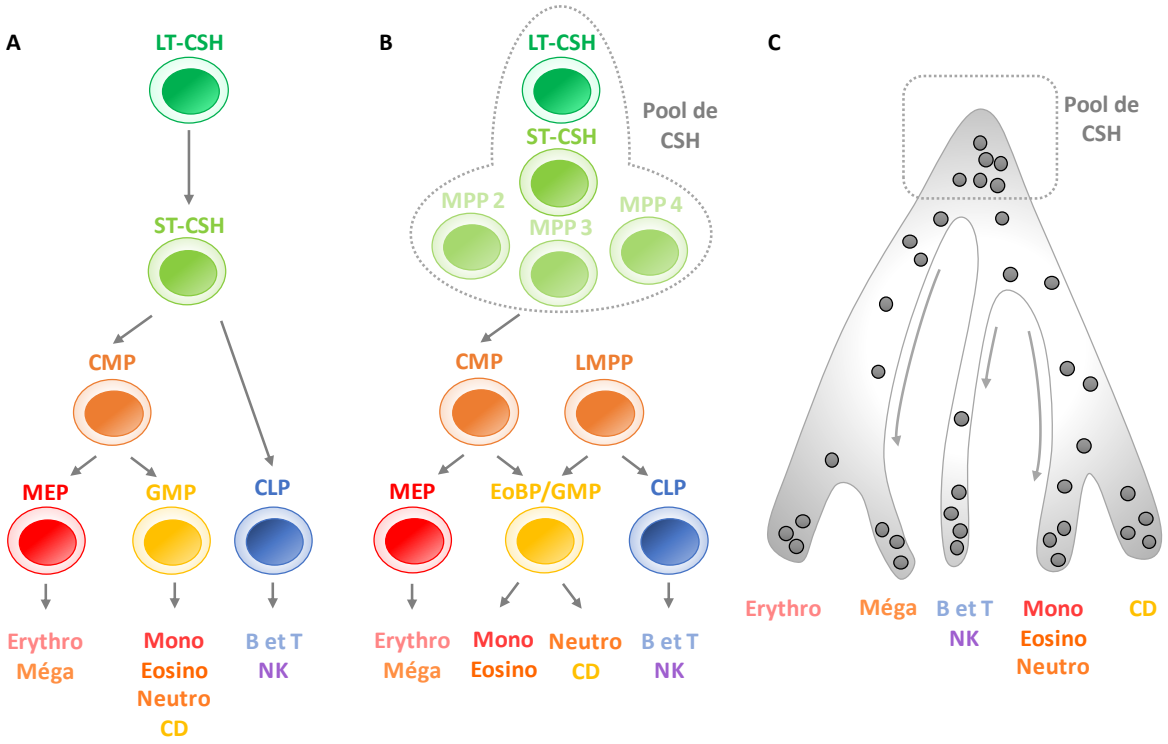


Figure 1. Modèles au cours du temps de la hiérarchie de l 'hématopoïèse. (**A**) **Modèle datant des années 2000 :** les CSH (SH : *short-term* pour courte durée ; LT : *long-term* pour longue durée) génèrent deux branches séparant la lignée myéloïde de lymphoïde via des progéniteurs communs myéloïdes appelés CMP (*common myeloid progenitor*) et lymphoïdes appelés CLP (*common lymphoid progenitor*). (**B**) **Modèle introduit dans les années 2005 à 2015 :** le pool de CSH est maintenant plus hétérogène, et les lignée lymphoïde et myéloïde redeviennent associées via l'EoBP/GMP (EoBP : *eosinophil-basophil progenitor* pour progéniteur basophile-éosinophile ; GMP : *granulocyte-monocyte progenitor* pour progéniteur monocyte-granulocyte). (**C**) **A partir de 2016**, la transcriptomique unicellulaire indiquent un continuum de différenciation. B et T : Lymphocytes B et T ; CD : cellules dendritiques ; Eosino : éosinophiles ; Erythro : érythrocytes ; LMPP : *lymphoid-primed multipotent progenitor* pour progéniteur multipotent à amorçage lymphoïde ; Méga : mégacaryocytes ; MEP : *megakaryocyte-erythrocyte progenitor* pour progéniteur érythrocyte-mégacaryocyte : Mono : monocytes ; MPP : *multipotent progenitor* pour progéniteur multipotent ; Neutro : neutrophiles ; NK : cellules *natural killer* (d'après Laurenti & Göttgens, 2018).

I. La leucémie aiguë myéloïde

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) résulte d'anomalies génétiques apparaissant dans des progéniteurs hématopoïétiques ou des CSH qui conduisent à un blocage de la différenciation myéloïde. Ceci provoque l'accumulation de blastes et un envahissement de la MO et du sang par ces cellules anormales, au détriment de l'hématopoïèse normale (**Figure 2**) (Brown, Larsen, Iland, Joshua, & Gibson, 2012).

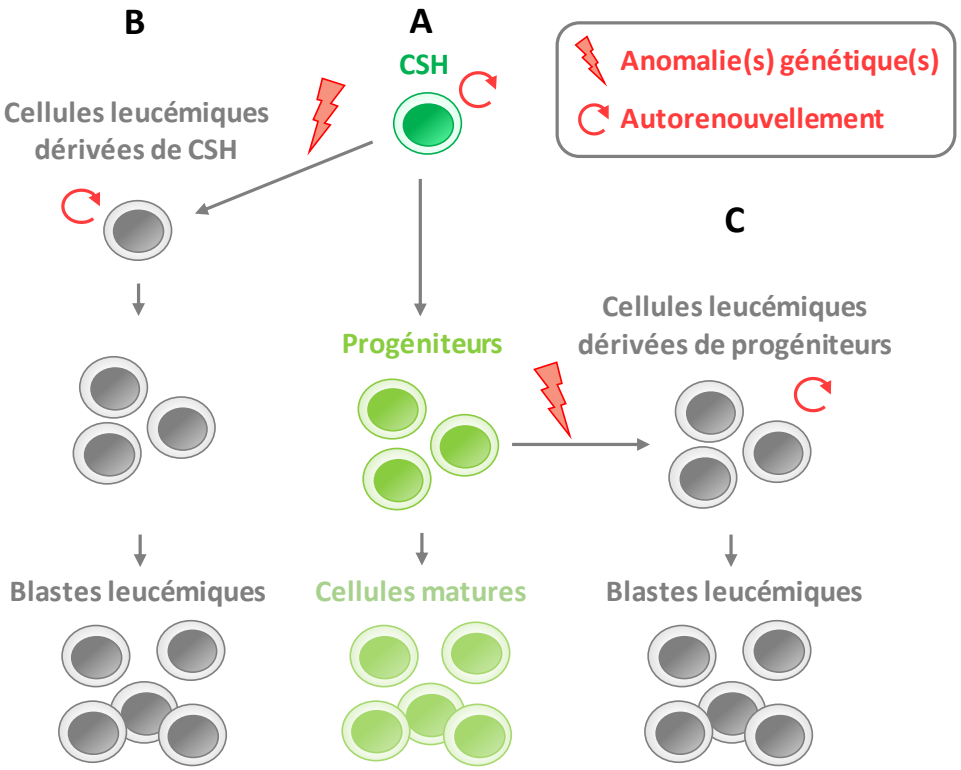


Figure 2. Hématopoïèse normale *versus* leucémique. (**A**) Les CSH, caractérisées par leurs capacités d'autorenouvellement et de multipotence, sont au sommet de l'hématopoïèse. Elles donnent des progéniteurs qui génèrent eux-mêmes les cellules matures de la lignée sanguine. (**B**) Des anomalies génétiques peuvent conduire à la formation de cellules leucémiques, qui conservent cette capacité d'autorenouvellement, et donnent naissance à une accumulation de blastes leucémiques dans la moelle osseuse (MO) au détriment des cellules normales. (**C**) Le même processus peut également se produire à partir de progéniteurs, plus différenciés que les CSH (inspiré de Bonnet, 2005).

A. Description

1. Epidémiologie

Sur les 45 000 cas d'hémopathies malignes recensées en France en 2018, environ 3 400 sont des LAM, avec un sexe-ratio (hommes/femmes) de 1,4 et un âge médian au diagnostic de 70 ans (69 pour les hommes et 72 pour les femmes) (Defossez et al., 2019). La survie nette à 5 ans (sur la période de 2005 à 2010) est de 23 % (21 % pour les hommes et 25 % pour les femmes), mais celle-ci varie drastiquement selon l'âge, passant de 59 % pour des sujets jeunes (de 15 à 44 ans), à 17 % pour ceux âgés de 65 à 74 ans et 3 % pour des sujets plus âgés (≥ 75 ans). De manière générale, c'est dans les deux premières années après le diagnostic que le taux de mortalité est le plus fort. Une fois cette période passée, la survie à long terme pour les patients de moins de 55 ans reste stable entre 10 et 15 ans (Monnereau et al., 2016).

2. Symptômes et diagnostic

Le diagnostic d'une LAM débute toujours par une suspicion clinique, dont la liste, non exhaustive, des signes et symptômes est : pâleur, fatigue, essoufflement et/ou palpitations cardiaques, saignements prolongés et ralentissement du temps de guérison des coupures, hématomes spontanés ou à de légers coups, pétéchies (petites taches de sang sous la peau, notamment sur les jambes), infections bénignes fréquentes, fièvres et sueurs nocturnes sans raison apparente (Bain, 2010; Fonds Anticancer & ESMO, 2011).

Seuls la prise de sang et l'hémogramme permettent de quantifier le nombre de cellules sanguines saines, et de vérifier la présence de cellules malignes. Parfois, un examen de la MO, ou myélogramme, par ponction (prélèvement de MO) ou biopsie (prélèvement de tissu osseux et de MO) permet de faire mieux l'état de l'avancement de la maladie (Fonds Anticancer & ESMO, 2011). Généralement, 200 leucocytes (frottis sanguin) et 500 cellules nucléées (frottis de MO) sont comptés, et un pourcentage ≥ 20 % de blastes est requis pour poser un diagnostic. Exception faite pour les LAM avec translocation chromosomique t(15;17), t(16;16) ou t(8;21), ou avec inversion inv(16), qui se suffisent à elles seules et s'affranchissent d'un pourcentage de blastes (Döhner et al., 2017).

Enfin, dans les cas graves, notamment suspicion de métastases, l'imagerie médicale (IRM, radiographie, scanner, scintigraphie…) doit être envisagée (Fonds Anticancer & ESMO, 2011). De plus, la recherche de marqueurs spécifiques (immunophénotypage) ou d'anomalies

cytogénétiques peuvent se faire afin de caractériser au mieux la LAM du patient et lui donner le meilleur traitement (Döhner et al., 2017).

3. Différents types de leucémies aiguës myéloïdes

3.1. Classification cytologique

C'est en 1976 que la première classification voit le jour, grâce à une collaboration d'hématologues Français, Américains et Britanniques (FAB) visant à uniformiser la classification et le diagnostic des LAM. Celle-ci est basée principalement sur la morphologie des blastes observés au microscope. Les différents formes de LAM sont classés de M0 à M7, selon le type (monocytaire, érythroblastique, mégacaryocytaire, etc.) et le degré de différenciation des cellules (**Figure 3**) (Bennett et al., 1976). Bien qu'intéressante dans la pose du diagnostic, cette classification reste peu adaptée au pronostic.

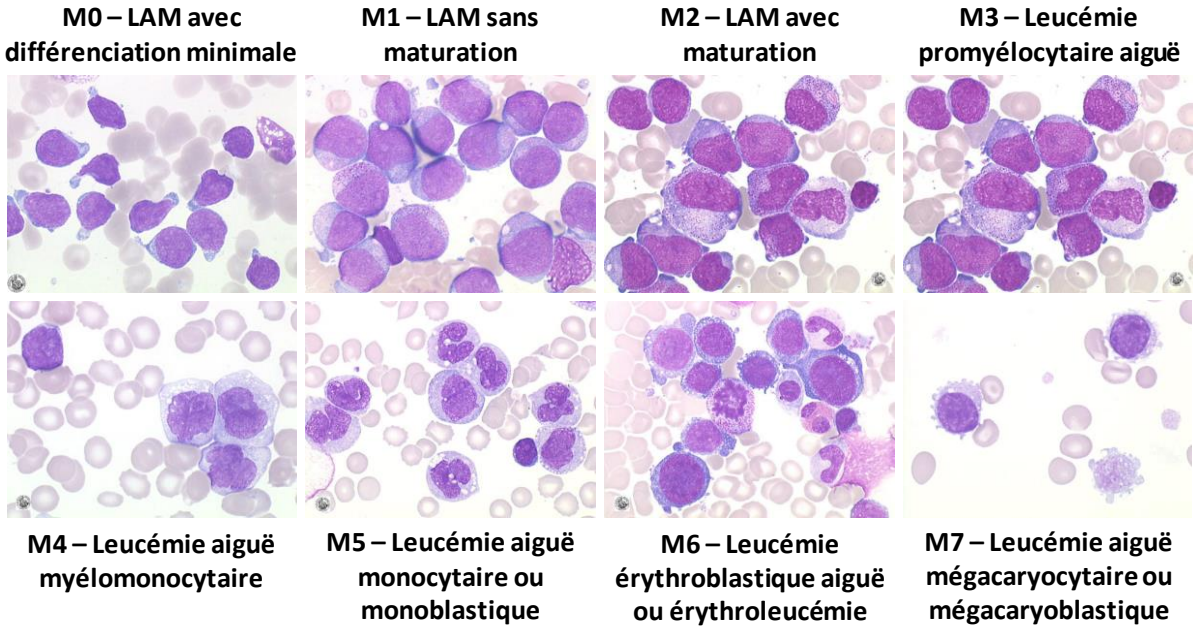


Figure 3. Classification FAB selon le type cellulaire et le stade de différenciation des cellules blastiques observées (images provenant du site Hematocell, au 04/09/2019).

3.2. Classification cytogénétique

La classification FAB a ensuite été largement complétée, voire même remplacée, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), qui a rédigé pour la première fois en 2001, une « Classification des tumeurs des tissus lymphoïdes et hématopoïétiques ». Celle-ci fut ensuite

révisée en 2008, puis en 2016. Se basant principalement sur les anomalies chromosomiques des cellules blastiques, elle prend également en considération plusieurs paramètres tels que la morphologie des cellules, l'immunophénotypage et les paramètres cliniques (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016; Döhner et al., 2017; Döhner, Weisdorf, & Bloomfield, 2015). Elle décompose les LAM et néoplasmes associés en six grands groupes décrits dans le **Tableau 1**.

3.3. Classification moléculaire

En 2013, *The Cancer Genome Atlas Research Network* a réalisé le séquençage de 200 patients atteints de LAM *de novo*, et établi une liste des gènes les plus fréquemment mutés, les trois principaux étant *FLT3* (*Fms-Like Tyrosine kinase 3*), *NPM1* (*Nucleophosmin 1*) et *DNMT3A* (*DNA (cytosine-5)-Methyltransferase 3 Alpha*) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Trois ans plus tard, l'étude de Papaemmanuil *et al.* confirme grâce à un panel de plus de 1 540 patients les trois mutations principales, en y apportant la notion de facteur pronostique (**Figure 4**) (Papaemmanuil et al., 2016).

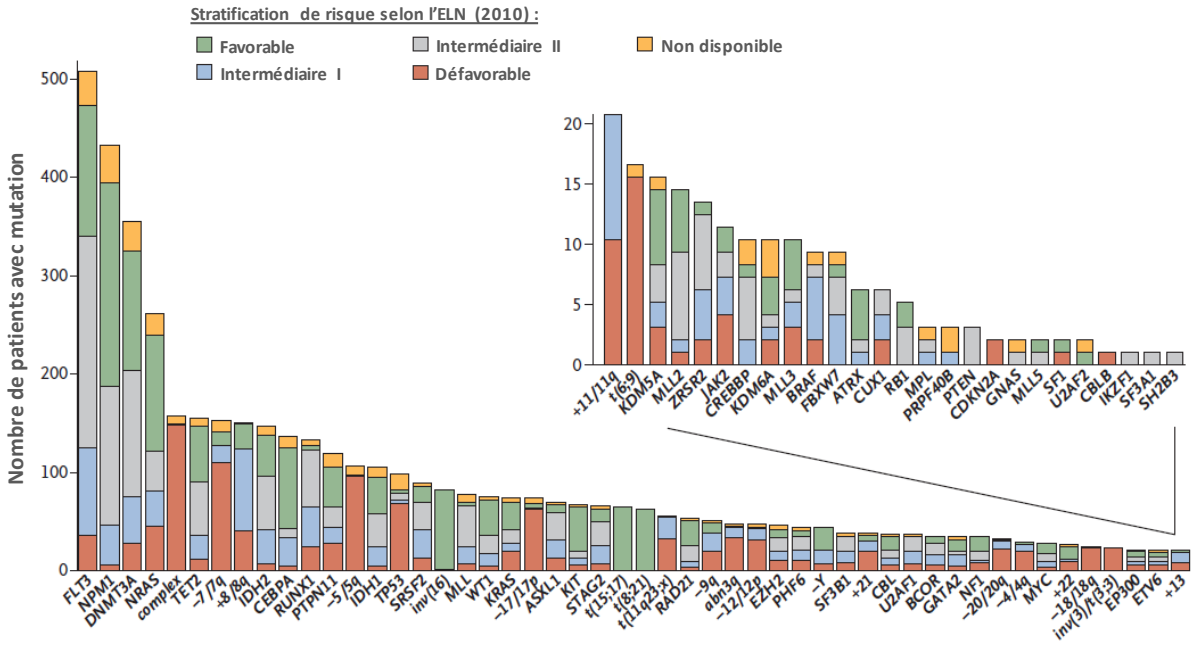


Figure 4. Mutations retrouvées dans les LAM. Nombre de patients mutés pour chaque gène, avec le risque prognostique de l'*European LeukemiaNet* (ELN, datant de 2010), sur un panel de 1 540 patients (d'après Papaemmanuil et al., 2016).

De l'étude, il ressort que les patients ont en moyenne 13 mutations, dont au moins une se trouve dans l'une des 9 catégories de gènes, classées selon leur fonction biologique : des gènes impliqués dans la signalisation (59 %), des gènes reliés à la méthylation de l'ADN (44 %), des

gènes modifiant la chromatine (30 %), le gène encodant NPM1 (27 %), des gènes de facteurs de transcription myéloïdes (22 %), des fusions de facteurs de transcription (18 %), des gènes suppresseurs de tumeurs (16 %), des gènes du complexe du spliceosome (14 %) et enfin des gènes du complexe de cohésine (13 %) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

Tableau 1. Classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des LAM selon les anomalies génétiques (d'après Arber et al., 2016; De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016 et Döhner et al., 2017).

Types de LAM	Anomalies génétiques
LAM avec anomalies génétiques récurrentes	
	LAM avec t(8;21)(q22;q22) ; *RUNX1-RUNX1T1*
	LAM avec inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; *CBFB-MYH11*
	Leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) avec *PML-RARA*
	LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3) ; *MLLT3-KMT2A*
	Leucémie myéloïde avec t(6;9)(p23;q34.1) ; *DEK-NUP214*
	LAM avec inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; *GATA2*, *MECOM (EVI1)*
	LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13.3;q13.3) ; *RBM15-MKL1*
	LAM avec *BCR-ABL1* (entité provisoire)
	LAM avec mutation de *NPM1*
	LAM avec mutations bi-alléliques de *CEBPA*
	LAM avec mutation de *RUNX1* (entité provisoire)
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies	
Néoplasmes myéloïdes associés au traitement	
LAM non spécifiées par ailleurs	
	LAM avec différenciation minimale
	LAM sans maturation
	LAM avec maturation
	Leucémie aiguë myélomonocytaire
	Leucémie aiguë monoblastique/monocytaire
	Leucémie aiguë érythroïde
	Leucémie pure érythroïde
	Leucémie aiguë mégacaryoblastique
	Leucémie aiguë basophile
	Panmyélose aiguë avec myélofibrose
Sarcomes myéloïdes	
Prolifération myéloïde liée au syndrome de Down	
	Myélopoïèse anormale transitoire
	Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down

3.4. Evolution clonale

De manière générale, il ne suffit pas d'acquérir une mutation spécifique pour développer une leucémie. En effet, les CSH accumuleraient des mutations au cours du vieillissement, à un rythme de 0,13 par an (Welch et al., 2012), générant des clones de CSH dites pré-leucémiques. L'acquisition d'une ou plusieurs altérations génétiques supplémentaires favorise ensuite le déclenchement de la leucémie (**Figure 5**) (Ferrando & López-otín, 2017; Shlush et al., 2017).

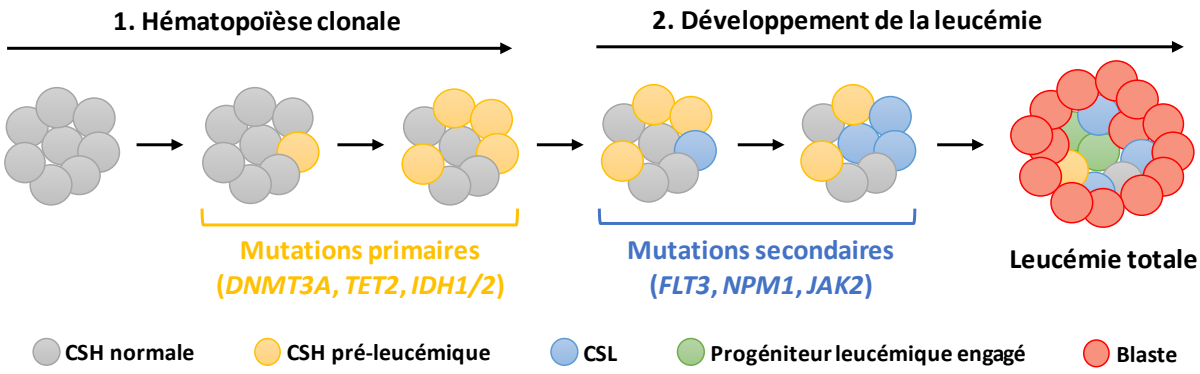


Figure 5. Schéma de l'évolution clonale d'une leucémie. Les CSH normales deviennent pré-leucémiques, à la suite de mutations primaires au cours du temps, sur des gènes tels que *DNMT3A*, *TET2* ou *IHD1/2*. On parle alors d'hématopoïèse clonale. En revanche, dès l'apparition de mutations secondaires (sur *FLT3*, *NPM1* ou bien *JAK2*), les CSH pré-leucémiques deviennent des cellules souches leucémiques (CSL), enclenchant la leucémie. Elles produisent ensuite des progéniteurs leucémiques et des blastes qui développent la leucémie (d'après Jin & Wu, 2018).

Une étude conduite par la *Women's Health Initiative* a suivi pendant 9 ans un panel de plus de 160 000 femmes, dont 188 ont développé une LAM durant cette période. L'identification de mutations pré- et post-diagnostic, par rapport à des femmes n'ayant développé aucune pathologie, démontre qu'une mutation sur les gènes *IDH1/2* (Isocitrate déshydrogène), *TP53* (*Tumor Protein 53*), *DNMT3A*, *TET2* (*Ten-Eleven-Translocation 2*) ou des gènes du spliceosome augmentent significativement la probabilité de développer une LAM. Sur cette cohorte, toutes les femmes présentant une mutation du gène *TP53* ont développé une LAM, tout comme celles ayant une mutation sur les gènes *IDH1* ou *IDH2* (Desai et al., 2018). Généralement, il est décrit que les mutations primaires (ou *driver*) sont retrouvées majoritairement dans les gènes *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*, *ASXL1 (Additional Sex combs-Like 1)*, ou encore les gènes du spliceosome, et les mutations secondaires dans les gènes *NPM1*, *FLT3*, *JAK2* (*Janus Kinase 2*) et *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*) (Danlos, Papo, & Micol, 2019; Desai, Hassane, & Roboz, 2019; Jin & Wu, 2018).

La notion d'évolution clonale est également décrite pour les LAM secondaires. En effet, après séquençage du génome au diagnostic et à la rechute de patients atteints de LAM, deux modèles d'évolution clonale après rechute ont été proposés. Dans le premier modèle, le clone dominant au diagnostic n'a pas bénéficié du bon traitement ou possède des mutations qui le rendent chimiorésistant. Ainsi, il peut acquérir des mutations secondaires, le faisant évoluer et lui permettant de réinitier une leucémie. Dans le deuxième modèle, un sous-clone de la leucémie primaire, ne comportant pas toutes les mutations du clone dominant, survit au traitement, acquiert ou non des mutations secondaires, et réinitie la pathologie (Ding et al., 2012a). Les mêmes résultats ont été observés sur l'analyse de patients en LAM secondaires à la suite de syndromes myélodysplasiques (SMD). Cette fois-ci, un sous-clone fondateur du SMD, ayant acquis de nouvelles mutations, permet de développer une LAM secondaire (Walter et al., 2012). Pour exemple, la mutation *DNMT3A* a été retrouvée à la fois au diagnostic et à la rechute d'un patient atteint de LAM, avec une augmentation de sa fréquence allélique à la rechute, démontrant que les cellules pré-leucémiques, ayant cette mutation, étaient chimiorésistantes. Toutefois, une mutation additionnelle dans le gène *NPM1* est retrouvée très largement à la rechute, indiquant que cette mutation a permis le développement d'une LAM secondaire (Shlush et al., 2014).

3.5. Classification selon le risque pronostique

Toutes les classifications, qu'elles soient cytologiques, cytogénétiques ou moléculaires, ne prenaient pas en compte le pronostic sur l'évolution de la LAM. C'est pourquoi l'*European LeukemiaNet* (ELN) a proposé une stratification du risque selon les anomalies génétiques (**Tableau 2**) (Döhner et al., 2017). Ainsi, il est plus aisé pour le clinicien de déterminer le traitement adéquat, en fonction du type de LAM rencontrée et du risque d'évolution qui lui est associé.

Tableau 2. Stratification du risque pronostique selon les anomalies génétiques par l'*European LeukemiaNet* (révision de 2017 ; d'après Döhner et al., 2017).

Catégories de risque	Anomalies génétiques
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1) ; *RUNX1-RUNX1T1* inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; *CBFB-MYH11* Mutation dans *NPM1* sans *FLT3*-ITD, ou avec *FLT3*-ITDlow Mutation bi-allélique de *CEBPA*
Intermédiaire	Mutation dans *NPM1* avec *FLT3*-ITDhigh *NPM1* de type sauvage sans *FLT3*-ITD, ou avec *FLT3*-ITDlow (sans lésions génétiques de risque défavorable) t(9;11)(p21.3;q23.3) ; *MLLT3-KMT2A* Anomalies cytogénétiques ni favorables ni défavorables
Défavorable	t(6;9)(p23;q34.1) ; *DEK-NUP214* t(v;11q23.3); *KMT2A* réarrangé t(9;22)(q34.1;q11.2) ; *BCR-ABL1* inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; *GATA2, MECOM* (*EVI1*) -5 ou del(5q) ; -7 ; -17/abn(17p) Caryotype complexe, caryotype monosomal *NPM1* de type sauvage avec *FLT3*-ITDhigh Mutation dans *RUNX1* (excepté pour des LAM favorables) Mutation dans *ASXL1* (excepté pour des LAM favorables) Mutation dans *TP53*

B. Stratégies thérapeutiques et leurs limites

1. Chimiothérapie intensive

1.1. Thérapie d'induction

Depuis bientôt 50 ans, le traitement de la LAM « 7+3 » reste pratiquement inchangé (Lichtman, 2013). Il consiste à perfuser en continu de la cytarabine pendant 7 jours, avec en parallèle l'injection intraveineuse pendant les trois premiers jours d'une anthracycline, la daunorubicine (ou l'idarubicine, ou la mitoxantrone) (Döhner et al., 2017, 2015). Après traitement, environ 60 à 80 % des patients âgés de moins de 60 ans sont en rémission complète (RC), contre 40 à 60 % pour les plus âgés (≥ 60 ans) (Döhner et al., 2017).

1.2. Thérapie de consolidation

Après la phase d'induction, suit une thérapie de consolidation qui diffère selon l'âge du patient, mais surtout selon le risque génétique de la LAM dont il est atteint (**Tableau 2**). Pour les

patients âgés de 16 à 60 ans ayant un pronostic favorable ou intermédiaire, la thérapie consiste en des cycles de cytarabine à des doses moyennes. Pour ceux à risque intermédiaire, la transplantation allogénique de CSH peut également être envisagée, en fonction de l'existence d'un donneur compatible, ou alors une transplantation autologue à la suite d'une myéloablation à plus forte dose. Enfin pour les patients à risque défavorable, la transplantation allogénique est le seul recours. Pour les patients de plus de 60 ans, la thérapie est la même, mais avec des doses réduites de cytarabine, la transplantation de CSH étant évaluée au cas par cas en considérant le ratio bénéfice-risque de chaque patient (Döhner et al., 2017).

2. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques

La décision d'une transplantation de CSH est envisagée après analyse du rapport bénéfice-risque du patient qui tient compte de nombreux critères de sélection tels que l'âge, le type de LAM et l'état de santé général du patient. Généralement, elle est considérée pour des LAM à risque intermédiaire ou défavorable, avec une rechute potentielle de plus de 35 à 40 % (Döhner et al., 2017, 2015). Un conditionnement myéloablatif ou non-myéloablatif est induit pour favoriser la greffe. Le choix entre les deux se fait selon l'âge et les comorbidités du patient (**Figure 6**). Le plus souvent, le conditionnement myéloablatif consiste en une combinaison de cyclophosphamide et d'une irradiation totale, ou bien de cyclophosphamide et d'un agent alkylant le busulfan, aux propriétés anti-leucémique et myélotoxique. Le conditionnement non-myéloablatif est composé de fludarabine avec irradiation totale à des doses non-myéloablatives ou de fludarabine avec cyclophosphamide (ou busulfan ou melphalan). A noter que ces conditionnements peuvent être utilisés à des doses réduites, on parle alors de conditionnement d'intensité réduite, mais le risque de rechute est alors augmenté (Jethava et al., 2017).

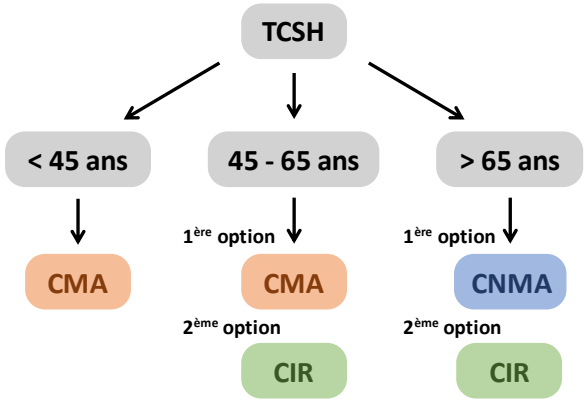


Figure 6. Arbre décisionnel du choix du conditionnement pour une transplantation de CSH. CIR : Conditionnement d'Intensité Réduite ; CNMA : Conditionnement Non-Myéloablatif ; CMA : Conditionnement Myéloablatif ; TCSH : Transplantation de CSH (d'après Jethava et al., 2017).

3. Traitements pour les patients inéligibles à la chimiothérapie intensive

Pour les patients âgés ou très fragiles, différents traitements sont envisageables, tels que de meilleurs soins de soutien, de faibles doses de cytarabine, ou plus récemment, des agents hypométhylants (decitabine ou azacitidine) (Döhner et al., 2017, 2015; Freireich, Wiernik, & Steensma, 2014). Les faibles doses de cytarabine peuvent donner une réponse dans 15 à 25 % des cas, mais avec une survie globale (SG) médiane de seulement 5 à 6 mois (Burnett et al., 2007). Avec le traitement par azacytidine, la SG médiane peut augmenter de presque 4 mois, comparée aux traitements conventionnels (faibles doses de cytarabine et soins de soutien), et la survie à 1 an passe de 34,2 à 46,5 % (Dombret et al., 2015). La decitabine, quant à elle, montre un taux de RC de 15,7 % comparé aux traitements conventionnels de 7,4 % (Kantarjian et al., 2012). Tous ces traitements n'étant pas pleinement satisfaisants, l'ELN recommande de proposer à ces patients leur participation à des essais cliniques (Döhner et al., 2017).

4. Thérapies ciblées

Au vu de la grande variété de LAM et aux réponses souvent partielles et différentielles de chaque patient aux traitements traditionnels, la recherche essaie de trouver des traitements plus spécifiques. Voici une liste non exhaustive des principales thérapies ciblées.

4.1. Acide tout trans-rétinoïque et trioxyde d'arsenic

Environ 10 à 15 % des LAM sont des leucémies aiguës promyélocytaires (LAP), caractérisées par une translocation t(15;17) entre les gènes *Promyelocytic Leukemia* (*PML*) et *Retinoic Acid Receptor A* (*RARA*), donnant la protéine oncogénique PML-RARα (Cull & Altman, 2014; de Thé, Pandolfi, & Chen, 2017). RARα est un facteur de transcription, qui active des gènes cibles impliqués dans la différenciation myéloïde, en présence de son ligand l'acide rétinoïque. À l'inverse, la protéine de fusion PML-RARα réprime cette transcription, même en présence d'acide rétinoïque physiologique, et empêche la formation de corps nucléaires (composés de protéines PML) qui jouent un rôle dans la mort cellulaire, plus particulièrement la sénescence via p53 et le contrôle de la sumoylation. Au final, la protéine oncogénique bloque la différenciation myéloïde, favorise l'autorenouvellement des cellules de LAP et empêche le contrôle de la mort cellulaire (de Thé et al., 2017; dos Santos, Kats, & Pandolfi, 2013).

Toutefois, il existe une chimiothérapie spécifique et ciblée, qui permet à plus de 90 % des patients d'atteindre une RC, composée d'acide tout trans-rétinoïque (ATRA) et de trioxyde

d'arsenic (ATO), qui agissent en synergie pour éradiquer la LAP (Cull & Altman, 2014; de Thé et al., 2017). D'une part, l'ATRA se fixe sur la partie RARα, favorisant la dégradation de la protéine de fusion et la transcription des gènes cibles impliqués dans la différenciation myéloïde. D'autre part, l'ATO se lie sur la partie PML, ce qui permet la sumoylation de la protéine de fusion et donc sa dégradation (de Thé et al., 2017).

4.2. Inhibiteurs de FLT3

Un tiers des patients atteints de LAM porte une anomalie sur le gène *FLT3* (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Döhner et al., 2017; Papaemmanuil et al., 2016). La duplication en tandem interne (*FLT3*-ITD) ou la mutation sur le domaine tyrosine kinase intracellulaire (*FLT3*-TKD) conduisent à une activité anormale du récepteur et, donc, l'activation des voies de signalisation en aval (Luppi, Fabbiano, Visani, Martinelli, & Venditti, 2018).

De nombreux inhibiteurs de FLT3 ont alors été développés. La midostaurine, le sorafenib, le sunitinib ou encore le tandutinib, qui font partie des molécules de première génération, sont des inhibiteurs à large spectre des tyrosines kinases. Ils ont une forte efficacité anti-leucémique, mais également des activités *off-targets* qui causent une toxicité importante. Pour pallier ce problème, des inhibiteurs de seconde génération ont été développés, tels que le crenolanib, le quizartinib ou le giltérinib. Ceux-ci sont plus spécifiques de FLT3 et ont donc moins d'effets *off-targets* et de toxicité. En revanche, ils ont moins d'efficacité anti-leucémique (Larrosa-Garcia & Baer, 2017).

Ces inhibiteurs se classent également en fonction de leur type d'interaction avec le récepteur FLT3. Ceux de type I, comme la midostaurine, se lient quand le récepteur est activé par son ligand FLT3, leur permettant de cibler à la fois FLT3-ITD et FLT3-TKD. Les inhibiteurs de type II, quant à eux, sont spécifiques de FLT3-ITD. En effet, ils se lient à une région uniquement accessible quand le récepteur est inactif, or la mutation *FLT3*-TKD conduit à une activité constitutive du récepteur (Larrosa-Garcia & Baer, 2017). Parmi ces inhibiteurs on retrouve notamment le quizartinib. A l'heure actuelle, de nombreux essais cliniques sont en cours pour tester l'efficacité de ces inhibiteurs, en combinaison ou non avec d'autres drogues, toujours dans le but de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques pour traiter ces types de leucémies.

4.3. Inhibiteurs d'IDH

Les mutations dans les gènes *IDH1* et *IDH2* sont rapportées dans environ 15 à 20 % des cas de LAM (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Papaemmanuil et al., 2016). IDH1 et 2 permettent la décarboxylation de l'isocitrate en α-cétoglutarate, respectivement dans le cytosol et la mitochondrie. À l'inverse, les protéines IDH1 et 2 mutées synthétisent du 2-hydroxyglutarate, à partir de l'α-cétoglutarate, ce qui réprime les enzymes dépendantes de l'α-cétoglutarate. Celles-ci, impliquées dans la déméthylation de l'ADN et des histones, conduisent à une hyperméthylation, favorisant un blocage de la différenciation myéloïde (Luengo, Gui, & Heiden, 2017; Stein et al., 2017).

Deux inhibiteurs ont été développés, l'ivosidenib et l'enasidenib, respectivement spécifiques de IDH1 et IDH2 mutées. Tous deux permettent de réduire la concentration en 2-hydroxyglutarate, réduisant l'hyperméthylation anormale, et de restaurer la différenciation myéloïde (Stein et al., 2017). Plusieurs essais cliniques sont en cours pour évaluer l'effet de l'ivosidenib dans des LAM avec mutation IDH1 (Dhillon, 2018). Pour l'evasidenib, un essai clinique de phase 1/2, montrant que 19,3 % des patients ayant reçu ce traitement ont atteint la RC (Luppi et al., 2018; Stein et al., 2017), a conduit à un deuxième essai clinique de phase 3. Celui-ci est en cours pour évaluer l'effet de l'enasidenib avec de meilleurs soins de soutien, dans des LAM primaires ou secondaires avec mutation *IDH2* (NCT02577406).

5. Cellules souches leucémiques

Malgré les avancées thérapeutiques de ces dernières années, environ 50 % des patients rechutent encore (Döhner et al., 2017, 2015). La rechute peut être liée à des propriétés cellulaires telles que l'expression de pompes à efflux à la membrane, permettant aux cellules d'expulser les drogues. Des transporteurs comme MDR1 (*Multidrug Resistance 1*) ou ABCG2 (*ATP-Binding Cassette super-family G member 2*) sont connus pour engendrer des résistances aux anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine ou idarubicine) ou aux inhibiteurs de tyrosine kinases (sorafenib et dasatinib). Des transporteurs tels que les CNT (*Concentrative Nucleoside Transporter*) ou les ENT (*Equilibrative Nucleoside Transporter*) peuvent être moins exprimés ou altérés (polymorphisme nucléotidique, délétion ou insertion), afin d'empêcher l'entrée des drogues dans la cellule, générant des résistances à des analogues de nucléosides comme la cytarabine, la décitabine et l'azacitidine, ou encore à des anthracyclines comme précédemment citées (Marin, Briz, Rodríguez-Macias, Díez-Martín, & Macias, 2016).

La plupart des traitements ciblent les cellules en cycle, il a donc émergé l'idée qu'une population de cellules leucémiques quiescentes, aux propriétés souches, survit et permet la ré-initiation d'une leucémie secondaire (Zagozdzon & Golab, 2015). Dans les années 90, l'existence d'une hiérarchie au sein des cellules de LAM voit le jour (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001; Zagozdzon & Golab, 2015). Il est démontré qu'une fraction des cellules de LAM, $CD34^+$ $CD38^-$, développe une leucémie après transplantation chez des souris immunodéficientes (Bonnet & Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). C'est la démonstration pour la première fois du concept de cellules souches leucémiques (CSL) ou cellules initiatrices de leucémie (CIL), porteuses du même phénotype que les CSH normales. Ceci a conduit à s'interroger sur l'origine de la cellule maligne, souche ou progénitrice.

Cependant, des études ont démontré que le phénotype n'était pas suffisant pour caractériser la CSL. En effet, les quatre populations de cellules de LAM, séparées selon l'expression des marqueurs de surface CD34 et CD38, réussissent à greffer chez des souris immunodéficientes à des fréquences variables, démontrant que les CSL ne sont pas restreintes à un phénotype souche $CD34^+$ $CD38^-$ (Eppert et al., 2011; Sarry et al., 2011). Eppert *et al.* montrèrent que les CSL expriment un panel de gènes propre aux CSH, et que le risque pronostique de la LAM est d'autant plus mauvais que les CSL expriment fortement ce panel (Eppert et al., 2011). De plus, l'équipe du Dr. D. Bonnet a prouvé que l'anticorps anti-CD38 utilisé affecte la capacité de greffe des cellules $CD38^+$ (Taussig et al., 2008). Néanmoins, même si on retrouve des CSL dans toutes les sous-populations CD34/CD38, elles sont grandement enrichies dans la population $CD34^+$ $CD38^-$ (Ng et al., 2016), et possèdent une chimiorésistance accrue à la daunorubicine (Costello et al., 2000) et à la cytarabine (Ishikawa et al., 2007). D'autres études rapportent également que les cellules chimiorésistantes ne seraient ni plus immatures, ni plus quiescentes, mais plutôt qu'elles auraient un métabolisme différent. Les cellules chimiorésistantes auraient une hausse des espèces réactives de l'oxygène (ROS), de la masse mitochondriale, de la consommation en oxygène et de la production d'ATP, en lien avec une phosphorylation oxydative (OXPHOS) importante (Farge et al., 2017; Henkenius et al., 2017).

Le fait d'avoir le même phénotype que les CSH normales a incité à trouver de nouveaux marqueurs pour les différencier (**Table 3**). La comparaison d'un grand nombre d'entre eux dans la fraction $CD34^+$ $CD38^-$ de cellules (LAM) de 132 patients a montré que CD123 et CD33 étaient ceux les plus exprimés dans les CSL (82,3 %), avec dans plus de 60 % des cas une expression différentielle entre les CSL et les CSH normales, faisant d'eux les meilleurs

marqueurs, suivis de CLL-1 (*C-type Lectin -Like molecule-1* ; 70 %) et de TIM-3 (62 %), appelé HAVcr-2 (*Hepatitis A virus receptor-2*) (Zeijlemaker et al., 2016).

Les CSL résident dans le microenvironnement médullaire qui, comme pour les CSH, participe à leur quiescence et leur autorenouvellement mais aussi à la chimiorésistance (Wang & Zhong, 2018; Zagozdzon & Golab, 2015). L'utilisation de combrétastatine permet de sensibiliser les cellules de LAM à la cytarabine et démontre l'importance de l'interaction entre CSM et cellules de LAM. En effet, cette drogue se lie à la tubuline, empêche la formation de microtubules essentiels à l'architecture du cytosquelette des CSM, et réprime ainsi l'expression de molécules d'adhésion. Tout ceci bloque alors les interactions entre le stroma et les cellules leucémiques qui se détachent, rentrent en cycle et sont sensibilisées au traitement (Bosse et al., 2016).

Tableau 3. Liste non exhaustive des différents marqueurs de surface des CSL (d'après Hanekamp, Cloos, & Schuurhuis, 2017). CLL-1 : *C-type Lectin-Like molecuke-1* ; TIM-3 aussi appelé HAVcr-2 : *Hepatitis A Virus receptor-2* ; NK : *Natural Killer*.

Marqueur	**Expression dans les cellules :**				**Références**
	Normales	**LAM (%)**	**CSH**	**CSL $CD34^+CD38^-$**	
IL1RAP	Cellules T	79	-	+	(Ågerstam et al., 2015; Askmyr et al., 2013; Barreyro et al., 2012)
CLL-1	Cellules myéloïdes	70	-	+	(van Rhenen et al., 2007a, 2007b; Zeijlemaker et al., 2016)
TIM-3	Cellules T activées, Cellules NK	91	-	+	(Jan et al., 2011; Kikushige & Miyamoto, 2013)
CD25	Cellules B et T activées	25	-	+	(Saito et al., 2010; Terwijn et al., 2009)
CD33	Cellules NK et myéloïdes	82	+	++	(Ehninger et al., 2014; Zeijlemaker et al., 2016)
CD44	Ubiquitaire	100	+	++	(Florian et al., 2006; Zeijlemaker et al., 2016)
CD45RA	Cellules T et myéloïdes	65	-	+	(Kersten et al., 2016)
CD47	Ubiquitaire	100	+	++	(Ponce et al., 2017)
CD56	Cellules T activées et cellules NK	32	-	+	(Zeijlemaker et al., 2016)
CD96	Cellules T activées	33	-	+	(Du et al., 2015; Hosen et al., 2007; Zeijlemaker et al., 2016)
CD99	Cellules myéloïdes	83	-	+	(Chung et al., 2017)
CD123	Cellules myéloïdes	82	+	++	(Ehninger et al., 2014; Jordan et al., 2000; Vergez et al., 2011; Zeijlemaker et al., 2016)

II. Le microenvironnement de la moelle osseuse

La MO se trouve dans tous les os du corps humain, que ce soit dans les cavités centrales des os axiaux ou dans les os appendiculaires, et représente environ 5 % du poids total du corps chez l'Homme. Le microenvironnement médullaire, où réside l'hématopoïèse, est composé de plusieurs types cellulaires, sécrétant des facteurs solubles indispensables pour l'équilibre entre quiescence, maintien et autorenouvellement des CSH (Travlos, 2006).

A. Concept de niches hématopoïétiques

Depuis quelques années, un consensus semble émerger autour de l'existence de deux types de niche hématopoïétique : la niche endostéale près de l'os et la niche vasculaire autour des vaisseaux sanguins (plus centrale) (Wilson & Trumpp, 2006). Cependant, au vu des nombreuses études qui débattent encore du rôle de chaque type cellulaire, il semblerait que la MO n'est pas constituée d'une ou de deux niches spécifiques, mais plutôt d'une multitude de niches aux fonctions différentes.

1. Niche endostéale

Les ostéoblastes sont à la frontière entre la MO et l'endosteum. Ils sont rapidement identifiés comme des acteurs clés dans le contrôle de l'hématopoïèse (Taichman & Emerson, 1994; Taichman, Reilly, & Emerson, 1996). Il est décrit que les ostéoblastes maintiennent les CSH dans la niche endostéale (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003) et favorisent leur quiescence via la N-cadhérine (Zhang et al., 2003). Des études d'imagerie révéleront cependant que les CSH ne sont pas associées, ou accrochées, aux ostéoblastes (Kunisaki et al., 2013; Nombela-Arrieta et al., 2013). En revanche, leurs facteurs sécrétés tels que CXCL12 (*CXC-Chemokine Ligand 12*, ou SDF-1 pour *Stromal-Derived Factor-1*), ou l'ostéopontine (OPN), favorisent la migration des CSH vers l'endosteum, puis leur rétention et leur quiescence au sein de la niche (Nilsson et al., 2005; Ponomaryov et al., 2000). En effet, le CXCL12 est le ligand du récepteur CXCR4 (*CXC-Chemokine Receptor type 4*, ou CD184), exprimé fortement par les CSH. L'axe CXCR4/CXCL12 est donc majeur dans la rétention des cellules dans le microenvironnement (Karpova & Bonig, 2015; Sugiyama, Kohara, Noda, & Nagasawa, 2006).

2. Niche vasculaire

Au sein même de cette niche, on peut distinguer la niche péri-sinusoïdale de la niche péri-artériolaire. En effet, les vaisseaux artériolaires sont moins perméables, maintiennent donc les CSH avec un faible niveau de ROS (CSH quiescentes), tandis que les sinusoïdes, plus perméables, exposent les CSH au plasma du sang et induisent une augmentation de leur ROS, ce qui favorise leur prolifération et différenciation (CSH actives) (Itkin et al., 2016). Cependant, d'autres études, telles que celle de Acar *et al.*, ont observé que plus de 85 % des CSH se trouvent autour des sinusoïdes, avec à la fois des cellules en division (CSH actives) et sans division (CSH quiescentes) (Acar et al., 2015). Ces différents constats confirment que le concept de niche est en perpétuelle évolution, rendant la recherche autour de ce sujet toujours d'actualité.

2.1. Cellules endothéliales

Ces cellules délimitent le contour des vaisseaux sanguins. Il a d'abord été démontré qu'elles favorisent la prolifération et la différenciation des cellules $CD34^+$ en culture *in vitro* (Rafii et al., 1995), et le maintien à long terme des CSH en soutenant leur autorenouvellement *in vitro* et leur capacité de repopulation *in vivo* (Butler et al., 2010). Par la suite, il a été prouvé que ce maintien passe par la sécrétion des facteurs SCF (*Stem Cell Factor*) et CXCL12 (Ding & Morrison, 2013; Ding, Saunders, Enikolopov, & Morrison, 2012b). Elles régulent également la prolifération des CSH via l'expression de E-selectine, puisque son inhibition induit la quiescence et favorise l'autorenouvellement des CSH (Winkler et al., 2012).

2.2. Cellules stromales/souches mésenchymateuses

Au vu du grand nombre de publications sur les CSM, l'*International Society for Cellular Therapy* (ISCT) a défini en 2006 les trois critères minimums définissant ces cellules. Premièrement, elles doivent avoir une adhérence au plastique en condition de culture standard. Deuxièmement, elles doivent exprimer des marqueurs de surface tels que CD90, CD73, CD105 ($\geq$ 95 % de la population), et au contraire ne pas exprimer CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 et HLA classe II ($\leq$ 2 % de la population). Troisièmement, elles doivent être capables de se différencier en adipocytes, ostéoblastes et chondroblastes (Dominici et al., 2006). Cette multipotence, fait des CSM les principaux composants de la niche hématopoïétique, et donc des actrices essentielles de l'intégrité du microenvironnement (Domenech, 2017).

Ces CSM ont également été appelées cellules périvasculaires par leur localisation. Il en existe différents types selon l'expression de facteurs spécifiques : les cellules LepR positives (exprimant le récepteur à la leptine, *Leptine-Receptor*) (Ding et al., 2012b), les cellules réticulaires CAR (*CXCL12-Abundant Reticular*) exprimant fortement CXCL12 (Sugiyama et al., 2006) ou encore les cellules exprimant la nestine (Méndez-Ferrer et al., 2010). Cependant il a été démontré que les CSM exprimant la nestine peuvent également être péri-artériolaires, et que seule la différence d'expression, mesurée par intensité de fluorescence de la GFP, permet de les distinguer. On distingue alors les CSM Nes-GFP^{dim} qui sont autour des sinusoïdes, des CSM Nes-GFP^{bright} qui sont autour des artérioles (Kunisaki et al., 2013). Une grande redondance existe entre tous ces types cellulaires, qui de manière générale maintiennent les CSH en quiescence et les retiennent dans la niche, notamment via la sécrétion de SCF et CXCL12 (Ding & Morrison, 2013; Ding et al., 2012b).

3. Autres constituants de la moelle osseuse

D'autres constituants font partie intégrante de la MO, tels que le système nerveux sympathique, l'innervant au niveau de l'endosteum et en parallèle des artérioles, avec la plupart des terminaisons nerveuses localisées au niveau des zones supportant l'hématopoïèse (Agarwala & Tamplin, 2018). Il est décrit que le G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) induit une signalisation adrénergique qui inhibe la sécrétion de CXCL12 produite par les ostéoblastes, conduisant à la mobilisation des CSH et donc leur sortie de la niche endostéale (Katayama et al., 2006). De plus, il a été démontré que le système nerveux sympathique agit également sur la sécrétion de CXCL12 par les CSM selon un rythme circadien via les récepteurs β3-adrénergiques, agissant sur la rétention et la mobilisation des CSH dans la niche (Méndez-Ferrer, Lucas, Battista, & Frenette, 2008). Enfin les cellules de Schwann ont aussi un rôle dans la rétention des CSH, en produisant du TGF-β (*Transforming Growth Factor-β*) actif (Yamazaki et al., 2011).

Les cellules mégacaryocytaires jouent également un rôle dans la quiescence des CSH, puisque leur déplétion conduit à la perte de quiescence des CSH, alors que la sécrétion de CXCL4 (*CXC-Chemokine Ligand 4*, ou PF4 pour *Platelet Factor 4*), normalement sécrété par les mégacaryocytes, restaure leur quiescence (Bruns et al., 2014). Ce dialogue passerait aussi par la sécrétion de thrombopoïétine (TPO) (Nakamura-Ishizu, Takubo, Fujioka, & Suda, 2014). D'autres études ont démontré l'implication des macrophages dans la régulation des CSH. En effet, leur délétion induit la mobilisation des CSH (Winkler et al., 2010). De plus, les

macrophages exprimant CD169 régulent la sécrétion de CXCL12 des CSM Nes-GFP^{+}, ce qui permet la rétention dans la niche des CSH (Chow et al., 2011). Une représentation de ce microenvironnement, avec ces différents composants et facteurs sécrétés (décrits plus en détails ci-dessus), est proposée dans la **Figure 7**.

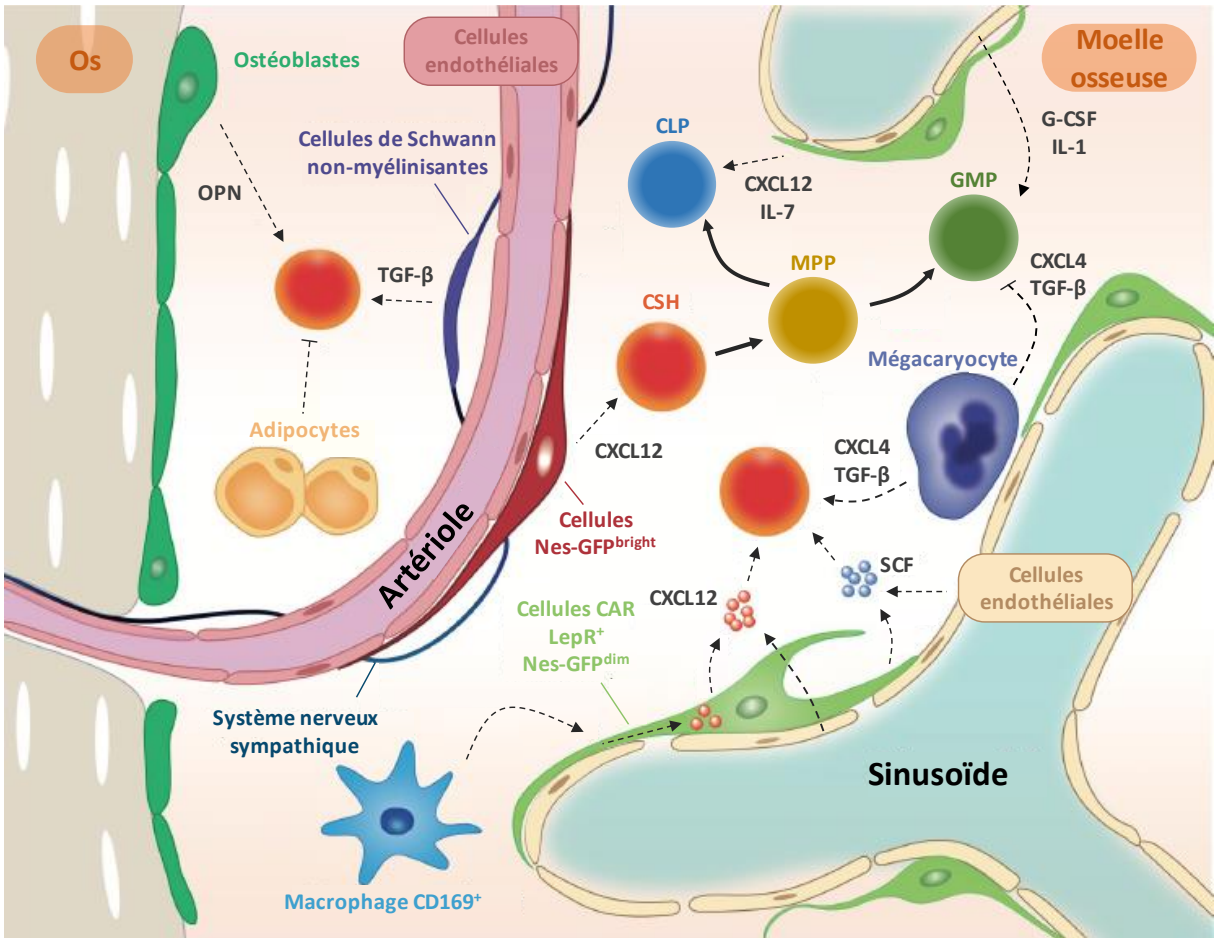


Figure 7. La niche hématopoïétique dans la moelle osseuse. Représentation schématique des différents constituants qui composent la niche des CSH et des progéniteurs, et de leurs facteurs sécrétés. CAR : *CXCL12-Abundant Reticular* ; CLP : *Common Lymphoid Progenitor* ; CXCL4/12 : *CXC-Chemokine Ligand 4/12* ; GMP : *Granulocyte-Monocyte Progenitor* ; IL-1/7 : Interleukine-1/7 ; LepR : *Leptin-Receptor cells* ; MPP : *Multipotent Progenitor* ; Nes-GFP : cellules exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la nestine ; OPN : Ostéopontine ; SCF : *Stem Cell Factor* ; TGF-β : *Transforming Growth Factor-β* (d'après Asada, Takeishi, & Frenette, 2017).

B. Niche hématopoïétique leucémique

Le modèle le plus généralement admis est que l'origine de la pathologie prend place par des anomalies des cellules leucémiques qui modèlent ensuite la niche pour se créer un environnement bénéfique à leur croissance. Cependant, il a été démontré que des altérations des cellules de la niche peuvent conduire au développement d'états pré-leucémiques.

1. Niche remodelée par les cellules leucémiques

De nombreuses études ont démontré que les cellules malignes sont capables d'induire des changements moléculaires dans les cellules de la MO, pour créer une niche leucémique qui favorise la croissance tumorale et bloque l'hématopoïèse normale.

L'une d'entre elles a mis en évidence le fait que les CSL de LAM induisent des changements dans le profil de transcription des CSM, notamment pour les gènes impliqués dans les interactions intercellulaires tels que CXCL12 et *Jagged 1* (JAG1). Ceci favorise la rétention et la chimiorésistance des CSL, au détriment des CSH normales. En effet, les CSH normales perdent leur capacité de repopulation *in vivo* après avoir été cultivées avec des CSM « reprogrammées » par des cellules de LAM (Kim et al., 2015a). Les blastes de LAM peuvent également provoquer des changements fonctionnels dans les adipocytes, induisant la lipolyse de triglycérides relargués dans le milieu. Ces acides gras sont alors transférés dans les blastes pour générer de l'énergie (via la β-oxydation), essentielle à la prolifération et croissance tumorale (Shafat et al., 2017).

Il est très souvent rapporté que les cellules leucémiques induisent la différenciation des CSM en cellules ostéoblastiques, ce qui détériore leur capacité à supporter les CSH et favorise la croissance tumorale. Ainsi, les cellules de la niche expriment du CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*), permettant un nichage accru et donc un environnement favorable à la leucémie (Battula et al., 2017). Cette différenciation est associée à la dégénérescence des fibres du système nerveux autour des artérioles (Hanoun et al., 2014), et impliquerait des interactions cellule-cellule, et la sécrétion de TPO et de CCL3 (*C-C motif Chemokine Ligand 3*) par les cellules leucémiques (Schepers et al., 2013). Si toutes ces études démontrent que les cellules malignes ont un impact sur les cellules de la niche, les mécanismes mis en jeu restent mal caractérisés.

Une étude a démontré que le dialogue entre microenvironnement et cellules leucémiques peut se faire via la sécrétion d'exosomes par les cellules leucémiques, qui sont ensuite internalisés dans les CSM. Cela induit alors l'expression de DKK1 (*Dickkopf-related protein 1*) par les CSM, qui est un suppresseur de l'hématopoïèse et de l'ostéogenèse. De plus, ces exosomes entraînent une baisse d'expression de facteurs supportant les CSH tels que CXCL12, conduisant à un microenvironnement favorable à la leucémie, au détriment de l'hématopoïèse normale (Kumar et al., 2018). Les CSH peuvent aussi transférer du matériel cellulaire tel que les mitochondries aux CSM voisines, via la connexine 43, afin de réguler et conserver un niveau

faible de ROS intracellulaires (Golan et al., 2016). Dans la LAM, le transfert a été observé des CSM vers les cellules leucémiques par endocytose (Moschoi et al., 2016) ou par des nanotubes appelés TNT (Marlein et al., 2017), leur conférant une résistance accrue aux chimiothérapies. A l'inverse, dans la LAL-T, les cellules leucémiques transfèrent leurs mitochondries aux CSM, pour baisser le stress oxydant induit par la chimiothérapie (Wang et al., 2018).

2. Leucémie initiée par la niche

Deux études ont suggéré que des anomalies de CSM peuvent contribuer au développement d'une hémopathie chez l'animal. En effet, des SMD sont induits par des cellules stromales altérées, soit par une délétion dans le gène codant pour la protéine RB (*Retinoblastoma protein*) (Walkley, Shea, Sims, Purton, & Orkin, 2007b), soit par un défaut du récepteur γ à l'acide rétinoïque qui induit une surproduction de TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-α*), connue comme une cytokine pro-inflammatoire favorisant le développement de tumeurs (Walkley et al., 2007a).

Par ailleurs, une délétion de *Dicer1* dans les ostéoprogéniteurs de la MO contribue chez la souris au dysfonctionnement du microenvironnement, aboutissant à des SMD et une LAM secondaire (Raaijmakers et al., 2010). En effet, cette délétion entraîne une réduction de l'expression de SBDS (*Shwachman-Diamond-Bodian Syndrome*), ce qui stimule la signalisation p53 dans les CSM et donc la sécrétion de molécules inflammatoires telles que S100A8 et S100A9 dans la niche. Tout ceci conduit alors à un stress génotoxique pour les CSH, caractérisé par une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial et des ROS, qui mène entre autres, à des dommages de l'ADN et à la mort cellulaire. Et cette détérioration de l'hématopoïèse normale favorise le développement leucémique (Zambetti et al., 2016).

De même, une mutation activant constitutivement la β-caténine dans les ostéoblastes promeut la surexpression de JAG1, ligand du récepteur Notch-1 présent sur les CSH. Cette suractivation de la voie Notch favorise l'apparition de mutations génétiques dans les cellules hématopoïétiques conduisant à une LAM (Kode et al., 2014). De manière globale, il semblerait donc que les cellules de la niche, comme les cellules leucémiques, peuvent induire des hémopathies malignes, rendant l'hétérogénéité de ces pathologies encore plus grande.

C. Modélisation de la niche hématopoïétique

Etudier les interactions entre le microenvironnement et les cellules hématopoïétiques humaines, normales ou malignes, requiert de développer des modèles de niches *in vitro*, et si possible *in vivo*, approchant des conditions physiologiques de la MO chez l'Homme.

1. Modèles de niches murines

C'est en 1961 que Till et McCulloch ont découvert une population de cellules issues de MO capables de former des colonies de cellules des différentes lignées hématopoïétiques dans la rate, autrement appelées CFU-S (*Colony-Forming Unit Spleen*), après transplantation dans des souris totalement irradiées (Till & McCulloch, 1961). À partir de ce constat, ils ont réussi à former ces colonies *in vitro*, renommées CFU-C (*Colony-Forming Unit Cell*), en les cultivant sur une couche de cellules adhérentes stromales de souris dans un milieu d'agar (Senn, McCulloch, & Till, 1967). Après avoir démontré que des CFU-C de souris peuvent être maintenues *in vitro* dans ces conditions (Dexter & Lajtha, 1974), le même résultat a été observé avec des CFU-C humaines qui sont continuellement produites sur plusieurs semaines (Gartner & Kaplan, 1980). Les cellules donnant ces CFU-C sont alors baptisées LTC-IC (*Long-Term Culture-Initiating Cells)* et sont positionnées avant les CFU-C dans la hiérarchie de l'hématopoïèse. Les cultures de LTC-IC ont été largement améliorées, notamment par l'ajout de cytokines dans le milieu (Sutherland, Eaves, Lansdorp, Thacker, & Hogge, 1991). Rapidement, ces mêmes tests ont été utilisés pour regarder les capacités des cellules leucémiques *in vitro*, notamment de LAM (Ailles, Gerhard, & Hogge, 1997). Entre autres, la capacité prolifératives des cellules leucémiques sur un stroma constitué de CSM murines (lignée cellulaire MS-5) semble pouvoir être un outil prognostique (Griessinger et al., 2016). Ces systèmes de coculture ont été adaptés et améliorés pour étudier les interactions entre microenvironnement et CSH normales d'une part (Burger, Spoo, Dwenger, Burger, & Behringer, 2003; Jing et al., 2010, 2012; Vaidya & Kale, 2015), et pathologiques d'autre part (Burger et al., 2003; Griessinger et al., 2014; van Gosliga et al., 2007). Cependant, le besoin d'un modèle capable de caractériser la hiérarchie des cellules hématopoïétiques, et particulièrement de déceler les cellules les plus immatures au sommet de l'hématopoïèse, s'est confirmé. De plus, bien que les systèmes de coculture 2D *in vitro* sont des modèles de niche très faciles à utiliser, ils leur manquent beaucoup de paramètres importants qui définissent le microenvironnement, tels que la structure tridimensionnelle de la niche et donc les interactions intercellulaires.

C'est ainsi qu'a eu lieu l'avènement des modèles *in vivo* de souris immunodéficientes dans les années 80-90. L'un des modèles les plus couramment utilisés dans les laboratoires est la souris NSG (NOD-SCID IL2R$\gamma^{-/-}$), qui a permis entre autres d'établir l'existence des CSL, comme décrit dans le chapitre précèdent (Bonnet & Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Leur système immunitaire complétement déficient font de ces souris de très bons modèles de xénogreffe, mais certains sous-types de LAM greffent mal, voire pas du tout (Abarrategi et al., 2017). De plus, le microenvironnement est uniquement composé de cellules murines avec leurs propres facteurs solubles, ce qui rend le contexte moins favorable pour les cellules humaines. Pour s'affranchir de ce problème, des chercheurs ont créé de nouveaux modèles murins exprimant quatre cytokines humaines essentielles au bon déroulement de l'hématopoïèse. Les gènes codants pour le M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), l'IL-3 et la TPO ont été insérés à la place de leurs homologues murins par *knock-in* (lignée MITRG). Une lignée similaire (MISTRG) a également bénéficié de l'ajout d'un transgène codant pour le récepteur SIRPα (*Signal Regulatory Protein α*), qui empêche les cellules hématopoïétiques humaines d'être phagocytées par les macrophages murins, par reconnaissance et liaison au CD47 humain (Rongvaux et al., 2014). Ces lignées de souris deviennent donc des modèles de niches dites « humanisées ».

2. Modèles de niches humanisées

Le besoin d'un environnement humain pour soutenir les cellules hématopoïétiques humaines chez la souris est déjà évoqué dans les années 1990. Des équipes ont alors créé des modèles de niche en implantant des os fœtaux humains dans des souris immunodéficientes (Chen et al., 1994; DiGiusto et al., 1994; Kyoizumi et al., 1992; McCune et al., 1988). Cependant, la difficulté à obtenir le matériel fœtal et l'efficacité croissante des modèles de souris immunodéficientes ont eu raison du développement de ces systèmes. Néanmoins, l'idée de créer une niche humaine ectopique chez l'animal a ressurgi ces dernières années.

2.1. « Osselets » à base de CSM et matrigel

Ainsi, plusieurs études ont montré la capacité des CSM de MO à former des os matures, appelés « osselets », après transplantation sous-cutanée chez des souris. Cette différenciation osseuse, faite préalablement *in vitro* ou directement *in vivo*, permet de recréer une niche hématopoïétique à partir de cellules humaines au sein de la souris (Abarrategi et al., 2018; Reinisch, Hernandez, Schallmoser, & Majeti, 2017). En 2012, Chen *et al.* ont injecté en sous-cutanée dans des souris

NSG un mélange comprenant à la fois des CSM et des cellules endothéliales humaines issues de MO avec du matrigel. Après seulement 8 semaines, des osselets vascularisés se sont formés. Ils ont également démontré que des cellules mononuclées (sang de cordon) et des cellules leucémiques (lignée cellulaire MOLM-13) migrent dans ces osselets (Chen et al., 2012). De même, des blastes de LAM et de LAL colonisent ces osselets, comme des cellules LAP qui greffent mal les modèles classiques (Reinisch et al., 2016).

2.2. Scaffolds

D'autres équipes ont créé des osselets *in vitro* en ensemençant des CSM dans des *scaffolds* composés de calcium et phosphate, et les ont implantés sous la peau de souris immunodéficientes. Après formation complète de l'osselet (entre 8 et 10 semaines), la prise de greffe de cellules $CD34^+$ (Groen et al., 2012; Holzapfel et al., 2015), de LAM de tous risques pronostiques (Antonelli et al., 2016) ou de myélome multiple (MM) (Groen et al., 2012) a réussi, et a conduit à une hématopoïèse humaine au sein de l'osselet.

2.3. Eponges

L'équipe du Dr D. Bonnet a créé également un modèle de *scaffold*, à partir de petites éponges poreuses formées de gélatine (Gelfoam, Pfizer) dans lesquelles sont cultivées des CSM avec des cellules de LAM, implantées ensuite chez des souris NSG. De manière surprenante, les LAM qui ne greffent peu ou pas (≤ 1 % de pourcentage de prise de greffe) dans le modèle NSG classique, sont capables d'initier une leucémie chez l'animal dans ce modèle, démontrant l'apport d'un microenvironnement humain (Abarrategi et al., 2017). Ce modèle présente aussi l'avantage d'un développement plus rapide, 10 à 12 semaines, au lieu des 20 à 34 semaines avec les modèles cités précédemment, et le modèle est également utilisable *in vitro* (Abarrategi et al., 2018).

De manière générale, les modèles *in vivo* peuvent atteindre certaines limites, notamment au niveau du coût des expériences, de l'éthique vis-à-vis de l'expérimentation animale, de la présence d'une animalerie dans le laboratoire ou ses environs, etc. De plus, même si ces systèmes se rapprochent de la physiologie humaine au niveau de l'osselet, ceux-ci restent implantés dans des souris. Afin de trouver une alternative, des modèles de coculture *in vitro* en 3D, utilisant des cellules humaines, ont vu le jour durant ces deux dernières décennies, alliant à la fois simplicité, éthique, et modélisation structurelle et complexe de la niche.

3. Modèles de niches humaines

Les CSM sont intéressantes pour des applications en médecine régénérative par leur capacité de différenciation multiple et leurs propriétés immunomodulatrices (Galland & Stamenkovic, 2019). Cependant, leur survie dans l'environnement de l'hôte étant limitée, le pré-assemblage des CSM en structure 3D permet d'augmenter leur taux de survie et leurs actions thérapeutiques (Laschke & Menger, 2017). Ces structures en 3D, contenant des CSM et/ou d'autres cellules du microenvironnement, portent au travers de la littérature différents noms tels que agrégats cellulaires, mésensphères ou sphéroïdes. Un large éventail de techniques différentes existe pour créer des structures de niche en 3D (**Figure 8**). Une partie des études reposent sur des systèmes plutôt complexes utilisant des matrices ou des *scaffolds* (Aljitawi et al., 2014; Bray et al., 2017; Ceccaldi et al., 2014; Grayson, Zhao, Izadpanah, Bunnell, & Ma, 2006; Leisten et al., 2012; Miyoshi, Morita, Ohshima, & Sato, 2015; Mortera-Blanco et al., 2012; Reagan et al., 2014). Cependant, beaucoup se basent sur la capacité des CSM à s'agréger naturellement, en renforçant le phénomène de gravité par l'utilisation de centrifugation, de cultures à mouvement rotatoire ou encore de supports aux revêtements non adhésifs (Cesarz & Tamama, 2016; Egger, Tripisciano, Weber, Dominici, & Kasper, 2018; Lin & Chang, 2008; Sart, Tsai, Li, & Ma, 2014).

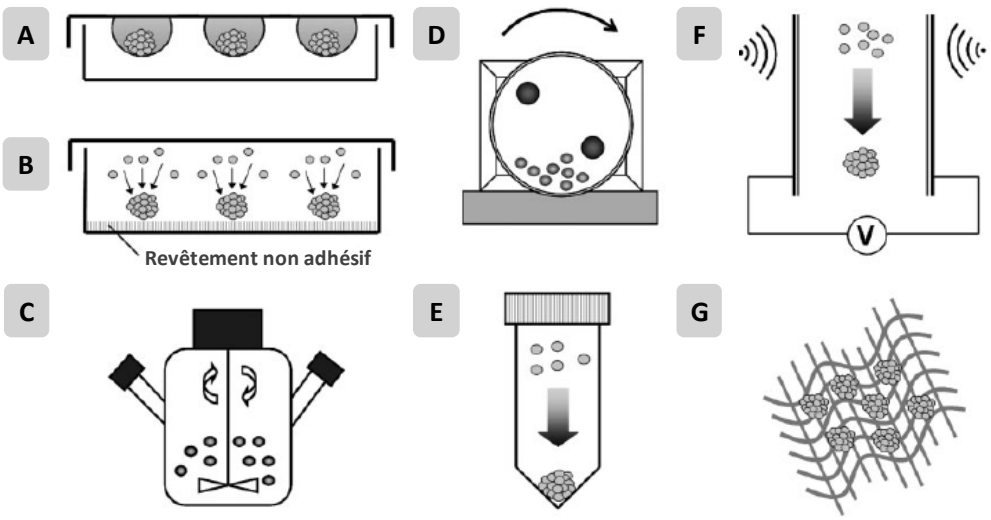


Figure 8. Différentes méthodes permettant la formation de sphéroïdes. (A) Technique des gouttes renversées, ou *hanging drops*. (B) Surface avec un revêtement non adhésif. (C) Système de flasque rotative. (D) Autre système de culture de cellules rotatoire. (E) Culot cellulaire par centrifugation. (F) Forces acoustique, magnétique ou électrique qui augmentent l'agrégation cellulaire. (G) Systèmes de *scaffolds* (d'après Lin & Chang, 2008).

Les deux principales techniques utilisées sont les plaques à faible adhérence et le système de gouttes renversées, ou *hanging drops* (Bartosh et al., 2010; Blocki et al., 2013; Matak et al., 2017; Saleh, Frith, Lee, & Genever, 2012; Saleh, Whyte, & Genever, 2011; Shearier, Xing, Qian, & Zhao, 2016). Plusieurs études utilisant ces méthodes rapportent l'utilisation de méthylcellulose dans le milieu pour augmenter sa viscosité (Blocki et al., 2013; Matak et al., 2017; Pennock et al., 2015; Saleh et al., 2012, 2011; Shearier et al., 2016). Les cellules de CSM sont cultivées dans leur milieu de base, supplémenté en méthylcellulose, puis transférées dans des plaques de puits à fond rond (Blocki et al., 2013; Matak et al., 2017; Pennock et al., 2015; Saleh et al., 2012, 2011), ou appliquées sous forme de gouttes sur un couvercle de boîte de pétri que l'on retourne (Matak et al., 2017; Shearier et al., 2016). Le fond rond de la plaque, ou de la goutte renversée, avec de la méthylcellulose dont la viscosité favorise l'agrégation, permet la sédimentation des cellules. La formation de sphéroïdes se fait alors en quelques heures (Pennock et al., 2015; Redondo-Castro et al., 2018; Saleh et al., 2012).

La complexité des sphéroïde peut devenir plus importante en y ajoutant d'autres types cellulaires : cellules endothéliales (Bray et al., 2017; Marshall, Barnes, & Genever, 2018; Shah & Kang, 2018) ou ostéoblastes (Bruce et al., 2015). Les CSH qui colonisent ces structures 3D prolifèrent moins et montrent un enrichissement en cellules de phénotype $CD34^{+}$ $CD38^{-}$ (Leisten et al., 2012; Sharma, Limaye, & Kale, 2012). Le maintien des CSH est dû entre autres à l'axe CXCR4/CXCL12 (De Barros et al., 2010; Sharma et al., 2012), à la β-caténine et la N-cadhérine (Wuchter et al., 2016), et à une multitude d'autres facteurs tels que l'angiopoïétine, des intégrines ou encore des molécules d'adhésion (Isern et al., 2013; Sharma et al., 2012). De manière similaire, les cellules de LAM (Aljitawi et al., 2014; Bray et al., 2017) et de LAL-B (Bruce et al., 2015) sont aussi capables de migrer dans ces sphéroïdes.

Afin d'améliorer les modèles 3D *in vitro*, des systèmes de miniaturisation d'organes sur « puce » ont été développés récemment. Les cellules du microenvironnement (CSM, ostéoblastes ou cellules artérielles) sont cultivées dans des *scaffolds* en céramique (Sieber et al., 2018) ou dans un mélange d'hydrogel mimant la matrice extracellulaire (Aleman et al., 2019), avant d'être implantées dans le système de puce ou MOC (*Multi-Organ-Chip*). Celui-ci a l'avantage d'avoir un réseau microfluidique qui perfuse en continu l'organe pour créer un environnement dynamique. La perfusion de CSH (Sieber et al., 2018) et de cellules de LAM (Aleman et al., 2019) a permis de quantifier les interactions avec le microenvironnement en matière de rétention et de nichage. De plus, ces systèmes sont capables de sécréter des facteurs

de croissance essentiels pour le déroulement de l'hématopoïèse, ainsi que de maintenir les CSH dans un statut immature ($CD34^+$ $CD38^-$).

D. Un microenvironnement hypoxique

L'oxygène est un élément dont l'importance dans les phénomènes biologiques s'est révélée de plus en plus incontournable ces dernières années. Alors qu'il cherchait à comprendre comment le taux d'oxygène régule l'expression de l'érythropoïétine (EPO), Gregg L. Semenza a découvert un facteur de transcription se liant à l'ADN de façon dépendante à l'oxygène, le facteur HIF-1α (Semenza & Wang, 1992). Les travaux de William G. Kaelin Jr. ont ensuite montré que le suppresseur de tumeurs von Hippel-Lindau (VHL), qui fait partie d'un complexe ubiquitine ligase, interagit avec HIF-1α. Il conduit à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Ohh et al., 2000). Enfin Peter J. Ratcliffe et William G. Kaelin Jr. démontrèrent comment cette interaction pouvait être dépendante de l'oxygène. En effet, des « senseurs » de l'oxygène, appelés PHD (*Prolyl Hydroxylase Domain*), hydroxylent HIF-1α uniquement en présence d'oxygène, permettant alors le recrutement de VHL (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). L'impact du faible niveau d'oxygène tissulaire souvent inférieur à 6 % (Harrison, Rameshwar, Chang, & Bandari, 2002), aussi appelé par comparaison au taux atmosphérique (21 %) hypoxie, dans la physiologie cellulaire mais aussi dans les processus cancéreux, est témoigné par l'attribution du prix Nobel de Médecine 2019 à ces trois chercheurs. La moelle osseuse est l'un des tissus les plus hypoxiques (Mohyeldin, Garzón-Muvdi, & Quiñones-Hinojosa, 2010) et de nombreux travaux ont montré l'effet de l'hypoxie sur l'hématopoïèse et la leucémogenèse. Nous avons publié une revue de la littérature traitant de l'hypoxie dans la leucémie jusqu'à 2016 (*cf.* **Annexe 1**). Nous reprenons, dans ce chapitre et le suivant, les éléments majeurs de cette revue, en y incluant les références plus récentes, en particulier en lien avec les aspects hypoxiques de la niche hématopoïétique.

1. Teneur en oxygène dans la moelle osseuse normale

La niche hématopoïétique est décrite comme un microenvironnement ayant de faibles teneurs en oxygène, phénomène appelé hypoxie, par comparaison à l'atmosphère qui en est composé d'environ 21 % (Nombela-Arrieta & Silberstein, 2014). De manière générale, les études visant à caractériser et préciser le taux d'oxygène dans la MO sont très peu nombreuses du fait de la complexité de mise en œuvre de telles expériences. Dans les années 2000, Chow *et al.* ont suggéré par des modèles mathématiques qu'un gradient d'oxygène pourrait exister dans la MO,

avec des zones plus hypoxiques où résideraient les cellules plus primitives (Chow, Wenning, Miller, & Papoutsakis, 2001). En effet, il a été admis que le taux d'O_2 dans la MO saine chez l'Homme variait entre 0,1 et 6 % d'O_2 (Harrison et al., 2002; Mohyeldin et al., 2010). Chez la souris, il a été également mis en évidence une hypoxie dans la MO inférieure à 2,5 % (Ceradini et al., 2004). Spencer *et al.* ont récemment développé une méthode non invasive pour mesurer directement les teneurs en oxygène chez l'animal vivant, par microscopie intravitale. Cette équipe a confirmé les faibles teneurs en oxygène mais fait tomber le dogme d'un gradient croissant des régions endostéales vers les régions plus centrales de la MO. En effet, ils ont mesuré environ 2 % d'O_2 dans les zones endostéales perfusées par de petites artérioles, et jusqu'à 1,3 % dans les zones péri-sinusoïdales (**Figure 9**) (Spencer et al., 2014). Ceci est intéressant puisque ces différentes niches sont supposées maintenir respectivement la quiescence des CSH et leur prolifération.

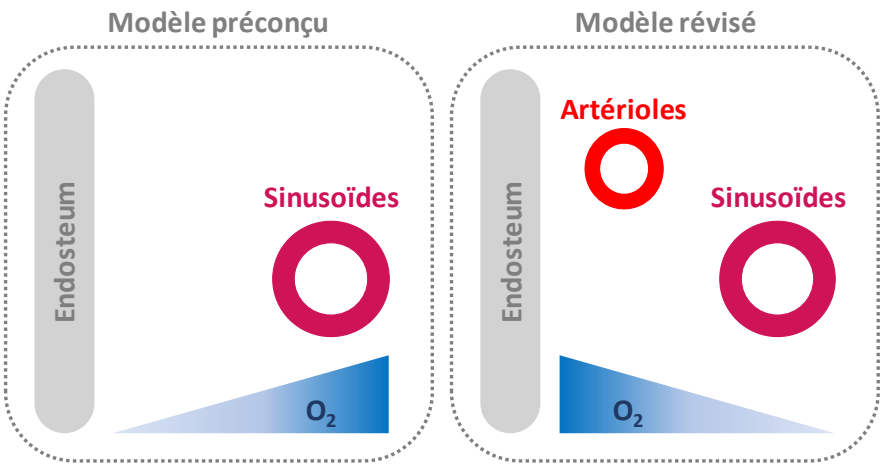


Figure 9. Schéma représentant les différents modèles du gradient d'oxygène au sein de la moelle osseuse (d'après Spencer et al., 2014).

L'hypoxie favorise le maintien des CSH cultivées *in vitro*, en baissant leur prolifération et en augmentant leur quiescence (Eliasson et al., 2010). D'autre part, la combinaison d'une coculture en hypoxie avec des CSM permet de maintenir d'autant plus efficacement ces CSH (Hammoud et al., 2012). Cette régulation passe par l'impact que peut avoir l'hypoxie sur les CSM, notamment sur leur survie, leur prolifération et leur métabolisme. Ces faibles teneurs en oxygène induisent la sécrétion de facteurs solubles tels que CXCL12, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou l'IL-6 qui maintiennent les CSH (Beegle et al., 2015; Holzwarth et al., 2010; Tamama et al., 2011).

Il a été démontré que la collecte et la manipulation de CSM primaires ou de sang de cordon en condition ambiante diminuent le potentiel de repopulation à long terme de ces cellules, et augmentent celles des progéniteurs. Ceci est induit par un stress ou choc extraphysiologique de l'oxygène qui conduit à une élévation des ROS et de la signalisation p53 mitochondriale. En revanche, ce phénomène peut être abrogé par l'utilisation de cyclosporine A qui protège les cellules collectées à l'air ambiant du stress induit par l'oxygène, ou par la collection et la manipulation de ces cellules en hypoxie, ce qui permet de conserver leurs propriétés de repopulation intactes (Mantel et al., 2015)

2. Teneur en oxygène dans la moelle osseuse leucémique

Selon l'étude de Fiegl *et al.,* réalisée sur des biopsies de MO de patients atteints de LAM, le pourcentage d'oxygène avoisinerait celui d'une MO saine, soit environ 6 % (Fiegl et al., 2009). Cependant pour d'autres, l'hypoxie augmenterait durant la progression tumorale dans des études chez l'animal comme dans des modèles de rat avec une LAP (Jensen et al., 2000), de souris avec une LAL-B (Rytelewski et al., 2019) ou un myélome multiple (Imai et al., 2017). L'apparition d'une hypoxie, qui augmente au cours du temps, a également été constatée dans un modèle de niche humanisée sous cutanée (*cf.* chapitre C.2.1.) dans lequel a été injecté des cellules de la lignée MOLM-13 de LAM (Chen et al., 2012).

De manière similaire aux CSH normales, l'hypoxie favorise *in vitro* le maintien des cellules leucémiques (Desplat et al., 2002; Giuntoli et al., 2006, 2007, 2011). Celui-ci est d'autant plus important lorsque l'on combine cette hypoxie avec la présence d'une couche de CSM (Griessinger et al., 2014). De plus, la niche hypoxique favorise la chimiorésistance des cellules leucémiques (Benito, Zeng, Konopleva, & Wilson, 2013; Griessinger et al., 2014; Martin, Diamond, Gronthos, Peet, & Zannettino, 2011; Petit et al., 2016), les protégeant des dommages à l'ADN, des stimuli de mort cellulaire ou encore du stress oxydatif (Ishikawa et al., 2007; Mimeault & Batra, 2013; Petit et al., 2016; Pollyea, Gutman, Gore, Smith, & Jordan, 2014).

Mesurer le taux d'oxygène *in vivo* nécessite des méthodes lourdes dont la précision peut être très rapidement affectée par l'atmosphère. Pour pallier ce problème, et quantifier la présence ou non d'hypoxie au sein de tissus ou cellules, l'expression de protéines induites par l'hypoxie peut être suivie. Les principaux régulateurs de la réponse à l'hypoxie sont les facteurs induits par l'hypoxie, ou facteurs HIF (*Hypoxia-Inducible Factors*).

III. Les facteurs induits par l'hypoxie

La famille des facteurs de transcription HIF possède trois hétérodimères, nommés HIF-1, HIF-2 et HIF-3, composés d'une sous-unité alpha sensible à l'oxygène (HIF-1α, HIF-2α et HIF-3α) et d'une sous-unité bêta exprimée de manière constitutive HIF-1β (ou ARNT ; *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) (Lee & Simon, 2012; Peng & Liu, 2015; Semenza, 2012). L'expression de HIF-1α est relativement ubiquitaire (Wang, Jiang, Rue, & Semenza, 1995), tandis que HIF-2α, aussi appelé EPAS1 (*Endothelial Per-ARNT-Sim (PAS) protein 1*), possède un profil d'expression plutôt spécifique de tissus, notamment au niveau endothélial (Keith, Johnson, & Simon, 2012; Lee & Simon, 2012; Peng & Liu, 2015). Sur HIF-3α, découvert plus récemment, il existe peu de données connues sur son expression et sa fonction (Duan, 2016; Heikkilä, Pasanen, Kivirikko, & Myllyharju, 2011; Yang, Wu, Xiong, & Fang, 2015). Cependant, il semble qu'il puisse y avoir une activité régulatrice des deux autres facteurs. En effet, lorsque l'ARNT est en condition limitante dans la cellule, HIF-1α et HIF-2α dimérisent avec HIF-3α, ce qui décroît leur activation de gènes cibles (Heikkilä et al., 2011).

A. Structure des HIF

Les protéines HIF-1α et HIF-2α ont des domaines en commun avec un certain degré d'homologie, comme représenté dans la **Figure 10** (Augstein, Poitz, Braun-Dullaeus, Strasser, & Schmeisser, 2011; Heikkilä et al., 2011; Kietzmann, Mennerich, & Dimova, 2016) :

- Le domaine N-terminal bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) impliqué dans la liaison à l'ADN
- Les deux domaines PAS (*Per-ARNT-Sim*) pour la dimérisation avec ARNT
- Un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène, appelé ODDD (*Oxygen-Dependent Degradation Domain*)
- Et des domaines de transactivations en N- et C-terminal, NTAD et CTAD (*N-/C-terminal Transactivation Domain*).

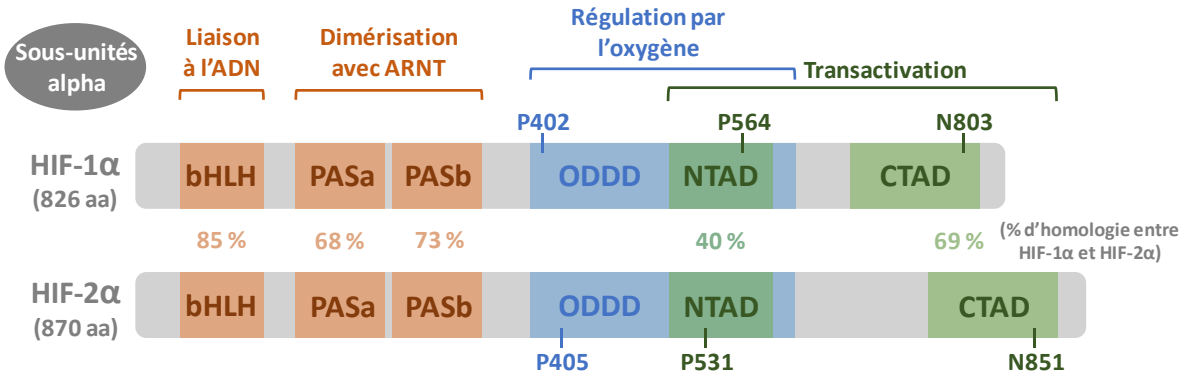


Figure 10. Structure des domaines composant les protéines HIF-1α et HIF-2α, avec les différentes fonctions et les positions des différents résidus hydroxylés. Le domaine bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) est impliqué dans la liaison à l'ADN, tandis que les domaines PAS (*Per-ARNT-Sim*) sont nécessaires à la dimérisation entre les sous-unités alpha et bêta. Le domaine ODDD (*Oxygen-Dependent Degradation Domain*) permet la régulation des sous-unités alpha par l'oxygène, via l'hydroxylation de résidus prolines par les PHD (*Prolyl Hydroxylase Domain*), qui nécessite la présence d'oxygène. Il existe enfin les domaines de transactivations NTAD et CTAD en N- et C-terminal (*N-/C-Transactivation Domain)*, avec notamment dans CTAD l'hydroxylation d'une asparagine par FIH (*Factor Inhibiting HIF1*), qui empêche le recrutement des coactivateurs p300/CBP. L'homologie entre les protéines est indiquée en pourcentage et l'abréviation « aa » signifie acide aminé (inspiré de Hong, Lee, & Kim, 2004; Kietzmann et al., 2016; Magliulo & Bernardi, 2018 et Patel & Simon, 2008).

La protéine HIF-3α, possède plusieurs variants qui ont été découverts de façon séquentielle. En effet, une étude analysant des bases de données a démontré qu'il pourrait exister 6 variants déclinés de HIF-3α1 à HIF-3α6 (Maynard et al., 2003). Cependant, une équipe a réussi à montrer l'existence de seulement quatre de ces variants, excluant HIF-3α3 et HIF-3α5, tout en découvrant 4 autres variants allant de HIF-3α7 à HIF-3α10 (**Figure 11**) (Heikkilä et al., 2011; Pasanen et al., 2010). Tous ces variants diffèrent par leur structure protéique et leur profil d'expression, mais tous interagissent avec HIF-1α, HIF-2α et ARNT (Duan, 2016; Kim et al., 2015b; Yang et al., 2015).

Et enfin la protéine ARNT possède les domaines bHLH et PAS, mais pas le domaine ODDD, ce qui fait que cette sous-unité n'est pas régulée par l'oxygène (Kietzmann et al., 2016; Kolonko & Greb-Markiewicz, 2019). Il existe également la protéine ARNT2 qui possède 57 % d'homologie avec ARNT. Si ARNT est exprimé de façon ubiquitaire, ARNT2 n'est exprimé que dans le cerveau et les reins dans les tissus adultes (**Figure 12**) (Hirose et al., 1996; Rankin & Giaccia, 2008).

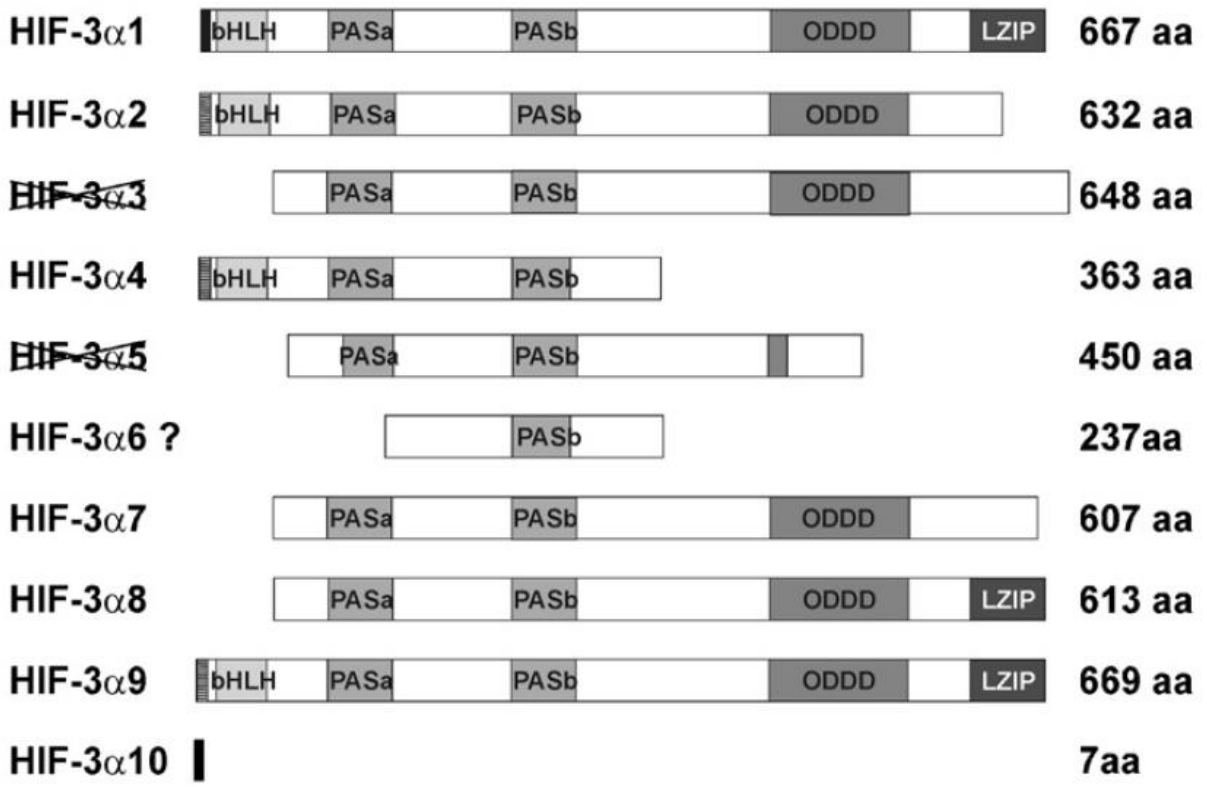


Figure 11. Structure des domaines composant les différents variants HIF-3α. Les variants possèdent des structures différentes. On retrouve toujours les domaines bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) et PAS (*Per-ARNT-Sim*) comme dans HIF-1α et HIF-2α, ainsi que le domaine ODDD (*Oxygen-Dependent Degradation Domain*), excepté pour HIF-3α4 et 6. Un domaine LZIP (*Leucine Zipper*) est retrouvé dans trois variants, permettant la liaison à l'ADN et l'interaction protéine-protéine. L'abréviation « aa » signifie acide aminé (inspiré de Duan, 2016; Heikkilä et al., 2011 et Pasanen et al., 2010).

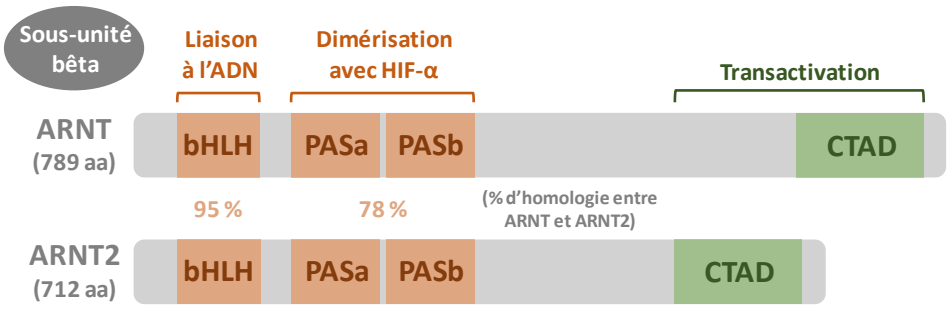


Figure 12. Structure des domaines composant les protéines ARNT et ARNT2. Le domaine bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) est impliqué dans la liaison à l'ADN, tandis que les domaines PAS (*Per-ARNT-Sim*) sont nécessaires à la dimérisation entre les sous-unités alpha et bêta. Il existe enfin le domaine de transactivation CTAD C-terminal (*C-Transactivation Domain*). L'absence du domaine ODDD (*Oxygen-Dependent Degradation Domain*) rend les protéines ARNT et ARNT2 insensibles au degré d'oxygène. L'homologie entre les protéines est indiquée en pourcentage et l'abréviation « aa » signifie acide aminé (inspiré de Hirose et al., 1996 et Rankin & Giaccia, 2008).

B. Régulation des facteurs HIF

1. Régulation dépendante du niveau d'oxygène

Les *Prolyl Hydroxylase Domain* (PHD) sont des protéines « senseurs » de l'oxygène, composées de trois membres PHD1, PHD2 et PHD3. En présence d'oxygène (normoxie), elles hydroxylent les sous-unités alpha sur des résidus prolines (chez l'Homme : Pro^{402} et Pro^{564} pour HIF-1α, Pro^{405} et Pro^{531} pour HIF-2α), grâce à deux substrats que sont la molécule d'oxygène et l'α-cétoglutarate, ainsi que deux cofacteurs que sont le fer et l'ascorbate (Gupta & Wish, 2017). PHD1 et PHD3 ont plus d'affinité pour HIF-2α et PHD2 pour HIF-1α (Appeldolf, 2004). Une fois hydroxylé, le motif est reconnu par un complexe E3 ubiquitine ligase contenant le suppresseur de tumeurs von Hippel-Lindau (VHL) qui conduit à leur ubiquitination et donc à leur dégradation par le protéasome 26S (Kietzmann et al., 2016; Koh & Powis, 2012; Lee & Simon, 2012; Peng & Liu, 2015; Semenza, 2012). En parallèle, HIF-1α est hydroxylé par la protéine FIH (*Factor Inhibiting HIF1*) sur un résidu asparagine (Asn^{803}) permettant l'inhibition du recrutement des coactivateurs p300/CBP (Lando et al., 2002; Semenza, 2012). FIH agit également sur HIF-2α (Asn^{851}) mais avec beaucoup moins d'efficacité (Koh & Powis, 2012).

En absence d'O_2, les PHD ne peuvent plus hydroxyler les sous-unités α ce qui engendre une stabilisation de ces sous-unités. Elles sont transloquées dans le noyau et dimérisent avec ARNT. Le complexe va alors se lier à des séquences RCGTC, nommées *Hypoxia-Response Element* (HRE), présentes dans les promoteurs des gènes cibles (**Figure 13)**. Ces derniers sont impliqués dans le métabolisme cellulaire et dans de nombreuses voies telles que l'angiogenèse ou l'apoptose (Lee & Simon, 2012; Martin et al., 2011; Peng & Liu, 2015).

HIF-1α est stabilisé très rapidement suite à une hypoxie, on parle de réponse initiale à l'hypoxie aiguë, alors que HIF-2α est stabilisé plus lentement lors d'une hypoxie chronique (Holmquist-Mengelbier et al., 2006; Koh & Powis, 2012). HIF-1α bénéficie d'un rétrocontrôle négatif lors d'hypoxie prolongée alors que HIF-2α se voit stabilisé. Cet effet passe, entre autres, par HIF-3α qui se lie de manière compétitive avec HIF-1α et HIF-2α à l'ARNT. Il peut aussi agir comme un régulateur négatif dominant en se liant directement avec HIF-1α et HIF-2α (Duan, 2016; Heikkilä et al., 2011; Li et al., 2009; Peng & Liu, 2015).

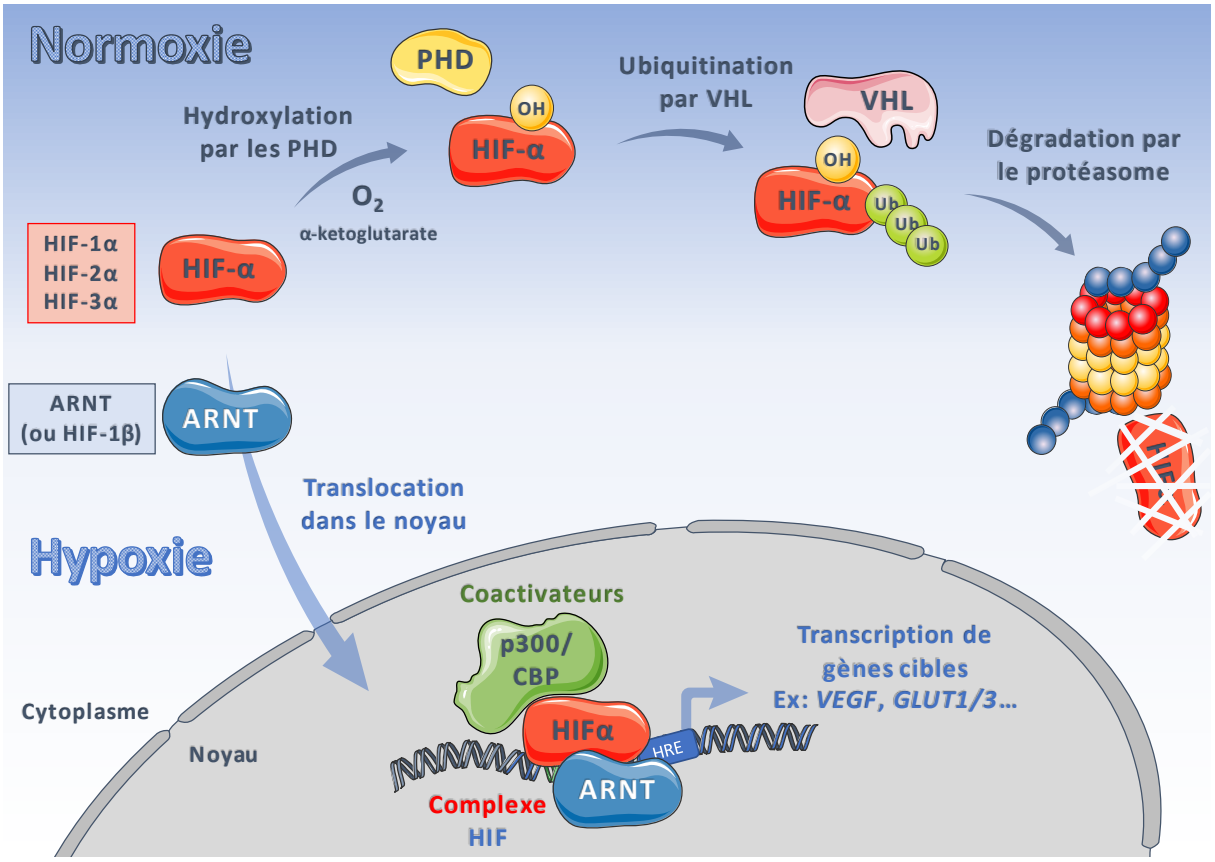


Figure 13. Schéma de la régulation des facteurs HIF en fonction de l'oxygène. En normoxie, les sous-unités alpha sont sujettes à l'hydroxylation et l'ubiquitination, respectivement par les PHD (*Prolyl Hydroxylase Domain*) et un complexe E3 ubiquitine ligase contenant VHL (*von Hippel-Lindau*), qui les conduit à leur dégradation par le protéasome. En hypoxie, elles sont stabilisées et donc transloquées dans le noyau. Leur dimérisation avec la sous-unité bêta (ou ARNT) forme le complexe HIF qui permet la transcription de gènes cibles en se liant aux séquences HRE (*Hypoxia-Response Element*), avec parfois la présence de coactivateurs tels que p300/CBP.

2. Régulation indépendante du taux d'oxygène

La protéine HIF-1α peut être stabilisée par des facteurs de croissance tels que la TPO. En effet, celle-ci augmente la stabilisation de HIF-1α en inhibant son ubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome (Kirito, Fox, Komatsu, Kaushansky, & Tpo, 2005). L'accumulation de HIF-1α peut également être induite par le SCF via les voies de signalisation PI3K/AKT (*Phosphoinositide-3-Kinase/AKT*) et ERK (*Extracellular signal-Regulating Kinase*) (Gibbs, Yasinska, Oniku, & Sumbayev, 2011; Pedersen et al., 2008).

D'autres protéines comme MEIS1 (*Myeloid Ecotropic viral Integration Site 1*) jouent un rôle important dans la régulation transcriptionnelle de HIF-1α et HIF-2α. Son inhibition dans des CSH conduit à la diminution d'expression des facteurs HIF, qui conduit à une augmentation des ROS, une perte de la quiescence et une augmentation de la mort cellulaire (Kocabas et al.,

2012; Zhang & Sadek, 2014). De la même manière, les facteurs HIF peuvent être régulés négativement. La stabilisation de HIF-1α est perturbée par la succinate déshydrogénase (SDH). En effet, le succinate est un inhibiteur des PHD, ce qui induit une stabilisation de HIF-1α. Lorsque sa concentration est diminuée par les SDH, les PHD peuvent hydroxyler HIF-1α et donc déclencher sa dégradation (Selak et al., 2005).

De plus, les oncogènes comme *FLT3*-ITD stimulent la traduction de HIF-1α via PI3K/AKT (Takubo & Suda, 2012) tandis que la mutation sur le gène *IDH* favorise l'activité des PHD qui aboutit à la dégradation de HIF (Peng & Liu, 2015).

C. Rôles et fonctions des HIF

1. En condition physiologique

En hypoxie, les facteurs HIF vont être stabilisés pour essayer de pallier le manque d'oxygène. Pour cela, trois grandes solutions sont alors mises en place au niveau des cellules (Semenza, 2013) :

- L'augmentation de l'expression de facteurs angiogéniques pour stimuler l'angiogenèse et ainsi multiplier la perfusion des tissus en oxygène (réoxygénation),
- La baisse de la prolifération pour diminuer le nombre de cellules consommant de l'oxygène,
- Et enfin, la baisse de la phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries pour diminuer la consommation d'oxygène intracellulaire, souvent concomitante avec une hausse de l'activité glycolytique pour fournir encore de l'énergie.

A l'origine, HIF-1α a été découvert par le Dr. Gregg L. Semenza comme un facteur favorisant la transcription de l'*EPO* en condition hypoxique, favorisant ainsi l'érythropoïèse (Semenza & Wang, 1992). Pour augmenter l'angiogenèse et le remodelage vasculaire, HIF-1α induit également la transcription de gènes codants pour des enzymes et des facteurs de croissance tels que VEGF-A (Lévesque et al., 2007).

De plus, HIF-1α maintient la quiescence des CSH par diminution de leur prolifération, soit en activant l'expression de protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que p27 et p57 (Eliasson et al., 2010), soit par sa stabilisation en présence d'inhibiteurs des PHD (Forristal et al., 2013).

De même, il a été démontré que le *knockout* (KO) chez la souris entraîne une sortie de quiescence et la perte des CSH (Takubo et al., 2010).

D'autres données montrent que la surexpression de HIF-1α induit l'expression de CXCR4, favorisant ainsi la prise de greffe des CSH chez la souris (Speth, Hoggatt, Singh, & Pelus, 2014). Cependant, les implications de HIF-1α sont particulièrement nombreuses et peuvent intervenir à différents niveaux, aussi bien sur les cellules hématopoïétiques que sur les cellules de la niche (**Figure 14**).

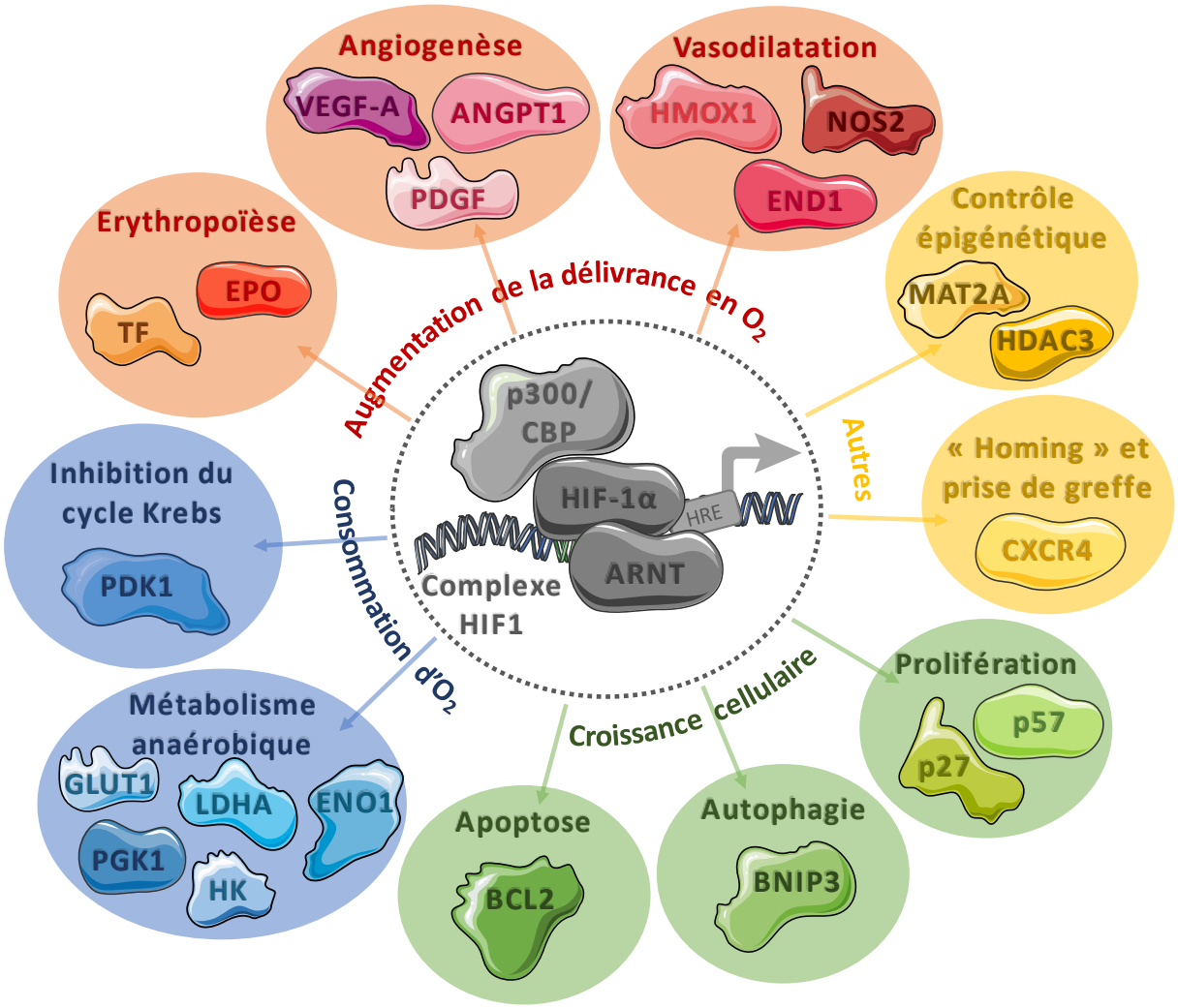


Figure 14. Schéma récapitulatif d'une partie de la signalisation induite par le complexe HIF1 en condition normale.

Le rôle de HIF-2α dans les CSH est encore controversé. En effet, le KO chez la souris n'entraîne aucun effet sur l'autorenouvellement et le maintien des CSH (Guitart et al., 2013). Cependant, une autre étude a démontré qu'il entraîne un défaut de l'hématopoïèse conduisant à une pancytopénie (Scortegagna, Morris, Oktay, Bennett, & Garcia, 2003b). Ceci est confirmé, dans

les cellules humaines, qui après extinction de HIF-2α, ont une augmentation du stress oxydant et du réticulum endoplasmique, conduisant à une perte de capacité de greffe dans un modèle de xénogreffe (Rouault-Pierre et al., 2013).

Les facteurs HIF ont aussi un rôle très important dans la régulation du métabolisme, mais cela sera décrit dans le chapitre suivant « IV. Le métabolisme oxydatif ».

2. En condition pathologique

Les facteurs HIF, tout comme l'hypoxie, sont généralement des marqueurs de mauvais pronostic dans les cancers solides (Deeb et al., 2011; Gao et al., 2015; Kontos et al., 2017; Li & Ye, 2010; Radwan, Hamdy, Hegab, & El-Mesallamy, 2016; Zhe et al., 2015), mais aussi dans les leucémies avec des surexpressions observées à la fois dans les LAM (Forristal et al., 2015; Gao et al., 2015; Kawada et al., 2013; Radwan et al., 2016; Wang, Liu, Malek, Zheng, & Liu, 2011), les LAL (Forristal et al., 2015; Radwan et al., 2016), les LLC (Kontos et al., 2017) et les LMC (Chen, Shen, Gong, Jiang, & Zhang, 2015; Zhang, Li, Xi, & Li, 2012). Les niveaux élevés de HIF-1α ont d'ailleurs été corrélés avec la sévérité de la maladie pour des patients atteints de LAM et SMD (Song et al., 2014; Tong, Hu, Zhuang, Wang, & Jin, 2012; Wang et al., 2011). Normalement absent dans les CSH normales, HIF-2α est retrouvé dans les cellules de LAM et LAL, mais n'est pas pronostic de la maladie (Forristal et al., 2015; Rouault-Pierre et al., 2013; Wellmann et al., 2004). Cependant, une controverse existe sur la fonction des facteurs HIF en tant qu'oncogènes ou suppresseurs de tumeurs.

2.1. Rôle oncogénique

L'inhibition de HIF-1α par un ARN interférent ou par des inhibiteurs chimiques dans les cellules humaines conduit à une baisse drastique, voire une éradication de la LAM dans des souris de xénogreffes, et aucune leucémie développée en transplantation secondaire (Coltella et al., 2014; Gao et al., 2015; Wang et al., 2014, 2011). Le même constat est observé pour la LAL (Giambra et al., 2015; Zou et al., 2013) et la LMC (Kawada et al., 2013; Zhang et al., 2012). De même, l'inhibition de HIF-2α par shARN inhibe la prolifération *in vitro* et la greffe *in vivo* (Coltella et al., 2014; Forristal et al., 2015; Rouault-Pierre et al., 2013). Les facteurs HIF régulent positivement les voies de signalisation telles que Notch ou Wnt, conduisant respectivement à l'invasion leucémique (Zou et al., 2013) et à la préservation des CSL (Giambra et al., 2015), et négativement sur des gènes suppresseurs de tumeurs comme p15, p16, p19 et p23 (Gao et al., 2015; Zhang et al., 2012).

La translocation t(8;21)(q22;q22) résulte en la protéine de fusion AML1/ETO, retrouvée dans environ 5 % des cas de LAM (Papaemmanuil et al., 2016). Cette protéine de fusion n'est pas capable par elle-même d'engendrer la leucémie, il faut d'autres mutations additionnelles telles que *FLT3* ou *JAK2*. Cependant, l'incidence de ces mutations varient entre 3 et 22 %, montrant que d'autres mécanismes sont impliqués. En effet, AML1/ETO et HIF-1α peuvent chacun transactiver l'autre, créant une boucle régulatoire positive, dont la co-expression des deux permet l'activation de la transcription de *DNMT3A*, qui méthyle en retour l'ADN. Cette hyperméthylation conduit à l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs et donc à la croissance leucémique (Gao et al., 2015).

L'hypoxie confère aux cellules de LAM une résistance aux drogues telles que la cytarabine (ou Ara-C) (Griessinger et al., 2014). HIF-1α favorise l'entrée des cellules de LAM en phase G_0/G_1 du cycle cellulaire, et diminue celles en phase S, grâce à la surexpression de p27 (Drolle et al., 2015). Cette quiescence des cellules renforce leur capacité de résistance face à l'Ara-C et à l'adriamycine (Griessinger et al., 2014; Song et al., 2014), puisque ces deux médicaments ciblent préférentiellement les cellules qui prolifèrent (Drolle et al., 2015; Matsunaga et al., 2012). Non seulement les HIF favorisent la quiescence, mais ils augmentent en parallèle la signalisation anti-apoptotique par augmentation de l'expression d'une protéine inhibitrice de l'apoptose, XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), et l'activation de la voie de pro-survie PI3K/AKT (Drolle et al., 2015). Dans les LAL-T, HIF-1α est capable d'activer Notch1 qui induit une forte expression de BCL-2 (*B Cell Lymphoma-2*) et BCL-XL (*B Cell Lymphoma-extra Large)*, ainsi que la baisse de l'activité des caspases 3 et 9. Ceci permet d'inhiber l'apoptose induite par la dexaméthasone (Zou et al., 2013).

Finalement, l'hypoxie et les facteurs HIF peuvent promouvoir le maintien de la maladie et sa progression à travers différents mécanismes tels que la quiescence et le cycle cellulaire (Forristal et al., 2013; Takubo et al., 2010), et même les fonctions immunitaires (Palazon, Goldrath, Nizet, & Johnson, 2014), qui sont importants en conditions physiologiques normales et dérégulés dans les cancers (Gezer, Vukovic, Soga, Pollard, & Kranc, 2014; Koh & Powis, 2012).

2.2. Rôle de suppresseurs de tumeurs

Malgré une très large majorité de publications prouvant l'effet oncogène des facteurs HIF, d'autres travaux montrent des effets antitumoraux. Une translocation chromosomique rare avec

un réarrangement entre les gènes *TEL* et *ARNT*, conduit à la protéine de fusion TEL-ARNT. Celle-ci est responsable d'un effet dominant négatif sur l'activité de HIF-1α, qui confère une fonction de suppresseur de tumeurs (Nguyen-Khac et al., 2006). Cependant, le projet n'a été initié qu'à la suite d'une telle observation sur un seul patient, conférant le caractère exceptionnel de cette translocation (Salomon-Nguyen et al., 2000). Cependant, ARNT est aussi un partenaire de AhR, un facteur impliqué dans la réponse aux contaminants environnementaux et xénobiotiques (Zhang et al., 2017). Il est donc difficile de définir les conséquences exactes de la translocation.

Par ailleurs, Velasco-Hernandez *et al.* ont montré une amélioration de la survie de souris ayant une LAM, induite par les oncogènes MLL-AF9 et HoxA9-Meis1, après l'inhibition de HIF-1α, et suggèrent qu'il n'est pas impliqué dans l'initiation ou la progression leucémique (Velasco-Hernandez, Hyrenius-Wittsten, Rehn, Bryder, & Cammenga, 2014; Velasco-Hernandez, Tornero, & Cammenga, 2015). Cependant, une augmentation de l'expression de HIF-2α consécutive au KO de *HIF1A* est observée, ce qui soulève la question d'un effet compensatoire de HIF-2α. Cette compensation est aussi observée dans les cellules humaines de LAM déficientes en HIF-1α, réimplantées chez des souris immunodéficientes (Rouault-Pierre et al., 2013). En utilisant le modèle MLL-AF9, Velasco-Hernandez *et al.* ont ensuite étudié l'effet de la combinaison du KO de *HIF1A* et de la chimiothérapie (Ara-C/doxorubicine). Les résultats confirment l'effet pro-tumoral de l'absence de *HIF1A*, mais ils montrent également une accélération de ce processus après traitement des souris (Velasco-Hernandez et al., 2019). L'effet compensatoire de HIF-2α n'est toujours pas pris en compte dans cette étude. Cependant, le KO de *HIF2A* dans des modèles de souris de LAM induite par Meis1/AF9 ou MLL-AF9, réalisé par une autre équipe, augmente le développement des CSL, mais une fois que la leucémie est établie, il n'a plus d'impact sur leur maintien ou leur propagation. La double inhibition de *HIF1A* et *HIF2A* démontre que les HIF en synergie permettent le développement de la LAM, sans aucun rôle dans la propagation leucémique (Vukovic et al., 2015). Cette étude montre que les facteurs HIF n'ont un effet qu'en phase d'initiation de la leucémie chez l'animal, mais qu'ils n'ont aucun impact dans son développement et son maintien.

Finalement les effets hors cibles des shARN et la faible spécificité des drogues qui inhibent les HIF, comparés aux KO, pourraient expliquer cette controverse entre les études. Cependant, le KO peut aussi induire des adaptations cellulaires avec des effets compensatoires, alors que l'inhibition brusque des HIF dans une leucémie établie pourrait induire un stress fatal aux cellules. Les différences peuvent aussi survenir des modèles utilisés, souris *versus* humain, et

des différentes constructions de gènes pro-tumorales utilisées pour générer la leucémie. Il serait pertinent d'évaluer la surexpression de HIF dans des modèles de LAM, et ainsi observer si l'augmentation des HIF retarde le développement de la maladie. Il est fort probable que la stabilisation des HIF, comme démontré par l'inhibition de VHL dans les CSH, induit la quiescence des cellules (Takubo et al., 2010).

De plus, une étude a montré que l'hypoxie intermittente augmente la survie des souris ayant une LAP (Liu et al., 2006). De manière similaire, dans la LMC, l'induction d'HIF-1α après une exposition courte d'hypoxie (5 h) a délivré un signal de survie accrue aux cellules, alors qu'une exposition longue (22 h) a donné des signaux de mort cellulaire (Di Giacomo, Rapino, Miscia, Di Giulio, & Cataldi, 2009). Également dans un modèle de LAL, 24 h d'exposition à l'hypoxie confère de la chimiorésistance comparée à des expositions plus longues (48 à 72 h) (Silveira et al., 2014). L'ensemble de ces données suggère que la durée d'incubation en hypoxie peut promouvoir ou inhiber la progression et le maintien de la leucémie, expliquant l'activité suppresseur de tumeurs ou oncogénique. Ainsi, l'action des HIF n'est pas uniquement dictée par leur niveau d'activité mais aussi par la durée et l'intensité du signal, et donc la réponse cellulaire.

D. Ciblage thérapeutique des facteurs HIF

1. Inhibiteurs des facteurs HIF

Il semble difficile, au vu de ces effets controversés, de dire si l'inhibition des facteurs HIF peut être une nouvelle approche thérapeutique dans la leucémie. Cependant, des inhibiteurs pharmacologiques ont été testés et la preuve de concept a été faite en utilisant de l'échinomycine, laquelle bloque la liaison du complexe HIF-1 à l'ADN (Kong et al., 2005). Cette drogue cible préférentiellement les CSL de LAM en promouvant leur apoptose et en diminuant la masse leucémique. Ceci prolonge alors la survie des souris et abolit le développement de la leucémie dans des transplantations secondaires (Wang et al., 2014, 2011). De plus, cette drogue n'a pas montré d'effet délétère sur l'autorenouvellement et la différenciation des CSH normales, ce qui fait de cette molécule un traitement intéressant de ciblage des CSL (Wang et al., 2014).

L'acide L-ascorbique connu pour avoir un effet anti-leucémique, conduit à la mort cellulaire en générant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dans la LMC, l'expression de HIF-1α est diminuée

après traitement à l'acide L-ascorbique, entraînant une baisse de la croissance leucémique. Cet effet semble être assez spécifique de HIF-1α, puisque sa surexpression dans des cellules K562 bloque l'effet de cet acide (Kawada et al., 2013).

D'autres petites molécules sont des inhibiteurs spécifiques de HIF-1α, telles que l'EZN-2968 et l'EZN-2208, qui sont des ARN antagonistes se fixant spécifiquement sur l'ARN messager de HIF-1α, bloquant ainsi son expression (Greenberger et al., 2008). L'utilisation de ces inhibiteurs confèrent une activité anti-leucémique et prolongent la survie des souris ayant une LAP, en inhibant HIF-1α. De plus, la combinaison de ces molécules avec de l'acide tout trans-rétinoïque (traitement classique de la LAP) permet l'éradication de la leucémie. Qui plus est, les deux molécules sont non toxiques pour les CSH normales (Coltella et al., 2014; Coltella, Valsecchi, Ponente, Ponzoni, & Bernardi, 2015).

Plus récemment, un nouvel inhibiteur de HIF-1α, nommé 2-methoxyestradiol, a été développé. Il inhibe l'expression génique et protéique de HIF-1α dans des lignées cellulaires de LAM. Son effet est plus fort que le traitement classique de l'Ara-C, et une IC_{50} de 2,08 µM pour tuer les cellules leucémiques *versus* 14,8 µM pour les cellules normales, assure un bénéfice de ce traitement sans impacter l'hématopoïèse normale. De plus, l'inhibition de HIF-1α par le 2-methoxyestradiol a pour conséquence une augmentation des ROS qui induit l'apoptose cellulaire (Zhe et al., 2016).

L'acriflavine (ACF), inhibant la dimérisation des sous-unités alpha et bêta, diminue le développement de LMC *in vivo* et réduit le maintien des CSL, sans avoir d'impact nocif immédiat sur les CSH normales aux doses utilisées (Cheloni et al., 2017).

Ces données offrent de nouvelles options thérapeutiques, ciblant les HIF dans la leucémie. D'autres approches pourraient être la combinaison des inhibiteurs de HIF qui ciblent les CSL quiescentes, en ajoutant un traitement qui cible les cellules sorties du cycle, tel que l'Ara-C.

2. Drogues activées en hypoxie

Une autre stratégie thérapeutique a été proposée, qui utilise l'hypoxie pour activer des drogues, permettant un ciblage des cellules tumorales résistantes présentes dans les régions hypoxiques. Brièvement, ces prodrogues possèdent des groupements contenant des atomes d'azote, qui sont réduits uniquement en absence d'oxygène en amine ou hydroxylamine correspondants, conférant une cytotoxicité uniquement en hypoxie. Pour exemple, la prodrogue PR-104 est

réduit en PR-104A en hypoxie, ce qui induit une molécule cytotoxique qui cause des cassures simple brin en se liant à l'ADN (Patterson et al., 2007). Chez l'animal, le PR-104 altère la progression de la LAL, diminue l'infiltration des tissus et prolonge la survie des souris (Benito et al., 2011; Patterson et al., 2007). Cette prodrogue a donné lieu à un essai clinique de phase 1/2 dans une cohorte de 50 patients atteins de LAM et LAL secondaires. Les résultats montrent que le nombre de cellules leucémiques hypoxiques est réduit en présence du traitement (Konopleva et al., 2015).

Le TH-302 est une autre prodrogue activée par de faibles taux d'oxygène (Hu et al., 2010; Portwood et al., 2013). Testée *in vitro* sur des cellules de LAM, elle engendre des dommages à l'ADN et de l'apoptose. *In vivo*, cette prodrogue favorise la survie des souris en diminuant la charge leucémique (Portwood et al., 2013). Dans un modèle murin de LAM avec *FLT3*-ITD, la combinaison du TH-302 avec du sorafenib (inhibiteur de tyrosine kinase) améliore la survie comparée à une seule prise de sorafenib ou de TH-302 (Benito et al., 2016).

Au vu de tous ces résultats, et malgré une controverse quant à l'effet oncogénique ou suppresseur de tumeurs des facteurs HIF, il semble que les cibler soit une bonne approche thérapeutique pour traiter la leucémie.

IV. Le métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif inclut les processus biologiques régulant l'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène ou *Reactive Oxygen Species* (ROS).

A. Les espèces réactives de l'oxygène

Les ROS sont des molécules de courte durée de vie, initiées par réduction partielle de l'oxygène (**Figure 15**). Elles sont depuis longtemps associées au cancer parce qu'au-delà d'un seuil, elles provoquent un stress oxydant et induisent des dommages de l'ADN, de protéines et de lipides. En revanche, les ROS sont également reconnues comme des seconds messagers cruciaux de la signalisation cellulaire (Bigarella, Liang, & Ghaffari, 2014; Moloney & Cotter, 2018). Le niveau de ROS résulte donc d'un équilibre finement régulé entre leur production par les systèmes oxydants et leur élimination par les systèmes antioxydants.

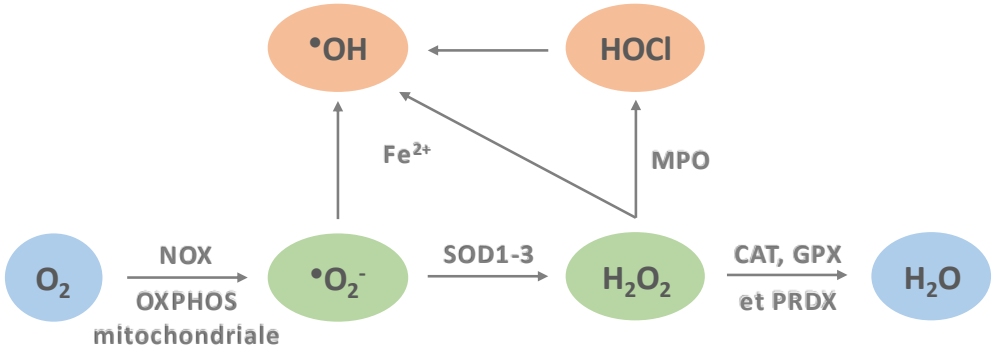


Figure 15. Les différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'ion superoxyde $^{\bullet}O_2^-$ est un produit de la réduction partielle de l'O_2, se faisant principalement via les NADPH oxydases (NOX) et au niveau de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondriale. Cet ion superoxyde est ensuite réduit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) via les enzymes superoxydes dismutases (SOD1-3), puis en molécule d'eau (H_2O) par la catalase (CAT), les glutathionnes peroxydases (GPX) et les peroxirédoxines (PRDX). L'$^{\bullet}O_2^-$ et l'H_2O_2 peuvent également se transformer en radical hydroxyle $^{\bullet}OH$ en présence de Fe^{2+}, et l'H_2O_2 en acide hypochloreux (HOCl) via la myélopéroxydase (MPO). Le bleu représente des molécules neutres sans réactivité, le vert des molécules à réactivité modérée et le rouge à réactivité forte (inspiré de Bigarella et al., 2014; Hole, Darley, & Tonks, 2011 et Moloney & Cotter, 2018).

1. Sources de ROS

Les ROS sont produites principalement via la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondriale au niveau de la chaîne de transport des électrons. Elles peuvent également être générées en réponse à une infection bactérienne ou à des xénobiotiques comme mécanisme de défense (Zhang et al., 2016a).

1.1. Mitochondries

La chaîne respiratoire dans la mitochondrie est le lieu d'oxydation du NADH en $FADH_2$, dont la réaction fournit des électrons qui sont transportés au travers des quatre différents complexes de la chaîne (complexes I à IV). Ce transport est responsable du gradient électrochimique de protons entre l'espace intermembranaire de la mitochondrie et sa matrice, permettant à l'ATP synthétase de produire de l'ATP. C'est également ce transport qui permet au complexe IV de transformer l'O_2 en molécule d'eau (Zhou, Shao, & Spitz, 2014). Cependant, entre 0,1 et 1 % de l'oxygène consommé par l'OXPHOS engendre des ROS (Moloney & Cotter, 2018; Tahara, Navarete, & Kowaltowski, 2009). Les complexes I et III de cette chaîne respiratoire produisent notamment de l'ion superoxyde $^{\bullet}O_2^-$ dans la matrice mitochondriale. Le complexe III en relargue également dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie à hauteur de 80 %, contre 20 % dans la matrice (Moloney & Cotter, 2018) (**Figure 16**).

1.2. Autres sources

Une deuxième source importante de production de ROS est la famille des Nicotinamides Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) oxydases, ou NOX (Zhang et al., 2016a). La production des ROS au cours du stress oxydatif est une fonction première de ces enzymes. Les ROS sont produites pour détruire les pathogènes et non comme des sous-produits ou déchets métaboliques (Brewer, Garcia, Onak, Carroll, & Chang, 2015). Il existe d'autres sources générant des ROS, telles que les cyclooxygénase (COX), les lypooxygénases, les xanthines oxydases (XO), les amines oxydases, les acyl-CoA oxydases ou le cytochrome P450 (CYP) (Brewer et al., 2015; Moloney & Cotter, 2018). En outre, certains facteurs peuvent également renforcer et induire leur formation comme le TNF-α, l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et l'interleukine 1β (IL-1β), ou encore des signaux d'hypoxie ou d'irradiation (Zhang et al., 2016a) (**Figure 16**).

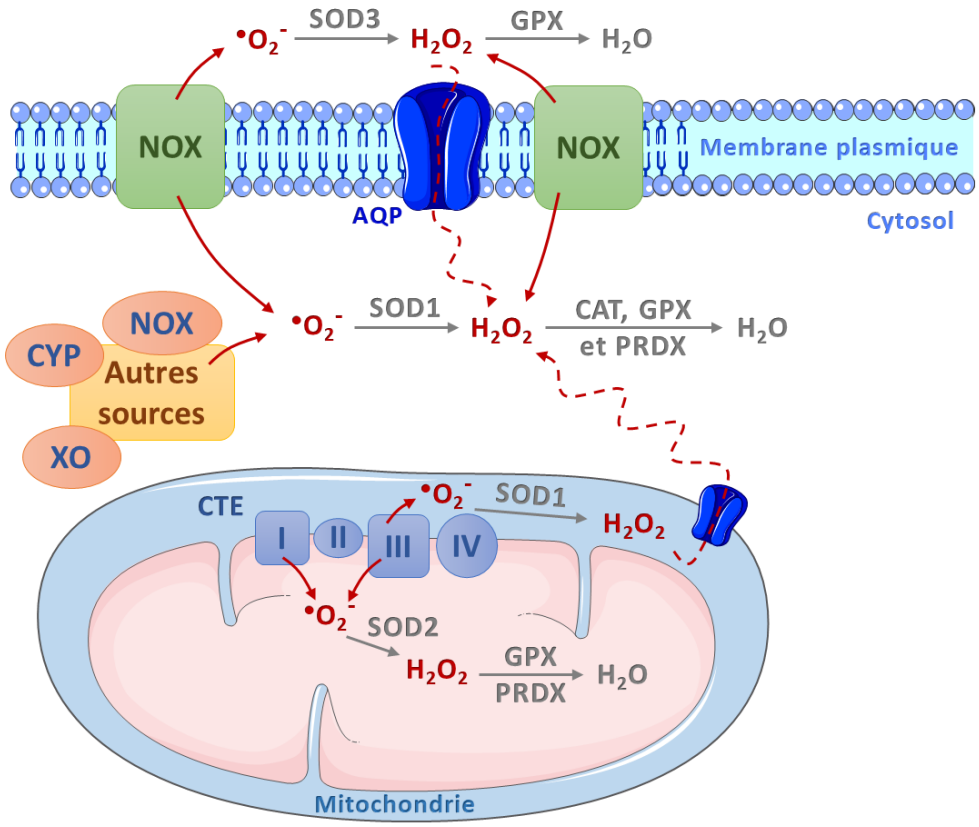


Figure 16. Schéma récapitulatif des différentes sources de ROS et des systèmes antioxydants intra- et extracellulaires. Les ions superoxydes $^{\bullet}O_2^-$ sont produits au niveau de la chaîne de transport des électrons (CTE) dans la mitochondrie par les complexes I et III, par les NADPH oxydases (NOX), le cytochrome P450 (CYP) et les xanthines oxydases (XO) entre autres. Ils sont alors réduits en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les superoxydes dismutases (SOD) : SOD1 dans le cytosol et l'espace intermembranaire de la mitochondrie, SOD2 dans la matrice mitochondriale et SOD3 en extracellulaire. Selon la localisation, le H_2O_2 est ensuite transformé en molécule d'eau (H_2O) par la catalase (CAT), les glutathionnes peroxydases (GPX) et les peroxirédoxines (PRDX). L'H_2O_2 peut diffuser à travers les membranes grâce aux aquaporines (AQP).

2. Systèmes antioxydants

L'ion superoxyde $^{\bullet}O_2^-$ ne pouvant pas diffuser au travers des membranes, il est rapidement réduit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par des enzymes superoxydes dismutases (SOD1-3), selon sa localisation. En effet, SOD1 le réduit dans l'espace intermembranaire et le cytosol, SOD2 dans la matrice mitochondriale (Hole et al., 2011; Moloney & Cotter, 2018), et SOD3 en extracellulaire (Moloney & Cotter, 2018). A l'inverse de $^{\bullet}O_2^-$, l'H_2O_2 a un fort potentiel de diffusion à travers les membranes, et ce phénomène passe notamment par les aquaporines (Bienert et al., 2007). L'H_2O_2 est réduit en molécule d'eau selon plusieurs mécanismes. La catalase (CAT) permet cette réaction au niveau du cytosol, les peroxirédoxines (PRDX) le font à la fois dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale, et enfin les glutathionnes peroxydases (GPX) agissent partout (Moloney & Cotter, 2018) (**Figure 16**).

3. Les ROS dans l'hématopoïèse normale et leucémique

Les CSH ont très peu de ROS, comparées aux progéniteurs proliférants et aux cellules plus différenciées (Jang & Sharkis, 2007). Le maintien de faibles concentrations de ROS dans les CSH est assuré par les membres de la famille FoxO (*Forkhead O*). L'inhibition de FoxO1, FoxO3, et FoxO4 dans les CSH conduit à l'augmentation des ROS et un épuisement des CSH. En revanche, l'ajout de N-acétyl-L-cystéine (NAC), un agent éliminant les ROS, permet de restaurer un niveau basal de ROS et le maintien des CSH en quiescence (Tothova et al., 2007). La réponse au stress oxydant par les FoxO passe en partie par l'induction de protéines antioxydantes telles que la catalase et SOD2 (Kops et al., 2002). De plus, Ito *et al.* ont démontré que l'autorenouvellement des CSH chez la souris dépend de l'inhibition du stress oxydant par la protéine ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated*) (Ito, Hirao, Arai, & Matsuoka, 2004). Cet effet passerait par l'inhibition de la protéine BID (*BH3 Interacting-Domain death agonist*) via sa phosphorylation (Maryanovich et al., 2012). Ceci leur permet donc de maintenir leur capacité d'autorenouvellement et d'assurer une plus grande stabilité génomique (Richardson, Yan, & Vestal, 2015; Sabharwal & Schumacker, 2014).

Sur le versant leucémique, les CSL quiescentes ont moins de ROS que les blastes différenciés proliférants. Ce maintien passe, entre autres, par une réduction de l'OXPHOS via la surexpression de BCL-2, puisque des inhibiteurs de cette protéine permettent d'éradiquer les CSL en perturbant leur statut métabolique (Khan et al., 2016; Lagadinou et al., 2013). La surexpression de la glutathionne peroxydase 3 (GPX-3) induit également de faibles niveaux de ROS dans ces cellules, ainsi qu'un maintien de leur capacité de repopulation *in vivo* (Herault et al., 2012). La différence en production de ROS entre les CSL et les blastes a également été rapportée par Škrtić *et al.*, qui ont démontré que les blastes ont une masse mitochondriale plus élevée que les CSL, pouvant donc engendrer plus de ROS (Škrtić et al., 2011).

B. Rôle de l'hypoxie sur le métabolisme oxydatif

La formation des ROS étant générée à la suite de la réduction de molécules d'oxygène, la teneur en O_2 peut donc avoir de grandes conséquences sur leur régulation.

1. Dans un contexte physiologique

Par rapport à des cellules différenciées, les CSH sont plus hypoxiques et expriment de manière plus forte HIF-1α, HIF-2α et HIF-3α (Takubo et al., 2010). Elles ont une consommation

d'oxygène diminuée, des taux d'ATP réduits avec une augmentation de la glycolyse, ainsi qu'une diminution du potentiel de membrane mitochondriale et une augmentation des gènes cibles de HIF (**Figure 17**) (Kumar & Geiger, 2017).

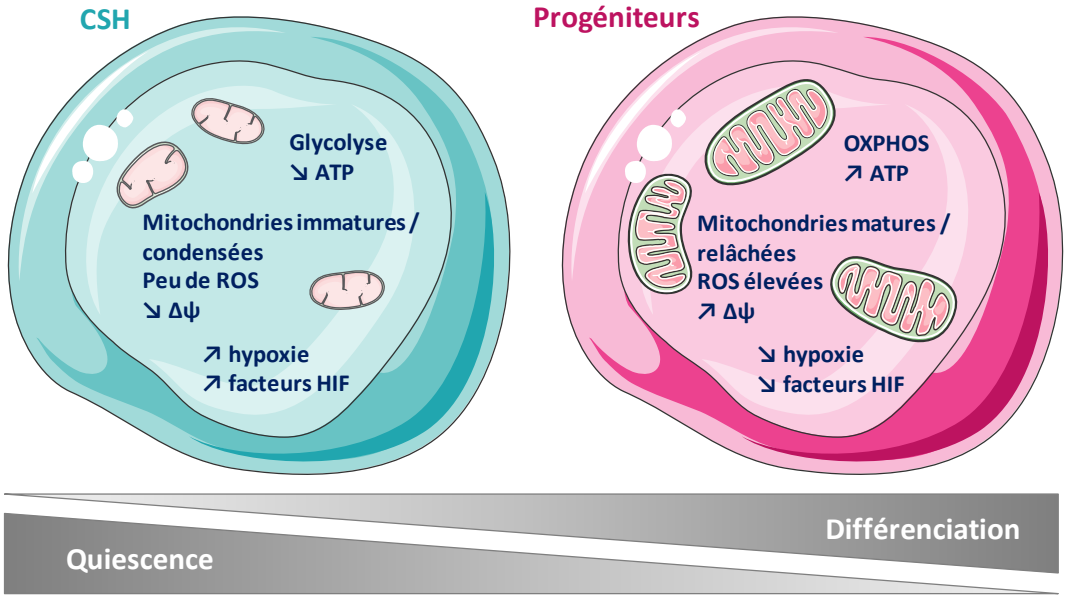


Figure 17. Schéma récapitulatif du statut hypoxique et métabolique des CSH comparées aux progéniteurs. Les CSH quiescentes ont un métabolisme ralenti et un profil hypoxique, avec switch de l'OXPHOS vers la glycolyse, engendrant une baisse d'ATP, de ROS et du potentiel de membrane mitochondrial (Δψ). A l'inverse, les progéniteurs matures sont moins hypoxiques et privilégient l'OXPHOS pour fournir la cellule en énergie, ce qui promeut l'augmentation d'ATP, de ROS et du potentiel de membrane (d'après Kumar & Geiger, 2017).

Il est décrit que Meis1 induit l'expression de HIF-1α qui permet le switch de l'OXPHOS vers la glycolyse, afin de baisser la consommation en oxygène (Kocabas et al., 2015). En accord avec ces résultats, l'expression de HIF-1α induite par Meis1 inhibe la formation de ROS (Kocabas et al., 2012). HIF-1α assure ce switch en augmentant l'expression de PDK1 (*Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1)*, qui phosphoryle les PHD (*Pyruvate Dehydrogenase*). Celles-ci ne peuvent alors plus transformer le pyruvate en acétyl-CoA, essentiel pour le cycle de Krebs et donc l'OXPHOS. Ce switch permet de baisser la concentration en ROS dans les cellules, tout en fournissant encore de l'énergie par la glycolyse. En effet, la surexpression de PDK1 dans des cellules déficientes en HIF-1α restaure la baisse des ROS et de la mort cellulaire (Kim, Tchernyshyov, Semenza, & Dang, 2006).

Comme pour HIF-1α, la délétion de HIF-2α dans des CSH conduit à l'augmentation des ROS, et induit le stress du réticulum endoplasmique et l'apoptose cellulaire (Rouault-Pierre et al., 2013).

2. Dans un contexte leucémique

De manière identique aux CSH, l'inhibition de HIF-2α dans des cellules de LAM induit un stress oxydant et l'apoptose. De plus, l'ajout d'un inhibiteur des ROS permettant de restaurer la survie des cellules, montre que ces phénomènes passent par la régulation des ROS, notamment via l'expression de protéines antioxydantes telles que SOD2 (Rouault-Pierre et al., 2013). En effet, HIF-2α induit l'expression des enzymes antioxydantes SOD1, SOD2, catalase et GPX1 qui permet de diminuer les taux de ROS. Son KO chez la souris induit des ROS mais l'utilisation d'une molécule mimétique de SOD (MnTBAP) permet de réverter le phénomène (Scortegagna et al., 2003a).

L'hypoxie elle-même a un effet antioxydant via l'expression des kinases PIM (*Proviral Integration site for Moloney murine leukemia virus*) dans des lignées cellulaires cancéreuses (cancer du côlon et de la prostate). En effet, ces kinases favorisent la translocation du facteur NRF2 (*Nuclear factor erythroid-derived 2-Related Factor 2*) dans le noyau ce qui induit l'expression de protéines antioxydantes et donc l'inhibition des ROS. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'inhibiteurs des kinases PIM, qui après restauration des ROS, contribuent à l'élimination des cellules cancéreuses hypoxiques et à la baisse de la croissance tumorale (Warfel, Sainz, Song, & Kraft, 2016).

HIF-1α a également un rôle sur le stress oxydatif. Il protège les cellules K562 (lignée cellulaire de LMC) de la cytotoxicité du benzène (contaminant environnemental). Brièvement, HIF-1α diminue la formation des ROS induites par le benzène, essentiellement via l'inhibition du complexe oxydant NOX4 (Sun et al., 2019). De la même manière, l'inhibition de HIF-1α par du 2-methoxyestradiol induit une élévation des ROS conduisant à la mort cellulaire (Zhe et al., 2016). La combinaison de l'acide bétulinique et de la chidamide, perturbant respectivement la dimérisation de HIF-1α avec ARNT et sa liaison au cofacteur p300, induit l'augmentation des ROS, ainsi que la baisse du potentiel de membrane mitochondrial. Cette inhibition de HIF-1α prolonge la survie des souris, et cet effet semble spécifique de la voie de signalisation des HIF, puisqu'une augmentation de HIF-1α ou de SOD2 permet de restaurer la croissance tumorale (Zhang et al., 2017).

Au vu de toutes ces données, il apparaît clairement que l'hypoxie (via ou non les facteurs HIF) joue un rôle essentiel dans le stress oxydant des CSH normales comme pathologiques.

Objectifs

Une rechute est fréquemment observée (< 50 %) des patients atteints de LAM nécessitant la poursuite d'un protocole thérapeutique lourd, incluant l'intensification de la chimiothérapie et/ou une transplantation (Döhner et al., 2017). Seule une population rare de cellules souches leucémiques est capable d'initier la leucémie. Les niches médullaires sont très certainement des sanctuaires dans lesquelles ces CSL trouvent un support et une protection contre les thérapeutiques. Les CSL présentent un niveau de stress oxydant plus faible que les blastes qui prolifèrent (Herault et al., 2012; Khan et al., 2016; Lagadinou et al., 2013), et un niveau de stress faible est associé à une agressivité plus importante de la maladie (Herault et al., 2012). La coculture des cellules leucémiques sur des CSM diminue le niveau des ROS (Liu et al., 2017, données non publiées) et induit une forte chimiorésistance (Griessinger et al., 2014).

Le niveau d'oxygène faible des niches médullaires pourrait fortement participer à la résistance en induisant la quiescence et des modifications métaboliques des cellules leucémiques (Ianniciello, Rattigan, & Helgason, 2018). L'hypoxie est un facteur de mauvais pronostic et la culture des cellules à des niveaux faibles en oxygène induit la chimiorésistance (Drolle et al., 2015; Matsunaga et al., 2012). Elle peut participer à la diminution du niveau de ROS dans les cellules via la disponibilité en oxygène d'une part, et à l'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes d'autre part (Rouault-Pierre et al., 2013).

Alors que les travaux de coculture ne prennent généralement en considération que deux populations hématopoïétiques, les cellules en suspension et celles adhérentes, deux études ont démontré, pour les CSH, l'existence parmi les cellules au contact des CSM, de cellules simplement adhérentes sur la couche et de cellules nichées plus profondément dans la couche stromale (Burger et al., 2003; Jing et al., 2010, 2012). Ces dernières prolifèrent moins et ont un profil plus hypoxique, comparées aux cellules simplement adhérentes à la surface des CSM et en suspension (Jing et al., 2010, 2012). Bien que moins important, le phénomène de nichage a également été observé pour les cellules de LAM (Burger et al., 2003). Cependant, il n'a pas été fait mention de phénomène hypoxique.

Au vu de ces données, il nous est apparu opportun d'utiliser le système de coculture comme modèle de niche leucémique pour étudier l'impact de l'hypoxie sur la chimiorésistance et d'en

comprendre les mécanismes, en particulier l'axe métabolique. Notre objectif premier a donc été de démontrer l'existence de plusieurs populations leucémiques au sein d'une même coculture. Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence l'apparition « naturelle » d'une hypoxie au sein du système et à caractériser les différentes populations en matière de chimiorésistance et métabolisme oxydatif. Enfin, nous avons testé si le blocage de la réponse à l'hypoxie pouvait améliorer l'élimination des cellules leucémiques chimiorésistantes.

La recherche s'intéresse à augmenter la complexité des systèmes de coculture pour se rapprocher d'un microenvironnement physiologique de la MO, notamment en utilisant des structures tridimensionnelles. De manière intéressante pour notre travail, il a été décrit l'apparition de régions hypoxiques dans ces systèmes 3D (Sharma et al., 2012). Notre dernier objectif a donc été de mettre en place un tel système, tout d'abord en comparant la capacité des CSM issues de différentes origines à former des sphéroïdes puis en étudiant l'hypoxie et le métabolisme oxydatif dans ces structures.

Première partie

Caractérisation de sous-populations cellulaires de LAM dans un modèle de coculture : chimiorésistance, hypoxie, métabolisme oxydant

A. Introduction

Les modèles de coculture *in vitro* sont des outils intéressants pour appréhender plus facilement les mécanismes de la leucémogenèse et de la chimiorésistance dans le microenvironnement que les modèles *in vivo*. Nous avons souhaité développer un modèle dans lequel nous pourrions questionner l'impact de l'hypoxie. Jing *et al.* avaient caractérisé deux populations hématopoïétiques en contact avec les CSM, soit simplement adhérentes, soit nichées dans la couche de CSM, aux profils hypoxiques différents (Jing et al., 2010, 2012). Nous avons mis à profit cette observation en l'appliquant aux cellules leucémiques. De plus, nous avons fait le choix d'un modèle ne reposant que sur des cellules humaines, CSM et LAM, et non la coculture mixte de LAM humaines sur une lignée CSM murine, souvent la MS-5. Cependant, les CSM humaines, en particulier les lignées, ayant peu ou pas d'inhibition de contact, nous avons été contraints de réaliser une étude sur une fenêtre de temps courte plutôt que sur le long terme, qui aurait nécessité un traitement préalable des CSM (irradiation ou mitomycine C) pour bloquer leur prolifération ; des traitements qui affecteraient les propriétés cellulaires. Nous avons cherché la présence de plusieurs populations cellulaires et les avons caractérisées sur le plan phénotypique et fonctionnel, ainsi que sur leur capacité de résistance à la cytarabine.

B. Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire MV4-11 de LAM humaine a été achetée au DSMZ (ACC-102, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne), et la lignée cellulaire stromale HS-27a de MO humaine à l'ATCC (CRL-2496, American Type

Culture Collection, Manassas, Etats-Unis). Les CSM primaires de MO humaine ont été obtenues par aspiration de la crête iliaque de patients informés et consentants au cours de chirurgie orthopédique (Service de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique, CHRU de Tours, France). Les blastes primaires humains de patients atteints de LAM ont été collectés au moment du diagnostic après consentement selon la réglementation. La banque de cellules est gérée par la Tumorothèque du CHRU de Tours, agréée par le Ministère Français de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (Numéro d'autorisation n° DC-2008-308). La lignée cellulaire 8227 a été gracieusement donnée par le Pr. John E. Dick (Toronto, Canada).

La lignée cellulaire HS-27a a été cultivée dans du RPMI 1640 (31870-025, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France), les CSM primaires de MO humaine dans du MEM alpha (22561-021, Life Technologies) et les MV4-11 dans ces deux milieux selon leur utilisation. Tous les milieux ont été supplémentés avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par chaleur (56 °C) (10270-024, Life Technologies), 2 mM de L-glutamine (25030-024, Life Technologies), 100 U/mL de pénicilline (P3032, Sigma-Aldrich) et 100 µg/mL de dehydrostreptomycine sesquisulfate (D7253, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Pour les CSM primaires, 0,004 % de FGF-2 (*Recombinant human FGF basic*) (233-FB-025, R&D Systems, Abington, Royaume-Uni) a été ajouté. Les blastes et la lignée cellulaire 8227 ont été cultivés dans du Myelocult^{TM} H5100 (05150, STEMCELL Technologies, Grenoble, France) supplémenté par 10 ng/mL d'IL-3 (130-095-070), d'IL-6 (130-093-931) et de G-CSF (130-096-347), 25 ng/mL de TPO (130-094-013) et 50 ng/mL de SCF (130-096-695) (tous de Miltenyi Biotec, Paris, France). Les cellules ont été maintenues dans une atmosphère humide à 37 °C et 5 % de CO_2. Les lignées cellulaires ont été utilisées entre les passages 4 et 20, et les CSM primaires à passage 3.

2. Système de coculture

Les CSM primaires de MO humaine (MEM alpha) et les cellules de la lignée HS-27a (RPMI 1640) ont été ensemencées dans des plaques de 12 puits à 10^4 cellules/cm², et le milieu a été changé un jour avant confluence, respectivement par du MEM alpha sans FGF-2 et du RPMI 1640. A confluence, les cellules de la lignée MV4-11 ont été ajoutées à 10^4 cellules/cm² sur le stroma de CSM primaires. Les cellules ont été ensuite séparées aux jours 1, 3 et 5 comme suit. Les cellules non-adhérentes ont été récoltées en enlevant le milieu. Les cellules adhérentes ont été décrochées du stroma par des lavages délicats avec du PBS 1X (Life Technologies), jusqu'à disparition des cellules réfringentes en microscopie à contraste de phase. Les cellules nichées

ont été collectées avec les CSM primaires après traitement avec 0,05 % de trypsine-EDTA (25300-054, Life Technologies) pendant 3 min à 37 °C. Dans cette fraction, les cellules leucémiques et stromales ont été différenciées selon leur taille et réfringence en cellule de Malassez, et selon leur expression des marqueurs de surface CD45 (anticorps anti-CD45 couplé à l'APC, 555485, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) en cytométrie en flux. Le nombre de cellules vivantes et mortes dans chaque fraction a été discriminé par le test d'exclusion au bleu de trypan (T8154, Sigma-Aldrich). Pour les cocultures de blastes primaires et de la lignée 8227, le protocole était le même, mais utilisait du Myelocult^{TM} H5100 supplémenté par le cocktail de cytokines. L'analyse par microscopie a été réalisée sur un microscope DMIL (Leica, Nanterre, France) couplé à une caméra DXM1200F (Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

3. Cellules MV4-11 exprimant la GFP

Un vecteur lentiviral exprimant la puromycine N-acétyltransférase (PAC) et la GFP a été produit par transfection des cellules 293T comme décrit précédemment (Rezvani et al., 2011). Les lentivirus obtenus avaient un titre supérieur à 10^6 particules infectieuses par mL. Les cellules MV4-11 ont été ensuite transduites à une multiplicité d'infection (MOI) de 2. Les cellules GFP positives ont été sélectionnées grâce à l'ajout de puromycine à hauteur de 1 µg/mL sur deux passages cellulaires.

4. Analyse du cycle cellulaire

Après séparation des trois populations leucémiques, les cellules ont été fixées dans une solution à 2 % de paraformaldéhyde et 0,03 % de saponine pendant 15 min à température ambiante, puis lavées trois fois 5 min dans une solution de lavage contenant 10 % de SVF et 0,03 % de saponine. Ensuite, 10^5 cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CD45 couplé à l'APC (555485, BD, Biosciences) pendant 20 min à 4 °C dans le noir, puis lavées et marquées avec du 7-aminoactinomycine D (7-AAD) (A9400, Sigma-Aldrich) et un anticorps anti-Ki-67 couplé à l'AF488 (Alexa Fluor 488) (558616, BD Biosciences) ou l'isotype contrôle IgG_1 (557782, BD Biosciences) à température ambiante pendant 30 min dans le noir. Après lavage, la fluorescence a été suivie par cytométrie en flux sur un cytomètre BD Accuri C6 (BD Biosciences), et les données ont été analysées grâce au logiciel FlowJo V10.4.1 (Tree Star Inc.).

5. Tests de résistance aux traitements

Les concentrations inhibitrices médianes (IC_{50}) des cellules MV4-11 envers l'Ara-C ont été déterminées à l'aide du test à la résazurine. Cette molécule bleue non-fluorescente devient par oxydation, via la chaîne respiratoire de la mitochondrie, de la résofurine fluorescente rouge. La quantité de résofurine produite est directement proportionnelle aux nombres de cellules en vie. Brièvement, 4.10^3 cellules sont ensemencées en plaque 96 puits dans 100 µL, puis après 24 h l'Ara-C est ajouté à des doses croissantes de 0 à 10 µM. Après trois jours, les cellules sont incubées pendant 6 h à 37 °C dans le noir avec 20 µg/mL de résazurine, et la fluorescence (émission : 530 nm / excitation : 590 nm) est mesurée à l'aide du fluorimètre CLARIOstar® (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). Les courbes de réponse ont été réalisées et analysées sur le logiciel GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.).

Pour les cocultures, aux jours 1 et 3, la cytarabine (Ara-C) (Sandoz) a été ajoutée à 0,5, 1 et 5 µM. Les cellules des différentes populations leucémiques ont été récoltées puis énumérées trois jours plus tard par le test d'exclusion au bleu de trypan. Les mêmes tests ont été réalisés au jour 3 de coculture en combinant 0,5 µM d'acriflavine (ACF) (A8251, Sigma-Aldrich) ou 20 µM de PT-2385 (HY-12867, CliniSciences, Nanterre, France) pré-incubés 1 h, avec 0,5 ou 1 µM d'Ara-C. La doxorubicine (Teva) a été ajoutée à 100 nM au jour 3 de coculture. Les cellules ont ensuite été séparées et collectées après 24 h. Après lavage, la fluorescence de la drogue a été suivie par cytométrie en flux sur le cytomètre BD Accuri C6, et les données ont été analysées grâce au logiciel FlowJo V10.4.1. L'AMD3100 (A5602, Sigma-Aldrich) a été ajouté à 0,5 µg/mL dès le jour 0 de la coculture avec les cellules MV4-11, ou alors pré-incubé 1 h. Les cellules des différentes populations leucémiques ont été récoltées puis énumérées trois jours plus tard par le test d'exclusion au bleu de trypan.

6. Analyse de marqueurs spécifiques de surface

Après séparation des trois populations leucémiques aux jours 3 et 5, les cellules ont été marquées par les différents anticorps listés ci-après, à 4 °C pendant 20 min dans le noir : anti-CD29 (ou intégrine β1) (303008, BioLegend via Ozyme, Saint-Cyr-L'école, France), anti-CD34 (343510, BioLegend), anti-CD38 (555460, BD Biosciences), anti-CD44 (103012, BioLegend), anti-CD45 (555482, BD Biosciences), anti-CD49d (ou intégrine α4) (304304, BioLegend), anti-CD49e (ou intégrine α5) (328010, BioLegend) et anti-CD184 (ou CXCR4)

(306510, BioLegend). Après lavage, la fluorescence a été suivie par cytométrie en flux sur un cytomètre BD Accuri C6, et les données ont été analysées grâce au logiciel FlowJo V10.4.1.

7. Tests clonogénique et de repopulation

Après séparation des trois populations leucémiques au jour 3, les différentes fractions ont été marquées avec les anticorps anti-CD45 (555483, BD Biosciences) et anti-CD90 (561558, BD Biosciences) à 4 °C pendant 30 min dans le noir, puis lavées. Les cellules $CD45^+$ $CD90^-$ correspondant aux cellules leucémiques MV4-11 ont ensuite été triées grâce au trieur BD FACSMelody (BD). Les cellules, en duplicata, ont alors été ensemencées à 3.10^2 dans 1 mL de MethoCult™ H4230 (04230, STEMCELL Technologies) dans des boîtes de pétri de 35 mm. Les colonies formées ont été comptées 15 jours plus tard. En parallèle, les cellules triées des différentes fractions ont également été remises en coculture sur un nouveau stroma de CSM primaires, en duplicata, puis le nombre de cellules dans chaque population a été compté trois jours plus tard.

8. Xénogreffe

Les souris NSG (005557) ont été obtenues au laboratoire Jackson Laboratory (Bar Harbor, Etats-Unis), et ont été élevées dans un environnement sans pathogène. Toutes les expériences ont été effectuées dans l'animalerie du CRCM de Marseille (collaboration avec l'équipe du Dr. M. Aurrand-Lions), en accord avec les lois et protocoles approuvés par des comités d'éthique animal (Accord N° 02294.01). Comme décrit pour les tests clonogéniques, 3.10^4 cellules triées pour chaque population ont été injectées dans la veine caudale des souris (6 souris mâles par condition). Après 11 semaines, le pourcentage de $CD45^+$ dans la MO des souris a été déterminé par cytométrie en flux sur un cytomètre BD LSR II (BD Biosciences), et les données ont été analysées grâce au logiciel FlowJo V10.4.1.

9. Mesure de la teneur en oxygène

9.1. Mesure du pourcentage en oxygène dans le milieu extracellulaire

Pour ces expériences, les CSM primaires ont été ensemencées sur des lames de 8 puits (80826, Ibidi, Allemagne). A confluence, lors de l'ajout des cellules de la lignée MV4-11 sur le stroma de CSM, environ 10 billes CPOx (74111, Ibidi) ont également été ajoutées dans le milieu. La lame a été maintenue à 37 °C grâce à une chambre d'incubation sur le microscope à

fluorescence (Ibidi Heated System, Ibidi) contenant une plaque et un couvercle chauffant. La phosphorescence des billes CPOx a été mesurée à l'aide du système Ibidi OPAL, monté sur un microscope Eclipse TS100 (Nikon), composé : d'un boîtier « Ibidi OPAL Controller » qui contrôle tous les composants, d'une source lumineuse à LED (532 nm), d'un détecteur de phosphorescence « OPAL Detector Unit » et d'un cube à filtres « OPAL Filter Cube » (Excitation 531 ± 40 nm, Émission 607 ± 70 nm). Les billes CPOx sont des senseurs de l'oxygène composées de matrice de latex biocompatible et d'une sonde Ru-Phenanthroline. Le système repose sur le principe de l'extinction de la phosphorescence : après excitation, le temps de décroissance de la phosphorescence des billes CPOx est dépendant et proportionnel au taux d'oxygène.

9.2. Mesure d'une hypoxie intracellulaire

Au jour 3 de la coculture, 400 µM de pimonidazole hydrochloride (HP1-100Kit, Hypoxyprobe, Burlington, États-Unis) a été ajouté. Cette molécule forme des adduits avec les protéines contenant des groupements thiols, uniquement dans les cellules dont la concentration en oxygène est inférieure à 14 µM (l'équivalent d'une pression partielle ou $ppO_2 \leq 10$ mm Hg, soit moins de 2 % d'O_2). Après 2 h d'incubation, les trois différentes populations de cellules leucémiques ont été séparées, lavées au PBS 1X (Life Technologies), et 10^5 cellules ont été fixées dans une solution avec 2 % de paraformaldéhyde et 0,03 % de saponine pendant 15 min à température ambiante. Elles ont ensuite été lavées trois fois 5 min dans une solution de lavage contenant 10 % de SVF et 0,03 % de saponine, et marquées avec un anticorps anti-CD45 (555485, BD Biosciences) pendant 20 min à 4 °C dans le noir. Les cellules ont de nouveau été lavées, puis marquées avec un anticorps anti-pimonidazole (Mab1) (Hypoxyprobe) 30 min à température ambiante dans le noir. Après lavage, la fluorescence a été suivie par cytométrie en flux sur un cytomètre BD Accuri C6, et les données ont été analysées grâce au logiciel FlowJo V10.4.1.

10.Mesure des ROS cytoplasmiques

Après séparation des trois populations leucémiques, 10^5 cellules ont été incubées à 37 °C dans le noir avec 5 µM de CM-H_2DCFDA (C6827, Life Technologies) et l'anticorps anti-CD45 (555485, BD Biosciences). Après 20 min d'incubation, la fluorescence a été immédiatement analysée par cytométrie en flux sur un cytomètre BD Accuri C6 car cette sonde est extrêmement instable et photosensible. Les données ont été analysées grâce au logiciel FlowJo V10.4.1.

11. Mesure des ROS mitochondriales, du potentiel de membrane mitochondrial et de la masse mitochondriale

Après séparation des trois populations leucémiques, 10^5 cellules ont été incubées à 37 °C dans le noir avec 5 µM de MitoSOX (M36008, Life Technologies) pour détecter les ROS mitochondriales, ou 100 nM de TMRE-Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (ab113852, Abcam, Paris, France) pour mesurer le potentiel de membrane mitochondrial ou enfin 25 nM de MitoTracker Deep Red FM (M22426, Life Technologies) pour marquer les mitochondries, plus l'anticorps anti-CD45 (555485, BD Biosciences). Après 20 min d'incubation, les cellules ont été lavées, puis la fluorescence a été suivie par cytométrie en flux sur un cytomètre BD Accuri C6 et les données ont été analysées grâce au logiciel FlowJo V10.4.1.

12. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été faites sur le logiciel R. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer deux conditions, et le test de Kruskal-Wallis pour des comparaisons multiples, suivi d'un test *post hoc* de Dunn. Le seuil de significativité a été fixé à une valeur de $p \leq 0,05$.

C. Résultats

1. Preuve de concept : coculture de la lignée MV4-11 / CSM primaires

1.1. Mise en place du modèle

Afin de créer une niche hématopoïétique humaine, nous avons choisi d'utiliser des CSM primaires humaines issues de MO saines avec la lignée humaine de LAM MV4-11. Les cellules MV4-11 ont été ajoutées à raison de 10^4 cellules/cm² sur un tapis de CSM confluent. Après 1, 3 ou 5 jours, les différentes populations leucémiques sont récoltées. Les étapes de séparation ont été suivies en microscopie à contraste de phase pour distinguer les cellules par leur réfringence. Dans un premier temps, les cellules non-adhérentes en suspension sont collectées avec le surnageant de culture (**Figure 18A**). La présence de cellules réfringentes plus adhérentes à la surface de la couche stromale est notée dans un plan focal différent de celui des CSM (**Figure 18B**). Plusieurs lavages doux au PBS sont ensuite nécessaires pour les détacher (**Figure 18C**).

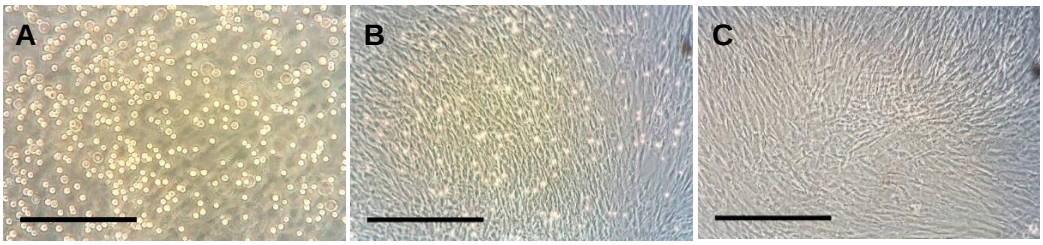


Figure 18. Identification des deux premières populations leucémiques au sein de la coculture par microscopie à contraste de phase. (**A**) Coculture intacte. (**B**) Coculture après élimination des cellules en suspension. (**C**) Coculture après élimination des cellules adhérentes par lavages au PBS (Barre d'échelle = 500 µM ; expérience réalisée au jour 3).

1.2. Mise en évidence par microscopie des cellules nichées marquées à la GFP

Pour révéler la présence de cellules nichées dans le stroma, nous avons marqué les cellules MV4-11 grâce à un vecteur lentiviral exprimant la GFP. Comme précédemment, de nombreuses cellules rondes et réfringentes sont visibles en suspension dans le milieu (**Figure 19A**). Une fois le surnageant retiré, des cellules rondes et adhérentes à la surface du stroma, et des cellules enchâssées dans la couche de CSM, peuvent être observées (**Figure 19B**). La présence de ces cellules enchâssées, qui perdent leur aspect arrondi et réfringent dans les CSM, est encore plus évidente après élimination des cellules adhérentes (**Figures 19C et C'**). Ces données prouvent l'existence de trois populations de cellules MV4-11 au sein de la coculture en fonction de leur capacité d'adhérence : des cellules en suspension ou non-adhérentes, des cellules adhérentes en surface des CSM et des cellules nichées dans le stroma.

1.3. Mise en évidence des cellules nichées par identification phénotypique en cytométrie en flux

Les cellules MV4-11 nichées ont été collectées avec la couche de CSM primaires par décollement à la trypsine. Les deux types cellulaires sont distinguables par leur forme, leur taille et leur granularité. En microscopie, les cellules MV4-11 paraissent 2 à 4 fois plus petites que les CSM primaires, ont des contours mieux définis, sont réfringentes et moins granuleuses (**Figure 20A**). En cytométrie en flux, les cellules hématopoïétiques peuvent être identifiées par l'expression du CD45 à leur surface alors que les CSM primaires ne l'expriment pas. Ce marquage confirme la présence de cellules leucémiques, $CD45^+$, au sein de la couche stromale, et dont la taille et la granularité sont plus faibles que celles des CSM après décollement (**Figure 20B**).

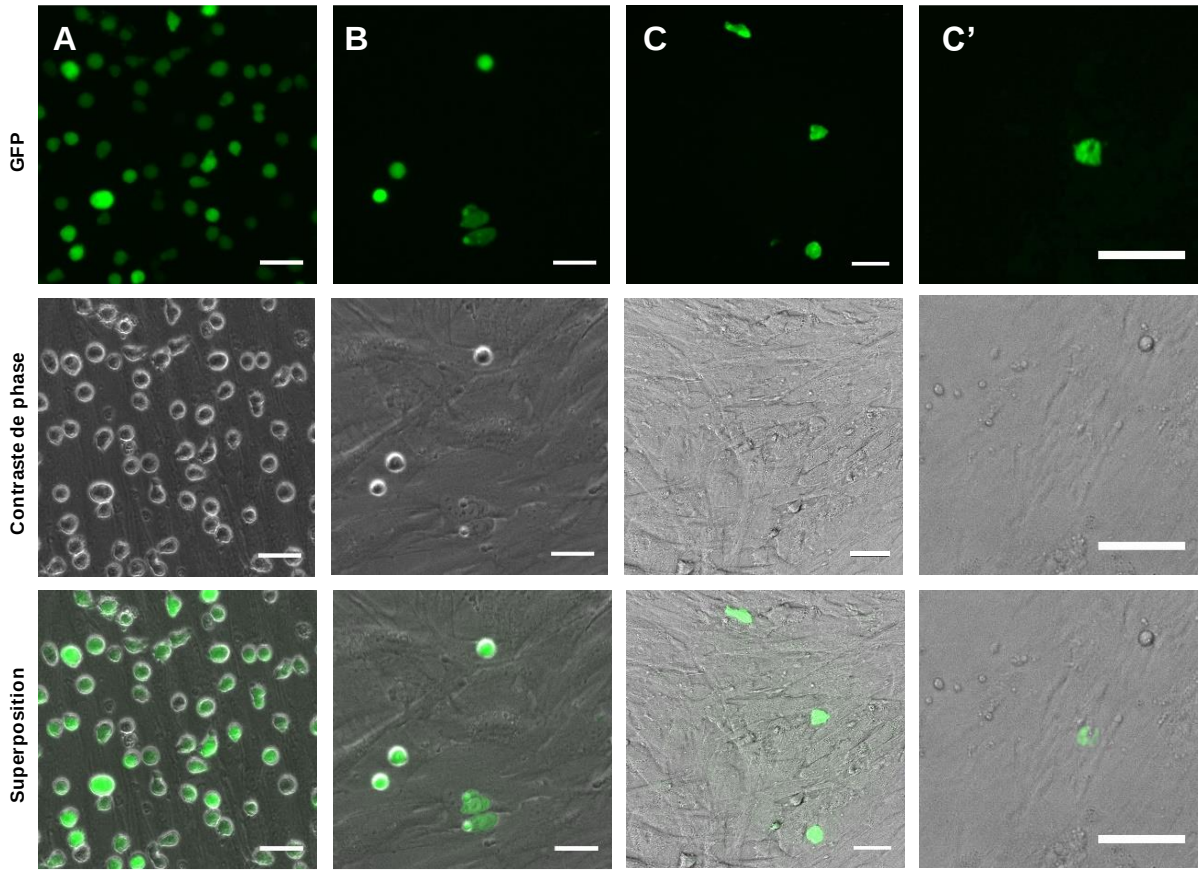


Figure 19. Visualisation par microscopie à fluorescence de cellules MV4-11 nichées. (**A**) Coculture intacte. (**B**) Coculture après élimination des cellules en suspension. (**C et C'**) Coculture après élimination des cellules adhérentes par des lavages au PBS (Barre d'échelle = 40 µM ; expérience réalisée au jour 3).

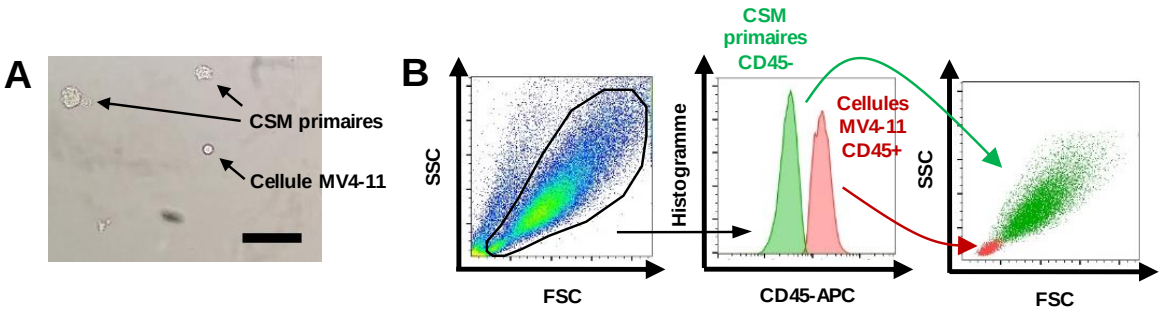


Figure 20. Distinction entre les cellules MV4-11 et les CSM primaires. Après traitement par la trypsine de la couche de CSM primaires, les cellules sont observées par microscopie (**A**), ou marquées avec un anticorps CD45 et suivie par cytométrie en flux (**B**), afin de discriminer les deux types cellulaires selon leur taille et leur granularité (barre d'échelle = 50 µM ; expérience réalisée au jour 3).

2. Prolifération des trois populations leucémiques

2.1. Modélisation avec les cellules MV4-11

L'induction d'une quiescence des cellules hématopoïétiques nichées sous le stroma médullaire a déjà été suggéré (Jing et al., 2010). Pour déterminer si la localisation des cellules leucémiques dans la coculture influence la prolifération des cellules, nous avons tout d'abord quantifié le nombre de cellules au cours du temps. Les données montrent que si les cellules MV4-11 non-adhérentes et adhérentes augmentent au cours du temps, le nombre de cellules nichées reste constant (**Figure 21A**).

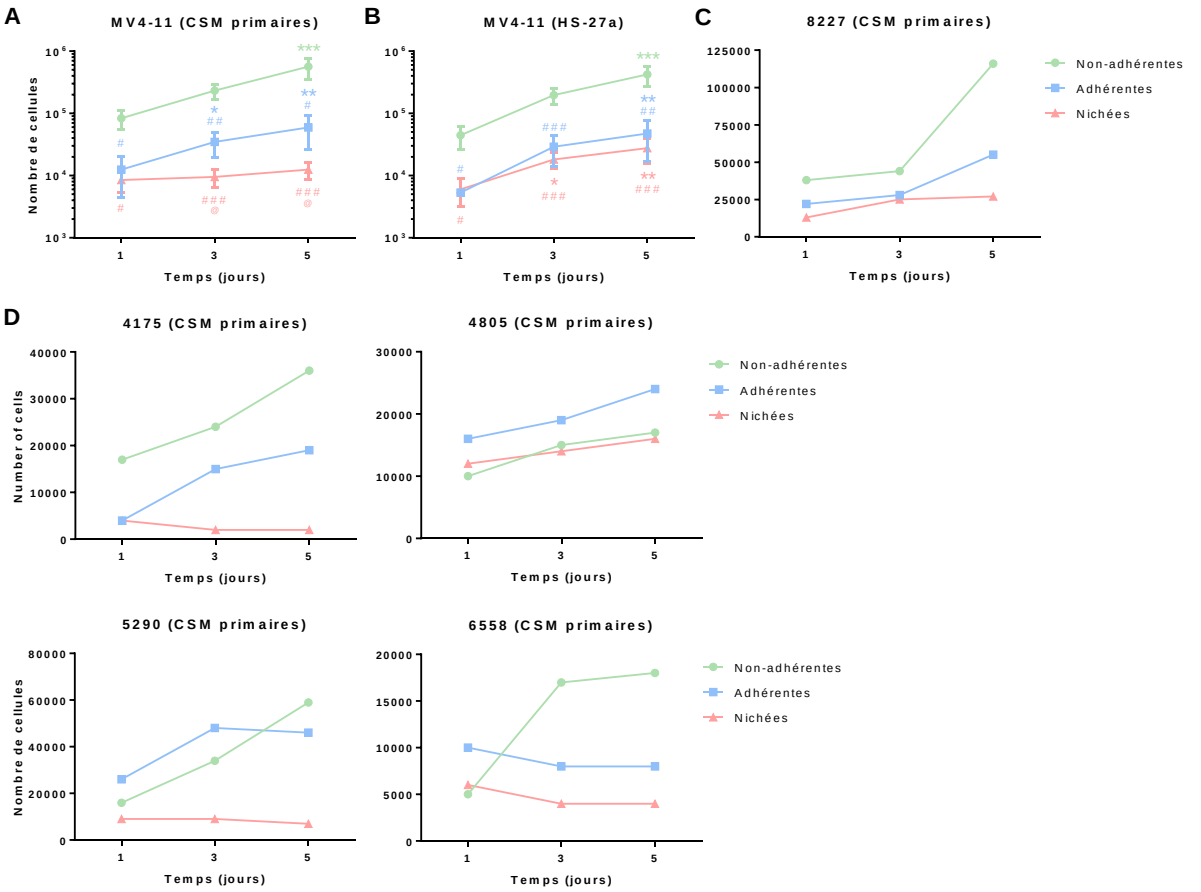


Figure 21. Prolifération des trois populations leucémiques. Nombre de cellules vivantes dans chacune des trois populations leucémiques au cours de 5 jours de coculture entre (**A**) des cellules MV4-11 et des CSM primaires ($n \geq 4$), (**B**) des cellules MV4-11 et des cellules HS-27a ($n \geq 3$), (**C**) des cellules 8227 avec des CSM primaires ($n = 1$) et enfin (**D**) quatre blastes primaires de patients atteints de LAM avec des CSM primaires ($n = 1$ pour chaque patient). Les résultats en (**A**) et (**B**) sont exprimés en moyenne ± SD ; * comparé au jour 1 ; # comparé aux cellules non-adhérentes le même jour ; @ comparé aux cellules adhérentes le même jour ; */#/@ $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$ et ***/### $p \leq 0,001$.

Nous avons souhaité tester le comportement des cellules de LAM sur la lignée cellulaire humaine HS-27a. Nous avons ainsi confirmé l'existence de trois populations et montré que le comportement des cellules MV4-11 sur les cellules HS-27a est proche de celui sur les CSM primaires en matière de prolifération (**Figure 21B**). Cependant, le nombre de cellules nichées augmente légèrement, même si la fraction nichée reste minoritaire.

Ces résultats supportent l'idée d'un effet des cellules stromales sur la prolifération des cellules leucémiques, mais tendent a démontré que le surnageant ou le simple contact ne sont pas suffisants pour induire la quiescence, le nichage étant indispensable.

2.2. Validation du modèle avec les cellules leucémiques primaires

Afin de tester si la capacité de cellules leucémiques à donner les trois populations n'était pas le fait de la lignée MV4-11 elle-même, nous avons réalisé des cultures de cellules primaires de LAM en présence de CSM primaires. La lignée MV4-11 portant la duplication interne en tandem du gène *FLT3* (*FLT3*-ITD), nous avons choisi les échantillons de moelle osseuse de quatre patients ayant cette anomalie, mais nous avons aussi testé la lignée 8227 très proche des cellules primaires (**Tableau 4**). Cette dernière, décrite par l'équipe du Pr. John E. Dick, provient d'un patient atteint d'une LAM en rechute mais garde en culture ses capacités souches et les différentes populations associées au marquage CD34/CD38 (Lechman et al., 2016). Nous avons confirmé la formation des trois différentes populations avec la lignée 8227 et des blastes primaires en présence des CSM (**Figures 21C et D)**. Alors que pour les cellules 8227 nous avons observé un profil proche des cellules MV4-11 en matière de répartition des différentes fractions cellulaires au cours du temps (**Figure 21C**), la distribution/prolifération des blastes primaires présente une plus grande variabilité. Ceci semble en accord avec les précédents résultats montrant une prolifération hétérogène entre prélèvements primaires, qui corrèle avec l'agressivité de la LAM (Griessinger et al., 2016). Les profils des patients 4175 et 6558 sont en accord avec les précédents résultats, alors que les deux autres, 4805 et 5290, ont des cellules adhérentes plus nombreuses que les cellules non-adhérentes (**Figure 21D**). Toutefois, les cellules nichées restent moins nombreuses que les deux autres fractions, et constantes le long des 5 jours de coculture pour tous les patients.

L'ensemble de nos résultats démontre la formation des trois populations leucémiques (non-adhérentes, adhérentes et nichées), quelle que soit l'origine des cellules. De manière intéressante, l'utilisation des cellules MV4-11 ou 8227 permet de mimer les résultats obtenus

avec des cellules primaires, faisant de ces lignées de bons modèles d'étude pour la suite du travail. Enfin, le nichage des cellules, et non le contact seul, semble induire une baisse, voire l'arrêt de la prolifération des cellules leucémiques.

Tableau 4. Caractéristiques des différents patients et lignées de LAM. Dg : Diagnostic ; F : Femme ; FAB : Classification FAB ; H : Homme ; MO : Moelle Osseuse ; R : Rechute ; SP : Sang Périphérique. Le symbole n.c. signifie « non connu ». Les lignées sont en rouge, et les patients de LAM en noir.

	FAB	Age	Genre	Dg/R	Origine	Blastose	*FLT3*-ITD	*NPM1*
Lignée MV4-11	M5	10	H	Dg	SP	95 %	Oui	Sauvage
Modèle 8227	M2	48	F	R	n.c.	n.c.	Oui	Sauvage
Blaste 4175	M1	54	F	Dg	MO	97 %	Oui	Sauvage
Blaste 4805	M5	64	F	Dg	MO	91%	Oui	Muté
Blaste 5290	M5	52	H	Dg	MO	70 %	Oui	Sauvage
Blaste 6558	M4	70	F	Dg	MO	92 %	Oui	Muté

2.3. Etude du cycle cellulaire

Le nombre constant ou la faible augmentation des cellules nichées pourrait être la conséquence d'un arrêt de prolifération, d'une mort cellulaire accrue ou de la migration des cellules vers les autres compartiments. Afin de tester l'hypothèse d'un arrêt de la prolifération, nous avons effectué l'analyse du cycle cellulaire. Pour cela, les trois populations ont été marquées avec du 7-aminoactinomycine D et un anticorps anti-Ki-67, et analysées par cytomètrie en flux aux jours 3 et 5 de la culture (**Figure 22A**).

Au jour 3, aucune différence dans les phases du cycle n'est observée pour les trois populations MV4-11 cultivées aussi bien sur des CSM primaires (**Figure 22B**) que sur des cellules HS-27a (**Figure 22D**). En revanche au jour 5, la proportion de cellules en phase G_0 est en forte augmentation avec une diminution de la phase G_1 pour les cellules nichées avec les deux types de CSM, passant de 20 à 50 % pour les CSM primaires et de 18 à 49 % pour les HS-27a. Pour les deux types de coculture, la proportion de cellules en phase $S/G_2/M$ ne varie pas de façon significative. Pour la partie stromale, les CSM primaires comme les cellules HS-27a n'ont pas de différence significative en présence ou non des cellules MV4-11 (**Figures 22C et E**).

On peut noter que le stroma de CSM primaires à confluence ne prolifère quasiment plus, avec plus de 80 % des cellules en phase G_0 (**Figure 22C**), tandis que le stroma de cellules HS-27a conserve aux jours 3 et 5 environ 20 % des cellules en cycle (**Figure 22E**), corrélant avec le fait qu'elles n'ont pas d'inhibition de contact.

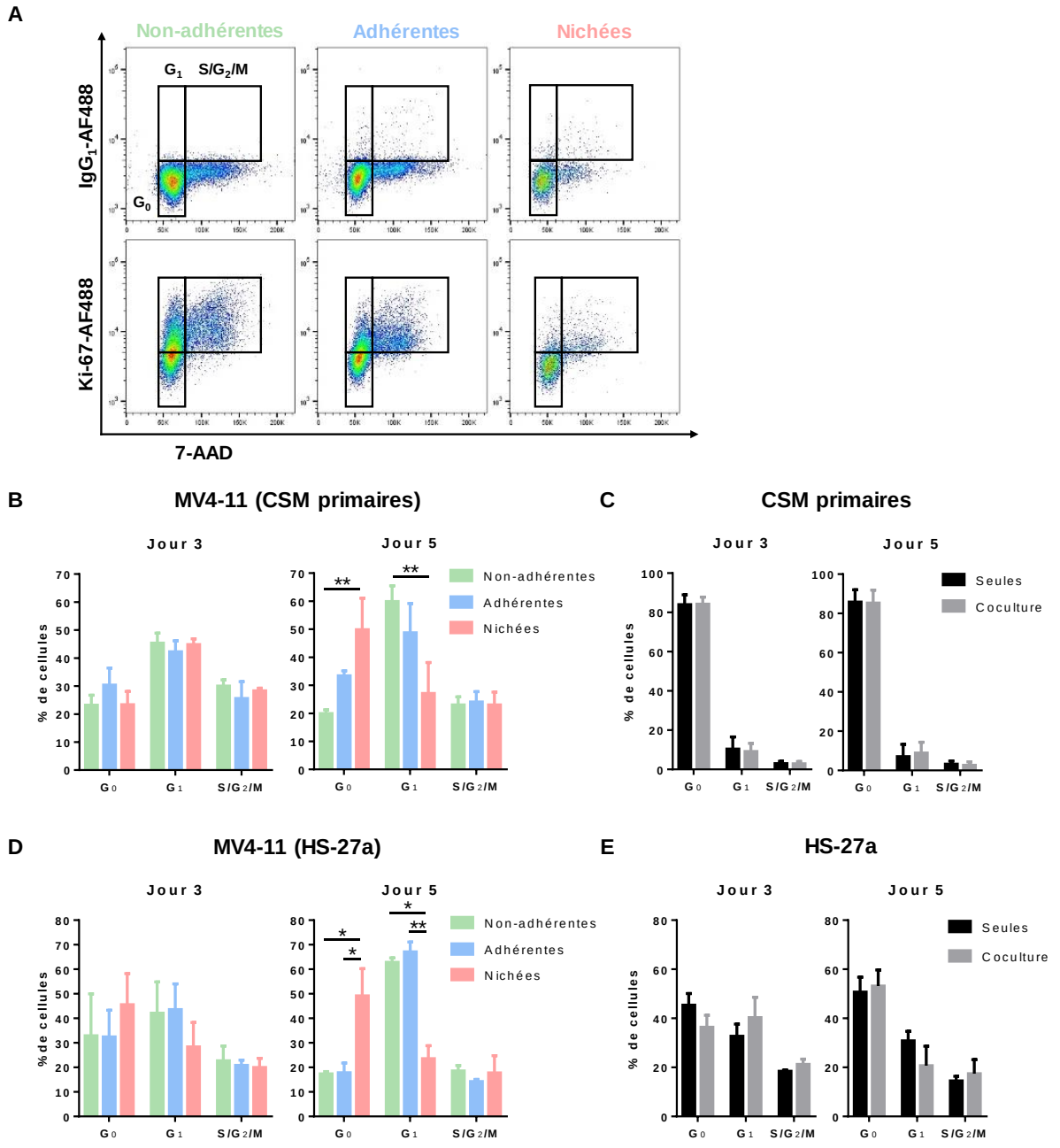


Figure 22. Analyse du cycle cellulaire. Après récolte des trois populations leucémiques, celles-ci ont été marquées avec du 7-AAD et un anticorps anti-Ki-67, ou son isotope contrôle (IgG_1). (**A**) Représentation d'une stratégie des fenêtres réalisées pour l'analyse par cytométrie en flux au jour 5, pour des cellules MV4-11 cultivées avec des CSM primaires. (**B et D**) Quantification du cycle cellulaire aux jours 3 et 5 pour les cellules MV4-11 cultivées avec (**B**) des CSM primaires ou (**D**) des cellules HS-27a (n = 3). (**C et E**) Quantification du cycle cellulaire aux jours 3 et 5 pour (**C**) les CSM primaires ou (**E**) les cellules HS-27a issues de la coculture ou de culture simple (n = 3). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Les résultats indiquent que le nichage force les cellules à entrer en quiescence, alors que les cellules en suspension ou simplement en contact ne sont pas sensibles, ou même diminue la quiescence. En effet, les MV4-11 non -adhérentes et adhérentes sur des cellules HS-27a ont une

baisse du nombre de cellules en phase G_0 entre jour 3 et jour 5 (respectivement de 33 à 17 % et de 32 à 18 %).

3. Etude de la résistance à la cytarabine

Comme la plupart des drogues utilisées pour traiter les cancers, la cytarabine et la daunorubicine sont des molécules affectant surtout les cellules en division. L'hypothèse a été émise que la quiescence induite par le stroma médullaire pouvait protéger les cellules leucémiques de ces drogues. Notre modèle semble mimer cela, avec des cellules nichées plus quiescentes que les autres populations. Nous avons donc proposé qu'elles seraient plus résistantes à la cytarabine (Ara-C).

Nous avons tout d'abord déterminé l'IC_{50} des cellules MV4-11 envers l'Ara-C dans les différents milieux de culture. Que ce soit en RPMI ou en MEM alpha, les cellules MV4-11 ont une IC_{50} d'environ 0,6 µM (**Figure 23**).

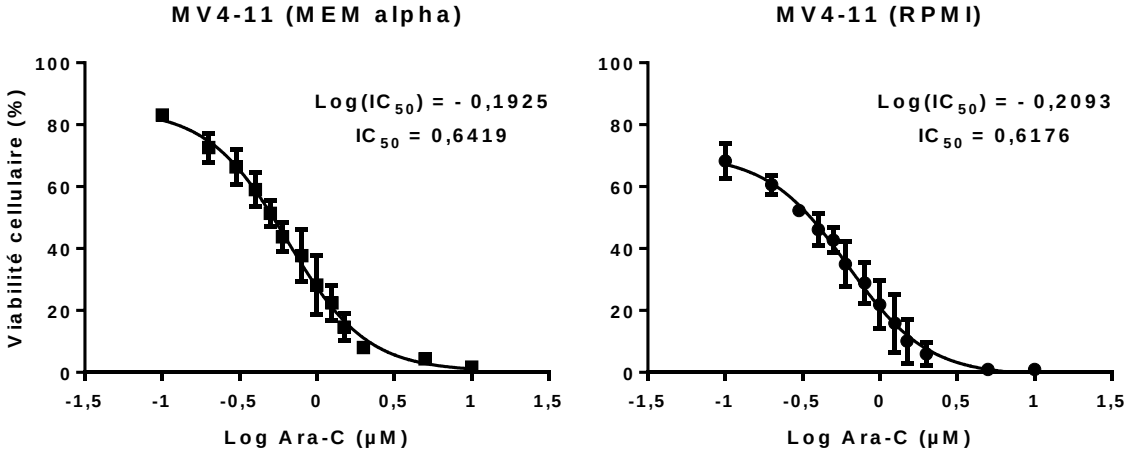


Figure 23. Détermination de l'IC_{50} de la lignée MV4-11 envers l'Ara-C cultivée en RPMI ou en MEM alpha. L'Ara-C est ajouté dans le milieu à des doses croissantes allant de 0 à 10 µM. Le nombre de cellules vivantes est déterminé après 72 h par le test à la résazurine (n = 3). Les résultats représentent la viabilité des cellules (%) en moyenne ± SD.

Nous avons ensuite traité les cocultures avec des doses croissantes d'Ara-C (0,5, 1 et 5 µM) lorsque les cellules sont implantées (jour 3), et avons examiné le nombre de cellules vivantes après 72 h (**Figure 24A**). Les résultats montrent clairement, pour la coculture de cellules de MV4-11 avec des CSM primaires, que les cellules nichées sont 2 à 7 fois plus résistantes que les deux autres populations à 0,5 et 1 µM, et certaines résistent encore à 5 µM (**Figure 24B**).

Avec les cellules HS-27a, les résultats sont très similaires, avec des cellules nichées toujours plus résistantes au traitement que les deux autres populations. Cependant, sans raison apparente, la résistance n'est pas dépendante de la dose sur ces cellules (**Figure 24C**). Pour les cellules primaires de deux des patients cultivés sur CSM primaires, nous avons observé des résultats semblables (**Figure 24D**).

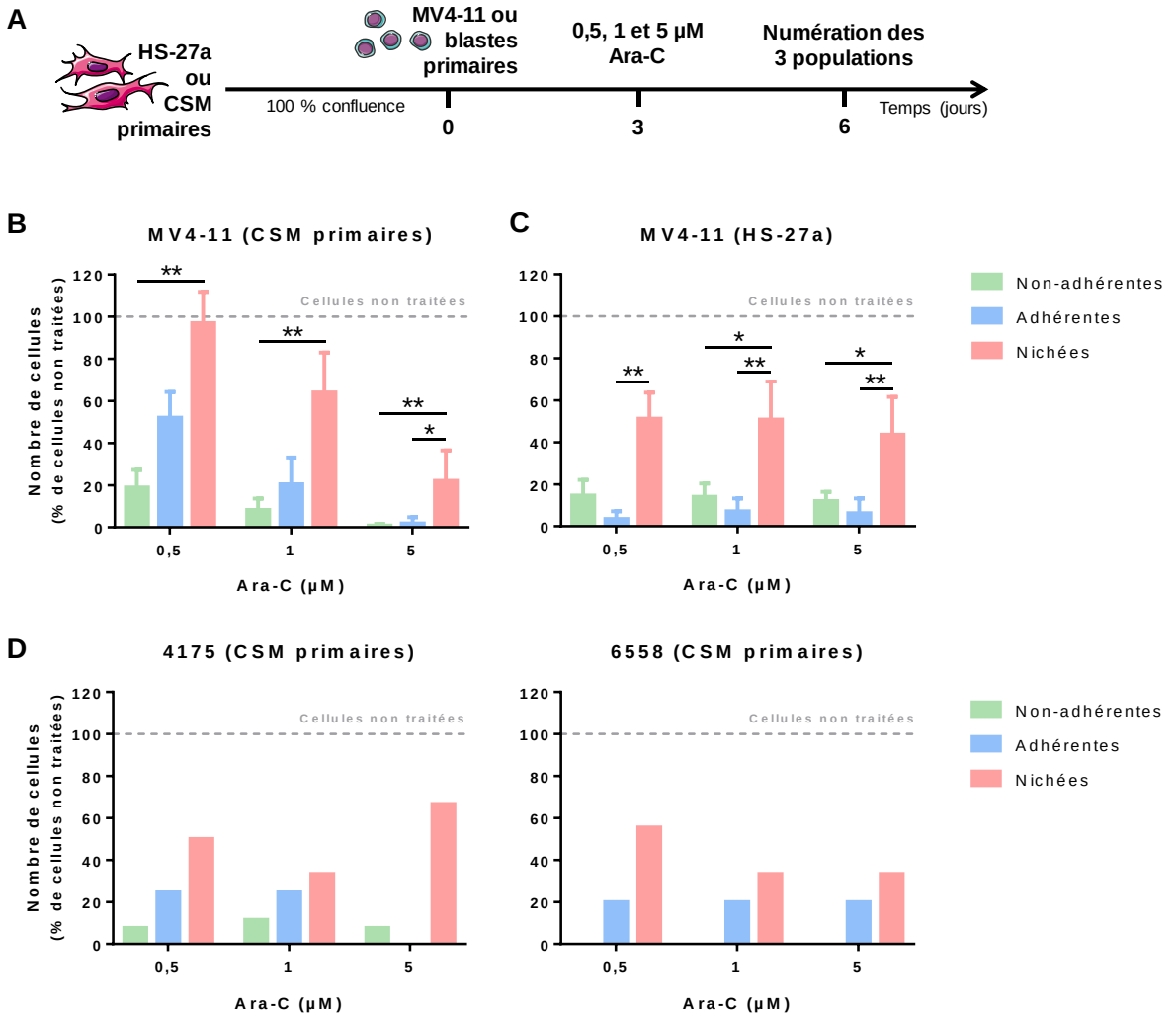


Figure 24. Les cellules nichées sont plus résistantes à l'Ara-C que les cellules adhérentes et non-adhérentes. Au jour 3 de coculture, l'Ara-C est ajouté dans le milieu à 0,5, 1 et 5 µM. Le nombre de cellules vivantes est compté trois jours plus tard. (**A**) Schéma du plan expérimental. (**B à D**) Pourcentage du nombre de cellules vivantes rapporté au pourcentage de cellules non traitées pour (**B**) une coculture de cellules MV4-11 avec des CSM primaires ($n \geq 4$), (**C**) une coculture de cellules MV4-11 avec des cellules HS-27a ($n \geq 5$) et (**D**) des cocultures de blastes primaires (4175 et 6558) avec des CSM primaires ($n = 1$). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Pour éliminer l'hypothèse d'une résistance à l'Ara-C due à une mauvaise biodisponibilité de la drogue dans la couche stromale, nous avons étudié la diffusion de la doxorubicine, une drogue fluorescente également utilisée dans le traitement de la LAM. Au jour 3 de la coculture, nous

avons ajouté la doxorubicine, et 24 h plus tard nous avons mesuré la fluorescence par cytométrie en flux dans les trois populations (**Figure 25A**).

Les données montrent que la fluorescence est équivalente pour toutes les populations (**Figures 25B et C**), indiquant que la drogue diffuse librement et est disponible dans l'ensemble de la coculture.

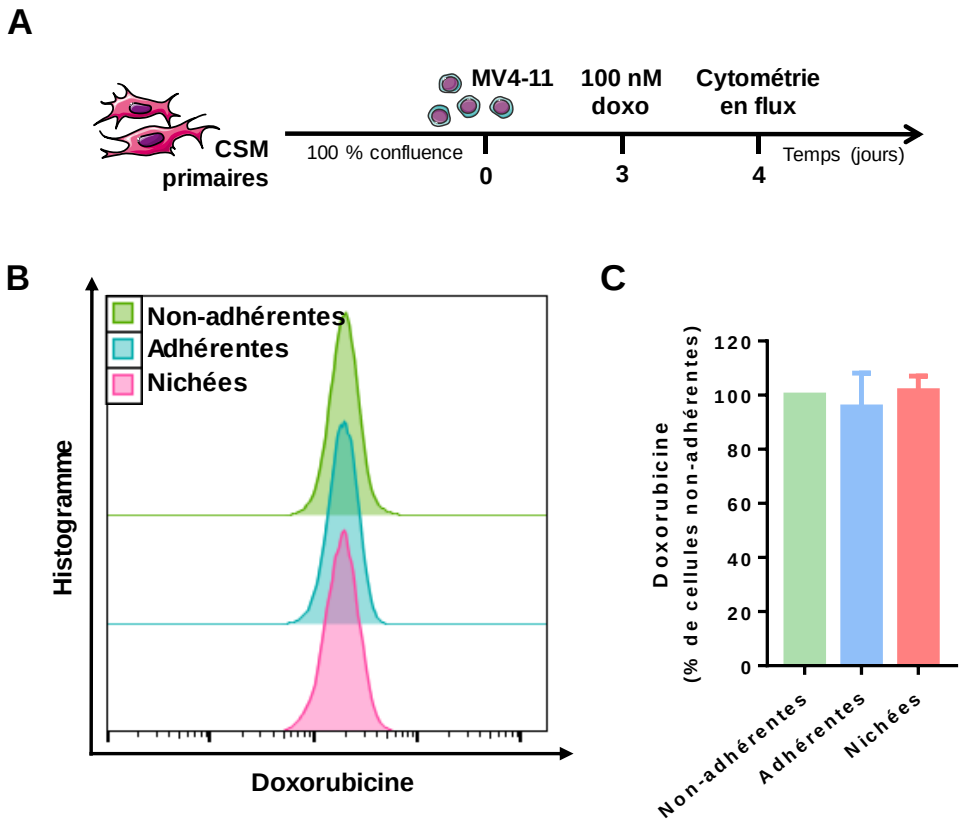


Figure 25. La doxorubicine est présente dans les trois populations. (**A**) Au jour 3 de la coculture, 100 nM de doxorubicine est ajouté dans le milieu, puis la fluorescence de la drogue est suivie dans les trois populations par cytométrie en flux 24 h après. (**B**) Une expérience représentative de la fluorescence dans les trois populations. (**C**) Quantification de la fluorescence en pourcentage par rapport aux cellules non-adhérentes (n = 3). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD.

Les résultats montrent que le nichage des cellules leucémiques, et non le simple contact ou les facteurs solubles, induit une chimiorésistance, via potentiellement une quiescence accrue, mais pas une diminution de la biodisponibilité des drogues. Cependant, la quiescence de 50 % des cellules (**Figure 22B**) ne semble pas pouvoir expliquer à elle seule les 100 % de résistance observés à 0,5 µM d'Ara-C (**Figure 24B**).

4. Etude phénotypique et fonctionnelle du caractère souche

4.1. Etude du phénotype souche

Jusqu'à très récemment, quiescence et chimiorésistance des cellules leucémiques étaient associées à un caractère immature des CSL enrichies dans la fraction $CD34^+$ $CD38^-$ (Zagozdzon & Golab, 2015). Nous avons donc analysé l'expression de ces marqueurs dans les trois populations aux jours 3 et 5 de la coculture. Nous avons testé deux groupes de leucémies, celles n'exprimant pas CD34 (Groupe 1 : MV4-11, blastes 4175 et 6558) et celles l'exprimant (Groupe 2 : 8227, blastes 4805 et 5290).

Le groupe 1 permet de montrer d'une part que le nichage est indépendant de l'expression du CD34, et d'autre part que l'expression n'est pas induite par ce nichage. Le groupe 2 ne montre pas un enrichissement des cellules exprimant le CD34 dans la fraction des cellules nichées (**Figures 26A et B**). Enfin, il n'y pas de consensus quant à l'augmentation ou non de la fraction CD34 entre les jours 3 et 5. Ceci indique que le nichage des cellules et la chimiorésistance ne sont pas liés à un phénotype particulier des cellules nichées.

4.2. Tests fonctionnels des capacités souches

La CSL est définie sur ses propriétés à initier la leucémie. Nous avons réalisé plusieurs tests *in vitro* et *in vivo* avec les cellules MV4-11 pour vérifier si les cellules nichées étaient enrichies en cellules possédant des capacités « souches » (**Figure 27A**).

Test clonogénique

Nous avons tout d'abord testé leur capacité à former des colonies *in vitro* en méthylcellulose. Les trois populations triées n'ont pas montré de différences dans leur capacité clonogénique, malgré une tendance à former moins de colonies par les cellules nichées (**Figure 27B**).

Test de repopulation

Nous avons ensuite testé la capacité des cellules à redonner les trois populations sur un nouveau stroma. Même si les cellules nichées semblent redonner plus de cellules nichées, nous observons que chaque population a gardé la capacité à redonner les deux autres (**Figure 27C**).

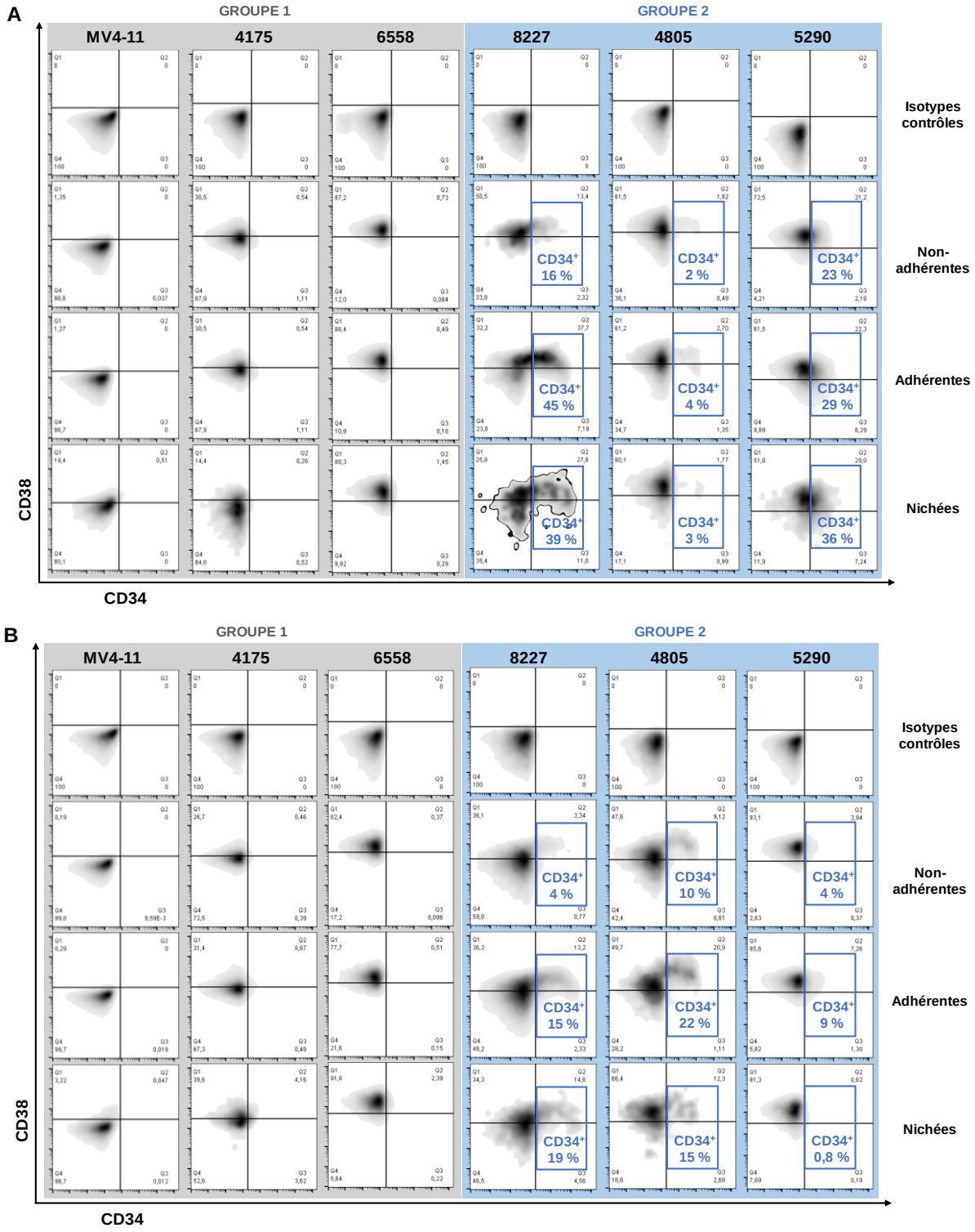


Figure 26. Phénotypage des trois populations selon l'expression des marqueurs CD34 et CD38. (**A et B**) Après récolte des trois populations leucémiques (**A**) au jour 3 ou (**B**) au jour 5 de coculture, les cellules ont été marquées avec des anticorps anti-CD34 et anti-CD38, ou leurs isotypes contrôles. L'analyse a été faite sur des cellules MV4-11, 8227 ou des blastes primaires, cultivés sur un stroma de CSM primaires.

Xénogreffe

Enfin, en collaboration avec l'équipe de Michel Aurrand-Lions au CRCM de Marseille, nous avons regardé *in vivo* leur capacité à donner une leucémie chez des souris immunodéficientes (NSG) (**Figure 27A**). Onze semaines après l'injection, seules les cellules adhérentes et nichées ont la capacité à initier une leucémie : aucune souris (0 sur 5 souris) injectée avec des cellules non-adhérentes n'a développé de leucémie, alors que 4 sur 6 souris ont développé une leucémie avec les cellules adhérentes et 2 sur 6 souris avec les cellules nichées (**Figure 27D**). Au vu du faible nombre d'animaux, il est important de confirmer ces résultats avant de conclure. Cependant les cellules adhérentes et nichées ont la capacité de greffer alors que les cellules nichées sont les plus résistantes, ceci indique qu'il faut chercher ailleurs la raison de la chimiorésistance.

Au vu de ses résultats, il semble que les cellules nichées ne présentent pas de phénotype plus immature et/ou de capacités plus « souches » que les deux autres populations leucémiques.

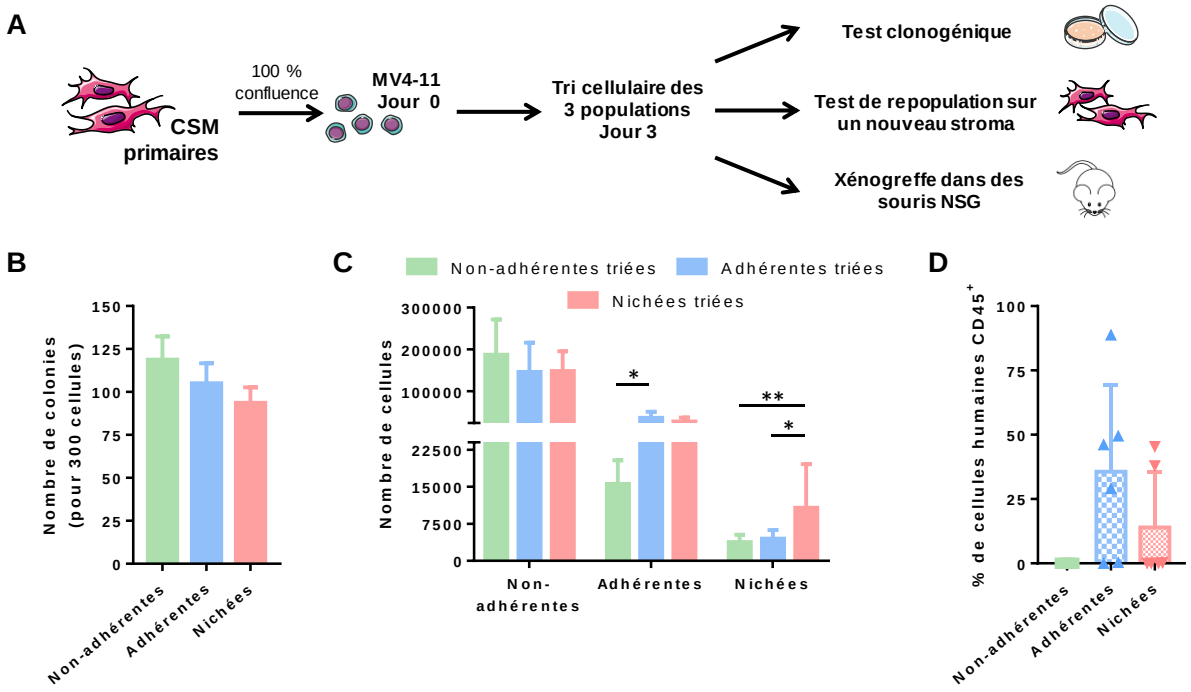


Figure 27. Tests fonctionnels des capacités souches des trois populations. (**A**) Schéma récapitulatif du plan expérimental. (**B**) Nombre de colonies formées sur 3.10^2 cellules ensemencées en méthylcellulose (n = 3). (**C**) Nombre de cellules dans chaque population leucémique après remise en culture des trois différentes fractions sur un nouveau stroma de CSM (n ≥ 4). (**D**) Pourcentage de cellules humaines $CD45^+$ dans la MO des souris NSG, après 11 semaines de xénogreffe (n = 1). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; * p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01.

5. Caractérisation du profil hypoxique

En nous inspirant des travaux de coculture montrant de l'hypoxie dans les CSH nichées (Jing et al., 2012), nous avons émis l'hypothèse que l'apparition d'une hypoxie « naturelle » dans la coculture pouvait participer à la chimiorésistance des cellules leucémiques. C'est pourquoi nous avons cherché à démontrer ce phénomène en mesurant le niveau d'oxygène dans les cultures et l'hypoxie dans les cellules leucémiques.

5.1. Mesure du niveau d'oxygène dans la coculture

Pour quantifier le pourcentage en oxygène dans la culture, nous avons utilisé le système OPAL de la société Ibidi. Le principe repose sur la décroissance de la phosphorescence qui est dépendante du taux d'oxygène. Le système utilise un détecteur installé sur un microscope à fluorescence, qui mesure la phosphorescence de billes CPOx (Ibidi) fluorescentes excitables, ajoutées dans la culture. La phosphorescence étant aussi dépendante de la température, l'ensemble des mesures est réalisé à une température de 37 °C (**Figure 28A**).

Les mesures peuvent être réalisées régulièrement sur les mêmes cultures. Nous avons tout d'abord démontré que le niveau d'oxygène dans la culture des CSM seules ne baisse que très peu au cours du temps, passant d'environ 21 % au jour 0 à 15 % d'O_2 au jour 5. En revanche, dans la culture de cellules MV4-11, nous observons une baisse importante, avec environ 11 % d'O_2 au jour 3 et 5 % au jour 5. Cette différence est très certainement expliquée par la prolifération modeste des CSM à confluence, ces dernières étant largement en G_0 (**Figure 22C**), alors que les MV4-11 ont un taux de prolifération élevé. Ces dernières ont aussi un métabolisme énergétique très dépendant de la chaîne respiratoire mitochondriale qui consomme de l'oxygène (données du laboratoire). Dans la coculture, la présence des deux types cellulaires entraîne une chute plus drastique de l'oxygène qui passe de 7 % à 2 % d'O_2 respectivement aux jours 3 et 5 (**Figure 28B**). Ces données montrent donc qu'une hypoxie se créée au sein de la coculture atteignant des taux d'oxygène proches de ceux mesurés *in vivo* dans la MO (Spencer et al., 2014).

5.2. Caractérisation de l'hypoxie cellulaire

Ensuite nous avons cherché à observer la preuve de l'hypoxie dans les cellules, en utilisant le pimonidazole, un composé qui forme des adduits en absence d'oxygène. Ceux-ci sont ensuite détectés par un anticorps. Le couplage avec un fluorochrome permet la mesure par cytométrie

en flux. Au jour 3 de la coculture, les cellules au contact des CSM ont un profil plus hypoxique avec une plus forte tendance pour les cellules nichées, à l'instar des cellules normales (Jing et al., 2012). Les cellules adhérentes ont 1,76 fois plus de signal que les cellules non-adhérentes, et les cellules nichées 2,11 fois (**Figure 28C**). Au jour 5, le même profil hypoxique est obtenu dans toutes les populations, ce qui corrèle au niveau globalement bas détecté précédemment.

L'ensemble des résultats démontre l'apparition d'une hypoxie au cours du temps, avec des cellules nichées qui semblent plus rapidement et plus fortement affectées que les autres.

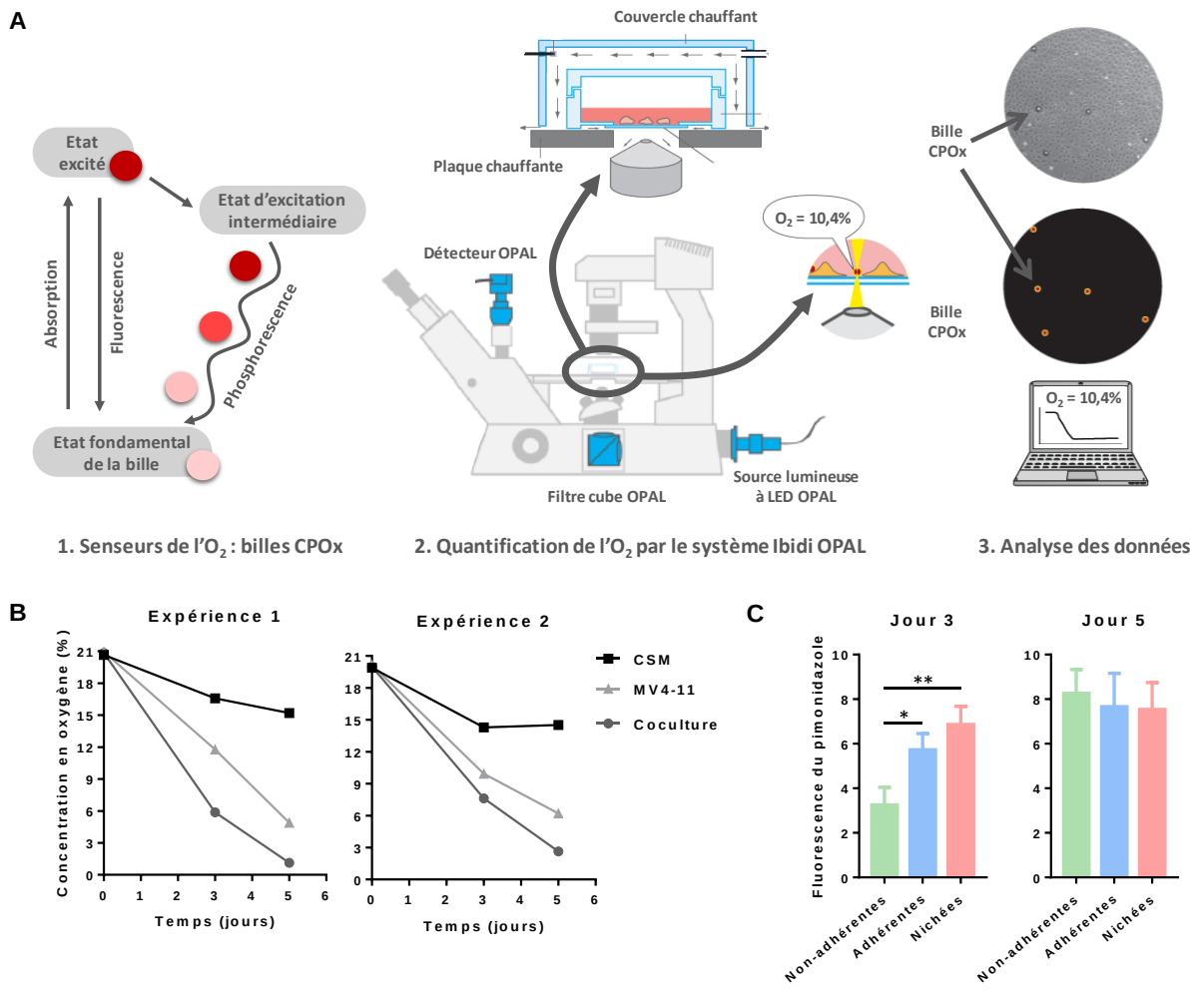


Figure 28. Caractérisation du niveau d'oxygène dans la coculture et de l'hypoxie dans les trois populations. (**A**) Au jour 0 de coculture, des billes CPOx (Ibidi) sont ajoutées dans le milieu, et leur phosphorescence est mesurée à l'aide du système Ibidi OPAL. (**B**) Concentration en oxygène dans le milieu, mesurée sur 5 jours dans des cultures simples de CSM primaires ou de cellules MV4-11, ainsi que dans des cocultures de cellules MV4-11 avec des CSM primaires (2 expériences représentées séparément). (**C**) Aux jours 3 et 5, 400 nM de pimonidazole est ajouté pendant 2 h dans le milieu de coculture, puis les cellules des trois fractions leucémiques sont marquées avec un anticorps anti-pimonidazole (Mab1) et analysées par cytométrie en flux ($n \geq 4$). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

5.3. Effet de l'inhibition des facteurs HIF couplée à la cytarabine

Ayant montré un profil hypoxique des cellules nichées au jour 3 de la coculture, nous avons émis l'hypothèse que bloquer la réponse hypoxique pourrait diminuer la chimiorésistance. Pour vérifier cela, nous avons utilisé deux inhibiteurs des HIF, seuls ou en combinaison avec l'Ara-C : d'une part l'acriflavine (ACF), inhibiteur non spécifique des facteurs HIF, et le PT-2385, un inhibiteur spécifique de HIF-2α. L'ACF, de la famille des acridines, est un puissant antibactérien et intercalant, qui se lie au domaine PASb de HIF-1α et HIF-2α, empêchant leur dimérisation avec ARNT (Lee et al., 2009). Son effet a déjà été mentionnée pour améliorer l'efficacité de l'imatinib dans la LMC (Cheloni et al., 2017). Le PT-2385 est une molécule capable de se lier à une petite cavité lipophile dans le domaine PASb de HIF-2α uniquement, empêchant sa dimérisation avec ARNT (Wallace et al., 2016). Pour ces tests de résistance, nous avons pré-incubé la coculture pendant 1 h avec 0,5 µM d'ACF ou 20 µM de PT-2385, puis ajouté 0,5 ou 1 µM d'Ara-C et énuméré les cellules nichées au bout de trois jours de traitement (**Figure 29A**).

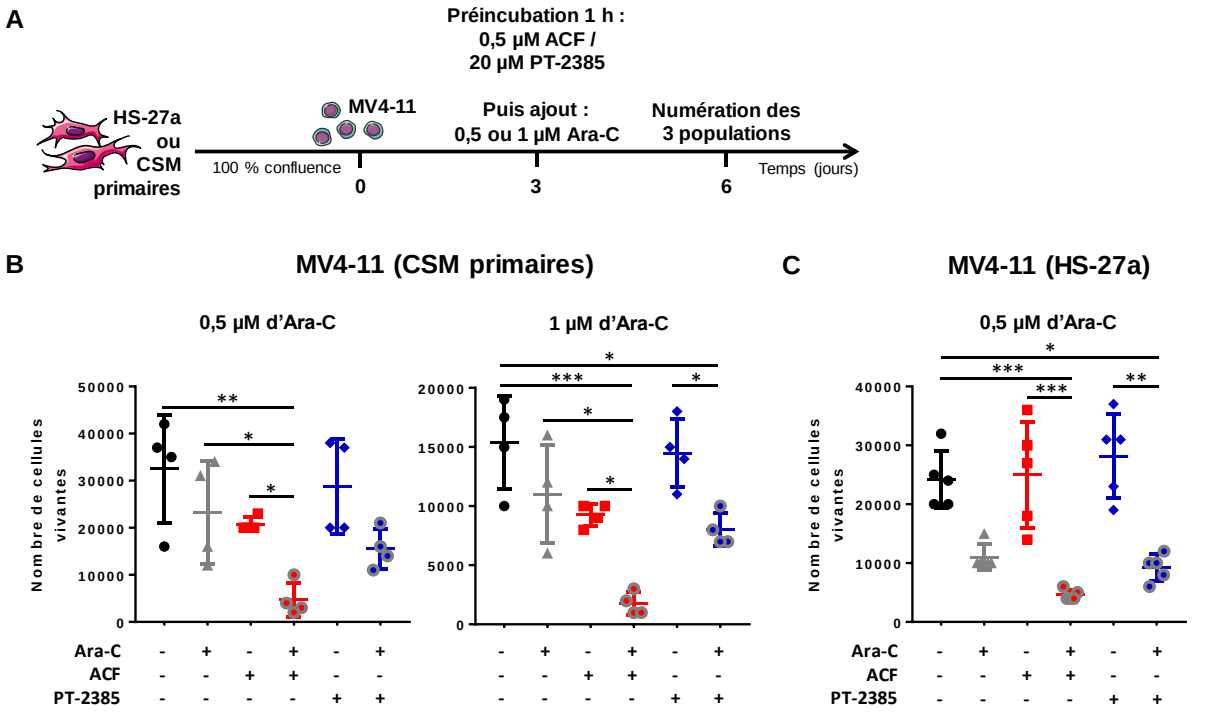


Figure 29. Effet de l'inhibition des facteurs HIF en traitement avec la cytarabine. Au jour 3 de coculture, 0,5 µM d'ACF ou 20 µM de PT-2385 sont pré-incubés 1 h, puis l'Ara-C est ajouté dans le milieu à 0,5 et 1 µM. Le nombre de cellules vivantes nichées est compté trois jours plus tard. (**A**) Schéma du plan expérimental. (**B**) Nombre de cellules vivantes dans une coculture de cellules MV4-11 avec des CSM primaires selon les différentes conditions avec 0,5 ou 1 µM d'Ara-C (n = 4). (**C**) Nombre de cellules vivantes dans une coculture de cellules MV4-11 avec des cellules HS-27a selon les différentes conditions avec 0,5 µM d'Ara-C (n = 5). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Dans une coculture avec des CSM primaires, le traitement simple par ACF induit les mêmes effets cytotoxiques que l'Ara-C seul. Cependant, en double traitement, les deux molécules ont un effet additif ou synergique, permettant d'éradiquer 85 % (0,5 µM d'Ara-C) et 89 % (1 µM d'Ara-C) des cellules nichées (**Figure 29B**). Pour une coculture avec des cellules HS-27a, de manière surprenante l'ACF n'a pas d'impact sur les cellules nichées. Le double traitement permet d'éradiquer 81 % des cellules, même si cela n'est pas statistiquement différent des 45 % de cellules éradiquées par le traitement à l'Ara-C seul (**Figure 29C**).

En revanche, le PT-2385 à une dose supérieure à celle classiquement utilisée n'a que peu ou pas d'effet seul ou en combinaison avec l'Ara-C sur la levée de chimiorésistance des cellules nichées. En effet, il reste toujours 48 % (0,5 µM d'Ara-C) et 52 % (1 µM d'Ara-C) de cellules nichées après double traitement dans une culture avec CSM primaires (**Figure 29B**) et 38 % avec des cellules HS-27a (**Figure 29C**).

Ces résultats montrent que la combinaison du traitement classique de la LAM (Ara-C) avec un inhibiteur des facteurs HIF (ACF) permet de resensibiliser les cellules nichées chimiorésistantes à la cytarabine. L'hypoxie joue donc certainement un rôle important dans la chimiorésistance des cellules nichées.

6. Caractérisation du métabolisme oxydatif

Etant donné le rôle du métabolisme oxydatif dans la leucémie et la régulation de celui-ci par l'hypoxie (*cf.* Chapitre IV), nous avons cherché à caractériser le stress oxydant dans les trois populations leucémiques au sein de la coculture.

6.1. Mesure des ROS cytoplasmiques et mitochondriales

Les ROS cytoplasmiques et mitochondriales ont été mesurées en utilisant respectivement le CM-H_2DCFDA et le MitoSOX, dont la fluorescence est analysée par cytométrie en flux. Dès le jour 3 de la coculture, une baisse de 41 % du niveau de ROS cytoplasmiques est notée dans les cellules nichées par rapport aux cellules adhérentes et non-adhérentes. Cette diminution reste observée au jour 5 (**Figure 30A**). Aucune différence n'est observée entre les CSM primaires issues de la coculture et celles de culture simple (**Figure 30B**).

Une très large partie des ROS provient de l'activité mitochondriale. La baisse des ROS mitochondriales est aussi très forte dans les cellules nichées (36 % de moins au jour 3 et 32 %

au jour 5) comparées aux cellules adhérentes et non-adhérentes (**Figure 30C**). En parallèle, une augmentation des ROS mitochondriales est observée dans la partie stromale, comparées à des CSM seules (**Figure 30D**).

Ces données montrent que les cellules nichées ont un stress oxydant amoindri par rapport aux deux autres fractions leucémiques.

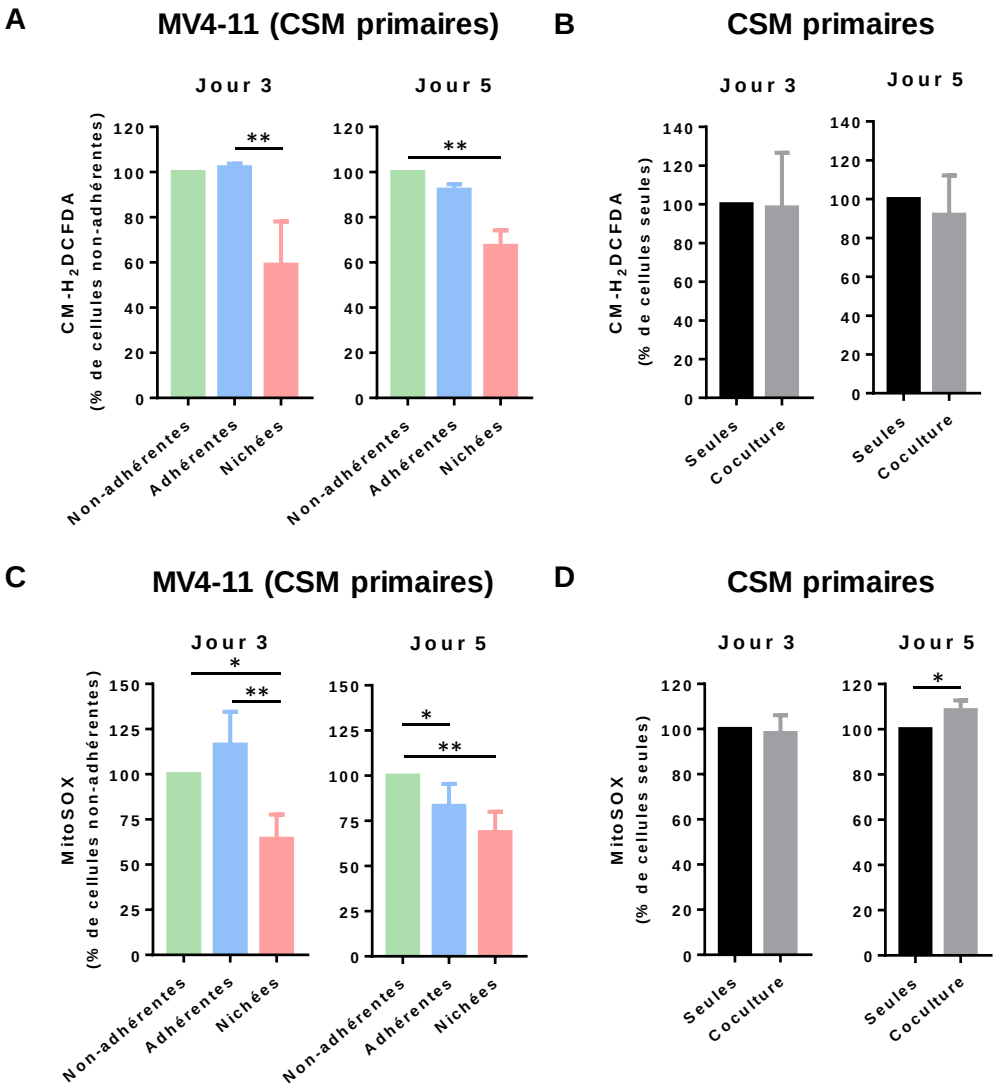


Figure 30. Mesure des ROS cytoplasmiques et mitochondriales. (**A à D**) Après récolte des trois populations leucémiques, les cellules ont été marquées avec les sondes (**A et B**) CM-H_2DCFDA pour la détection des ROS cytoplasmiques ou (**C et D**) MitoSOX pour la détection des ROS mitochondriales. Le marquage a été réalisé à la fois sur (**A et C**) les cellules MV4-11 et (**B et D**) les CSM primaires issues de la coculture ou de culture simple. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; n ≥ 3 ; * p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01.

6.2. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial et de la masse mitochondriale

Nous avons envisagé que la baisse des ROS mitochondriales puisse être en lien avec une baisse de la respiration mitochondriale dans les cellules nichées. Pour mesurer cette activité, nous avons utilisé le TMRE qui permet la détection du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules. Au jour 3 de la coculture, une diminution du potentiel de membrane est notée dans les cellules nichées comparées aux cellules adhérentes et en suspension (respectivement de 25 % et 17 %). De même à jour 5, nous observons une baisse significative de l'activité des mitochondries dans la fraction des cellules nichées par rapport aux cellules adhérentes et non-adhérentes (respectivement de 29 et 24 %) (**Figure 31A**). Pour la partie stromale, nous observons au jour 5 une diminution du potentiel de membrane dans les CSM issues de coculture par rapport aux CSM seules (**Figure 31B**).

La baisse du potentiel de membrane observée pouvait être la conséquence d'un changement dans l'activité de la chaîne respiratoire ou d'une diminution du nombre de mitochondries. Pour déterminer cela, nous avons marqué les cellules avec une sonde MitoTracker Deep Red, décrit par le fournisseur comme un marqueur des mitochondries non dépendant du potentiel. Le signal est fortement diminué dans la population nichée, comparées aux cellules adhérentes et non-adhérentes (respectivement de 34 et 51 % au jour 3 et de 52 et 55 % au jour 5) (**Figure 31C**). De manière intéressante, il y a une augmentation de la masse mitochondriale pour les CSM issues de coculture par rapport aux CSM provenant de culture simple (**Figure 31D**), ce qui pourrait être en lien avec la hausse des ROS mitochondriales observée (**Figure 30D**).

Ainsi, la baisse des ROS serait corrélée à une baisse du nombre de mitochondries dans les cellules nichées par rapport aux deux autres populations.

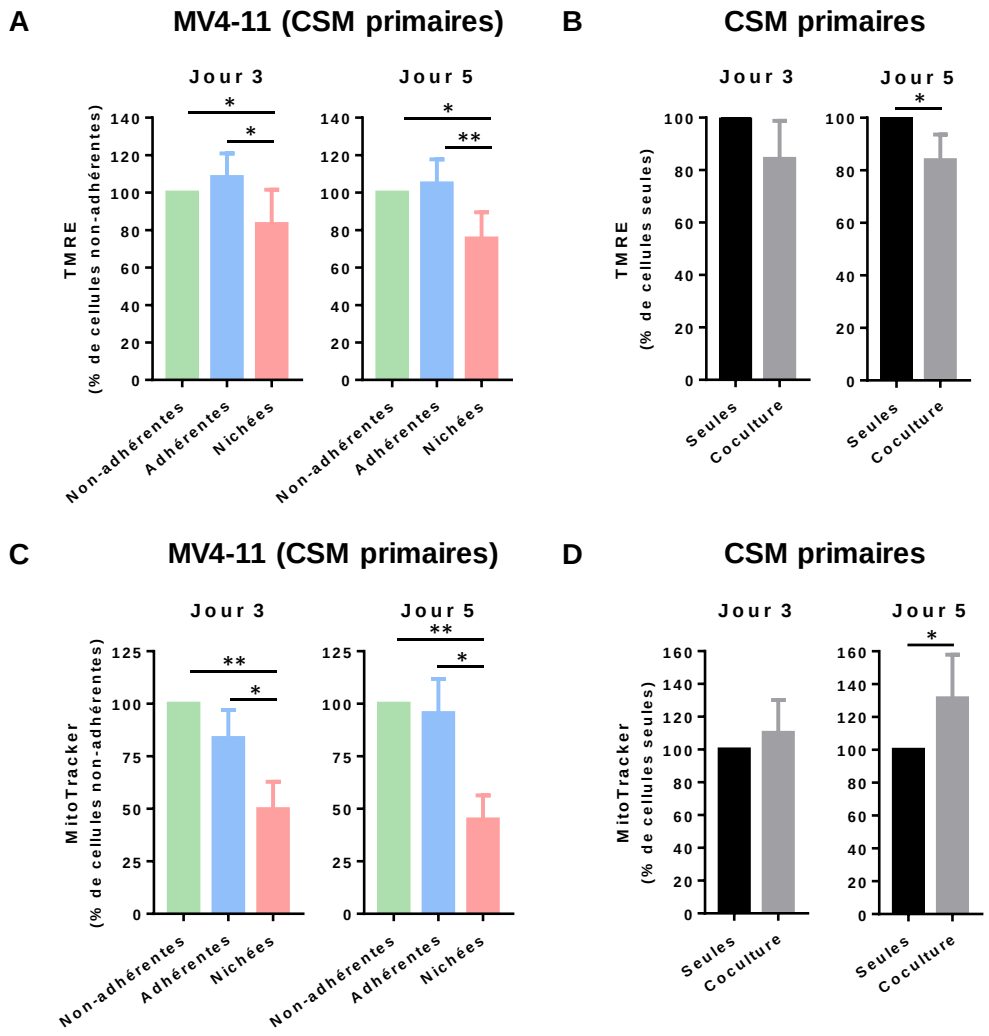


Figure 31. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial et de la masse mitochondriale dans les trois populations. (**A à D**) Après récolte des trois populations leucémiques, les cellules ont été marquées avec les sondes (**A et B**) TMRE pour la détection du potentiel de membrane mitochondrial ou (**C et D**) MitoTracker Deep Red pour la détection de la masse mitochondriale. Le marquage a été réalisé à la fois sur (**A et C**) les cellules MV4-11 et (**B et D**) les CSM primaires issues de la coculture ou de culture simple. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; $n \geq 3$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

7. Caractérisation de l'adhérence cellulaire

Les trois populations leucémiques se distinguant par leur localisation dans la coculture et leur capacité d'adhérence, nous avons cherché à savoir si elles exprimaient différemment des molécules d'adhésion. De manière intéressante, il a été démontré que les CSH au contact des CSM (incluant adhérentes et nichées) expriment plus fortement à leur surface le récepteur de chimiokines, CXCR4 (Alakel et al., 2009), de même que les cellules de LAM chimiorésistantes (Duarte et al., 2019). De plus, l'absence de CXCR4 induit une augmentation du niveau de ROS

dans les CSH (Zhang et al., 2016b). Enfin CXCR4, comme certaines intégrines, est connu pour être régulé par l'hypoxie (Fiegl et al., 2009).

7.1. Expression des molécules d'adhésion

Nous avons examiné l'expression de cinq intégrines et molécules d'adhésion connues dans la niche hématopoïétique : CD29 (intégrine β1), CD49d (intégrine α4), CD49e (intégrine α5), CD44 et CD184 (CXCR4). L'expression du CD29 diminue dans les cellules adhérentes et nichées au jour 3, et dans les cellules adhérentes au jour 5 (**Figure 32A**). En revanche, l'expression de CD49d et CD49e ne varie pas, quels que soient la population leucémique et le jour de coculture (**Figures 32B et C**). L'expression du CD44 baisse dans les cellules nichées au jour 3, mais revient à la normale au jour 5 (**Figure 32D**). Finalement, le seul changement marquant est celui de l'expression de CXCR4 qui augmente de 23 et 43 % (respectivement aux jours 3 et 5) pour la fraction des cellules nichées (**Figure 32E**).

Ces résultats montrent que les cellules qui se nichent sont celles qui expriment le plus fortement CXCR4, ou alternativement, qui acquièrent une forte expression de CXCR4.

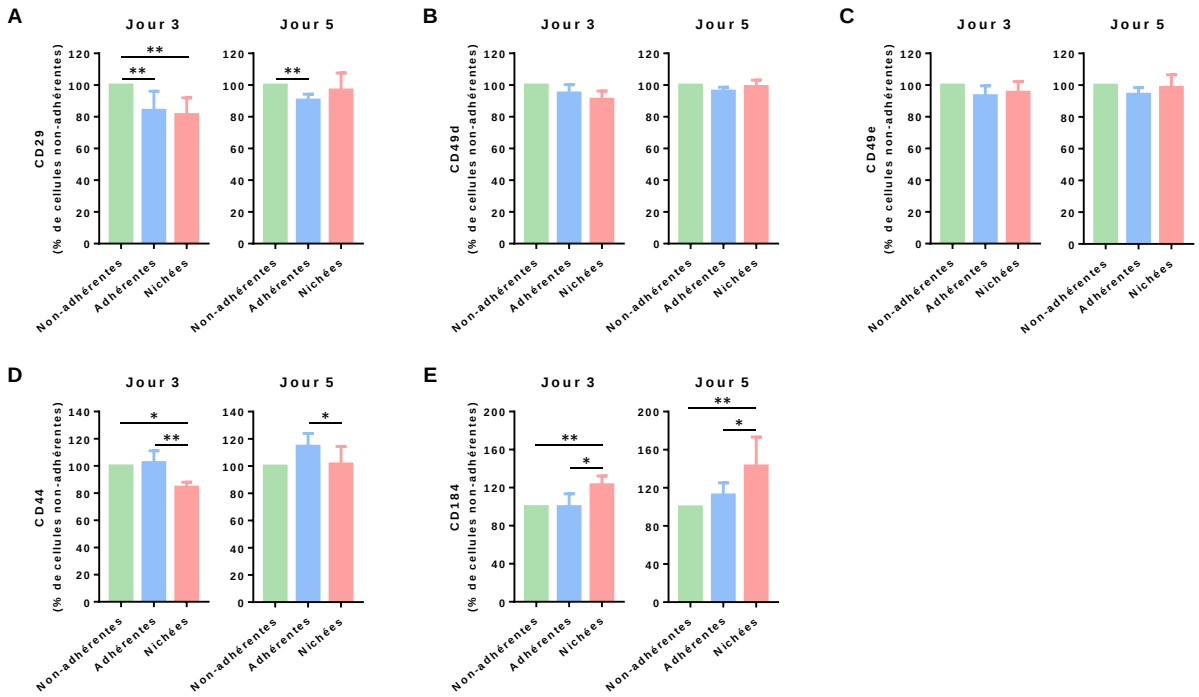


Figure 32. Expression de molécules d'adhésion dans les trois populations. Après récolte des trois populations leucémiques, les cellules ont été marquées avec les anticorps (**A**) anti-CD29, (**B**) anti-CD49d ou (intégrine α4), (**C**) anti-CD49e (ou intégrine α5), (**D**) anti-CD44 ou (**E**) anti-CD184 (ou CXCR4). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; n = 5 ; * p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,01.

7.2. Impact de l'inhibition de CXCR4

Nous avons ensuite testé si l'inhibition de CXCR4 par l'AMD3100 pouvait impacter le nichage des cellules. Lors de l'ajout des cellules MV4-11 sur la couche de CSM, celles-ci ont soit été ajoutées avec 0,5 µg/mL d'AMD3100 (ou de l'eau distillée comme contrôle), soit pré-incubées 1 h avec l'AMD3100 puis mises en culture sur la couche de CSM après avoir été lavées ou non (**Figure 33A**).

De manière surprenante, le nombre de cellules adhérentes et nichées ne varient pas avec l'ajout d'AMD3100. Seules les cellules non-adhérentes traitées ont une légère baisse du nombre de cellules par rapport aux cellules non traitées (**Figure 33B**). Ces résultats suggèrent que l'AMD3100 n'empêche pas le phénomène de nichage au sein de la coculture.

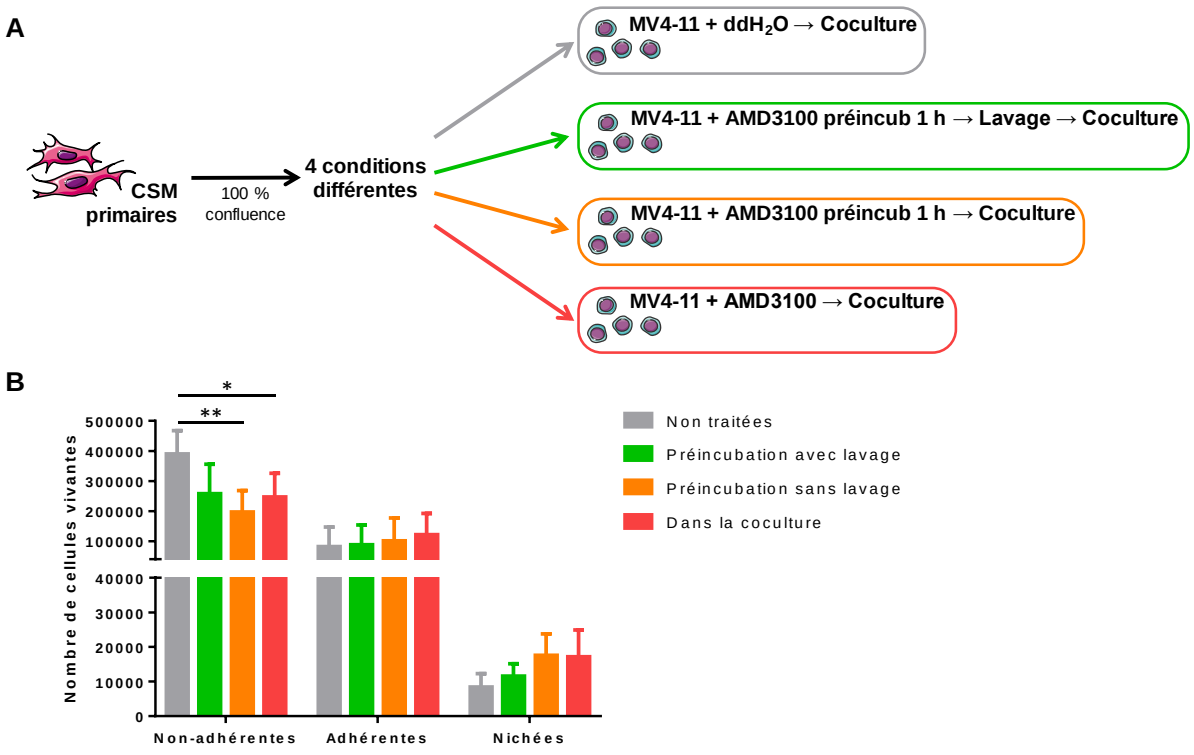


Figure 33. Impact de l'inhibition de CXCR4. (**A**) Au jour 0 de coculture, soit 0,5 µg/mL d'AMD3100 (ou ddH_2O comme contrôle) est ajouté à la coculture avec les cellules MV4-11, soit les cellules MV4-11 sont pré-incubées 1 h puis mises en culture sur les CSM après avoir été ou non lavées. Le nombre de cellules vivantes nichées est compté trois jours plus tard. (**B**) Nombre de cellules vivantes dans les trois populations leucémiques (n = 5). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD ; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

D. Conclusion

La première partie avait pour but d'utiliser un modèle simple de coculture pour mimer la niche hématopoïétique et comprendre les effets de l'hypoxie sur la chimiorésistance, ainsi que les mécanismes mis en jeu, avec un intérêt particulier pour le stress oxydant. Nous avons identifié plusieurs populations leucémiques sur leurs propriétés d'adhérence, dans un modèle n'utilisant que des cellules humaines, et montré que les cellules qui viennent se nicher dans le stroma ont des propriétés différentes des deux autres populations. Ceci nous a conforté dans l'idée qu'il fallait être attentif à la méthode de prélèvement des cellules, puisque les cellules adhérentes à la surface des CSM peuvent être, selon les manipulateurs, contenues soit dans la fraction en suspension soit avec les cellules nichées. Nous avons démontré que l'hypoxie pouvait apparaître naturellement dans la culture sans artifice extérieur. De manière intéressante, les cellules nichées, rapidement hypoxiques, sont aussi plus quiescentes et sont fortement chimiorésistantes, mais peuvent être éliminées par l'ACF. Leur stress oxydant est plus faible probablement du fait d'une baisse des mitochondries. Le modèle est donc établi et montre que le simple contact ou le surnageant ne sont pas suffisants à induire la chimiorésistance et des changements métaboliques. Il devrait donc permettre maintenant d'appréhender les liens entre l'hypoxie, l'adhérence, le métabolisme et la chimiorésistance qui n'ont pu être approfondis dans cette étude.

Deuxième partie

Etude comparative de la capacité de lignées cellulaires stromales mésenchymateuses à former des sphéroïdes

A. Introduction de l'article

Au travers d'un modèle de coculture avec des CSM primaires de MO, nous avons identifié trois populations leucémiques aux propriétés différentes. Toutefois, il est proposé maintenant des systèmes 3D plus complexes *in vitro* et/ou *in vivo* qui apportent une nouvelle dimension en matière d'interactions cellulaires, de contraintes de pression ou de biodisponibilité de l'oxygène, se rapprochant d'autant plus de la niche hématopoïétique chez l'Homme. C'est pourquoi nous avons cherché à développer un modèle 3D de niche.

Différentes techniques existent allant de l'utilisation de cultures classiques sur plaque à revêtement non adhésif à des techniques plus complexes de *scaffolds* (Cesarz & Tamama, 2016). Nous avons fait le choix d'essayer tout d'abord une méthode simple, rapide et reproductible, en utilisant des plaques 96 puits à fond rond, alliées à un milieu supplémenté en méthylcellulose semi-solide, reposant sur la capacité des CSM à s'agréger naturellement. Comme avec le modèle de coculture 2D, nous avons cherché à simplifier les expériences, et normaliser la formation des sphéroïdes en étudiant la capacité de lignées de CSM à en former également, ces données étant absentes de la littérature. Pour cela, nous avons choisi deux lignées cellulaires humaines connues pour soutenir l'hématopoïèse *in vitro*, HS-27a et HS-5 (Iwata, Sandstrom, Delrow, Stamatoyannopoulos, & Torok-Storb, 2014; Torok-Storb et al., 1999), ainsi que la lignée murine MS-5 contrôle.

Tout comme les CSM primaires, les lignées ont été capables de former des sphéroïdes, mais en deux fois plus de temps (10 h *versus* 5 h), probablement à cause d'une sédimentation diminuée du fait de leur taille. À l'inverse des lignées, les sphéroïdes dérivés des CSM primaires ont une forte réduction de leur taille au cours du temps. Ce phénomène avait été observé par d'autres groupes, et corrélerait avec une augmentation de l'autophagie (Bellotti, Duchi, Bevilacqua,

Lucarelli, & Piccinini, 2016; Kim, Yun, Young, Byung, & Choi, 2018; Pennock et al., 2015; Redondo-Castro et al., 2018; Schmal et al., 2015; Shearier et al., 2016; Tsai, Liu, Yuan, & Ma, 2015). Cependant, cette condensation pourrait être la conséquence de la structure des sphéroïdes dérivés des CSM primaires, qui semblent avoir une forte cohésion, suggérant un impact de la matrice extracellulaire. De plus, tous les sphéroïdes montrent une baisse du nombre de cellules, expliquée par un déséquilibre entre mort cellulaire et prolifération. L'ensemble des premiers résultats a montré que la lignée HS-27a se comportait de manière très similaire aux CSM primaires.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'hypoxie, d'une part parce que nous recherchions un modèle d'hypoxie pour étudier son lien avec la chimiorésistance des cellules leucémiques, et d'autre part car l'hypoxie aiguë ou prolongée peut induire de l'apoptose. Une étude avait démontré la formation d'un gradient d'hypoxie dans les sphéroïdes dérivées de CSM primaires, nous avons donc souhaité comparer la lignée HS-27a avec les cellules primaires (Sharma et al., 2012). Nous avons montré l'apparition d'une hypoxie au sein des sphéroïdes par l'augmentation du marqueur CA-IX, classiquement utilisé dans les tumeurs solides, corrélée à celle du facteur HIF-1α et de sa cible VEGF-A. L'hypoxie dans les sphéroïdes pourrait donc favoriser la mort cellulaire observée. Enfin, la mort cellulaire pouvait aussi être expliquée par l'induction d'un stress oxydant. Nous l'avons démontré en regardant l'expression de la protéine HO-1, et de celle d'enzymes antioxydantes induites après stress.

Enfin, la formation des sphéroïdes a été démontrée comme favorisant le maintien des capacités souches des CSM, avec la réexpression de SOX-2, OCT-4 et NANOG, associée à de la dédifférenciation. Nous avons observé que la lignée HS-27a, tout comme les CSM primaires contrôles, est capable de réexprimer ces marqueurs « souches ».

Nos travaux ont donc permis de démontrer que des lignées cellulaires humaines de CSM peuvent être utilisées pour former des sphéroïdes de manière simple et reproductible. Elles pourront donc aider à comprendre les mécanismes impliqués dans la physiologie des CSM et peuvent constituer un modèle pour étudier les interactions cellulaires de la niche hématopoïétique. Ce modèle pourrait aussi être utilisé pour appréhender les processus métastatiques dans la moelle osseuse.

A comparative study of the capacity of mesenchymal stromal cell lines to form spheroids

Margaux Deynoux[1,$], Nicola Sunter[1,$], Elfi Ducrocq[1], Hassan Dakik[1], Roseline Guibon[2,3], Julien Burlaud-Gaillard[4,5], Lucie Brisson[3], Louis-Romée le Nail[6], Olivier Hérault[1,7], Jorge Domenech[1,7], Philippe Roingeard[4,5], Gaëlle Fromont[2,3], Frédéric Mazurier[1,*]

[1] Université de Tours, EA 7501 GICC, CNRS ERL 7001 LNOx, Tours, France

[2] Anatomie et cytologie pathologique, CHRU de Tours, Tours, France

[3] INSERM UMR1069, Nutrition, Croissance et Cancer, Université de Tours, Tours, France

[4] Plateforme IBiSA de Microscopie Electronique, Université et CHRU de Tours, Tours, France

[5] INSERM U1259 MAVIVH, Université et CHRU de Tours, Tours, France

[6] Service de Chirurgie orthopédique, CHU Tours

[7] Service d'hématologie biologique, CHRU de Tours, Tours, France

[$] Equal contribution

* Corresponding author: Frédéric Mazurier, Université de Tours, EA7501 GICC, CNRS ERL7001 LNOx, UFR de médecine, Bâtiment Dutrochet, 10 Boulevard Tonnellé, BP 3223, Tours Cedex 1, 37032, France; frederic.mazurier@inserm.fr

Keywords: bone marrow mesenchymal cells, HS-27A, HS-5, spheroids, hypoxia, oxidative stress

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs)-derived spheroid models favor maintenance of stemness, ex vivo expansion and transplantation efficacy. Spheroids may also be considered as useful surrogate models of the hematopoietic niche. However, accessibility to primary cells, from bone marrow (BM) or adipose tissues, may limit their experimental use and the lack of consistency in methods to form spheroids may affect data interpretation. In this study, we aimed to create a simple model by examining the ability of cell lines, from human (HS-27a and HS-5) and murine (MS-5) BM origins, to form spheroids, compared to primary human MSCs (hMSCs). Our protocol efficiently allowed the spheroid formation from all cell types within 24 hours. Whilst hMSCs-derived spheroids began to shrink after twenty-four hours, the size of spheroids derived from cell lines remained constant during three weeks. The difference was partially explained by the balance between proliferation and cell death, which could be triggered by hypoxia and induced oxidative stress. Our results demonstrate that, unlike hMSCs, MSC cell lines make reproductible spheroids that are easily handled. Thus, this model could help in understanding mechanisms involved in MSC functions and may provide a simple model by which to study cell interactions in the BM niche.

1. Introduction

Over the last two decades, extensive studies have attempted to characterize mesenchymal stem cell (MSC). Initially described in the bone marrow (BM), MSCs were later found in almost all adult and fetal tissues (Domenech, 2017). Their classification rapidly suffered from a lack of clear phenotypical definition. Therefore, in 2006, the International Society for Cellular Therapy (ISCT) defined MSCs according to three minimal criteria: adherence to plastic, specific cell surface markers and multipotent potential. Indeed, MSCs are classically described as stem cells that are able to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts (Dominici et al., 2006), making them an attractive source of cells in regenerative medicine. Subsequent studies have also established their ability to differentiate into cardiomyocytes (Makino et al., 1999), neurons (Sanchez-Ramos et al., 2000), epithelial cells (Spees et al., 2003) and hepatocytes (Hong et al., 2005). The discovery of the multiple functions of MSC, such as those involved in the anti-inflammatory response (Yan et al., 2018) and in injury repair (Perez et al., 2018; Su et al., 2018) confirmed them as promising cellular tools in regenerative medicine.

Furthermore, MSCs represent a key component of the BM microenvironment supporting normal hematopoiesis through the regulation of stem cell renewal and differentiation processes, but also fueling malignant cells and protecting them from therapeutic agents (Pinho and Frenette, 2019). As such, primary MSCs have often been used as feeder layers in long-term co-culture of hematopoietic cells *in vitro* in preclinical studies (Vaidya and Kale, 2015). With the aim of standardization, the murine MS-5 cell line became the gold-standard for both normal or malignant hematopoietic cell culture (Dhami et al., 2016). This robust co-culture model has been widely used and has contributed to the characterization of hematopoietic stem cells (HSC) (Vaidya and Kale, 2015). This 2D system, while closer to BM physiology than the culture of hematopoietic cells alone, still lacks the three-dimensional complexity of the BM niche. Thus, although widely used, it is certainly not sufficiently consistent at predicting *in vivo* responses (Cesarz and Tamama, 2016). Therefore, a 3D system might be a better alternative to mimic the BM microenvironment.

Critically, the culture leads to rapid loss of MSC pluripotency and supportive functions. Therefore, a wide range of techniques to form 3D MSC structures, from the simplest spheroids to the more complex matrix-based structures, have been proposed (Lin and Chang, 2008). Studies of spheroids, also called mesenspheres, were mostly dedicated to the examination of

MSC stemness and differentiation abilities, such as osteogenesis, in order to improve their in vitro expansion and transplantation efficacy in regenerative medicine (Baraniak and McDevitt, 2012; Ghazanfari et al., 2016). Furthermore, this model has also been tested as a surrogate niche for hematopoietic cells (Aljitawi et al., 2014; Bruce et al., 2015; De Barros et al., 2010; Futrega et al., 2017; Isern et al., 2013; Leisten et al., 2012; Wuchter et al., 2016). Spheroids take advantage of the ability of MSCs to self-aggregate, which is improved by using various approaches such as low adhesion plates, natural and artificial (centrifugation) gravity, cell matrix or more complex scaffolds (Cesarz and Tamama, 2016; Egger et al., 2018; Lin and Chang, 2008; Sart et al., 2014). Classically, studies have used human primary MSCs, from BM, cord blood and lipoaspirate, or rodent sources (Baraniak and McDevitt, 2012; Ong et al., 2008).

Although immortalized MSCs, or well characterized cell lines, could bypass the lack of primary cells and avoid the variability involved with use of primary human MSCs (hMSCs) samples, they are rarely employed to make spheroids (Cavnar et al., 2015; Saleh et al., 2012). Cell lines would also allow better standardization of the spheroid formation protocol. In this study, we examined the spheroid-forming capacity of two human cell lines (HS-27a and HS-5) and the murine gold-standard MS-5, in comparison with hMSCs. We defined a simple and fast method using standard matrix to form spheroids and characterized them in terms of physical features, cell proliferation and death.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and reagents

Murine MS-5 bone marrow (BM) stromal cell line was kindly provided by Mori KJ (Niigata University, Japan) (Itoh et al., 1989). Human HS-27a and HS-5 BM stromal cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC CRL-2496 and CRL-11882, respectively). Primary human MSCs (hMSCs) were obtained by iliac crest aspiration from informed consent patients undergoing orthopedic surgery (Cardiovascular Surgery Department, Trousseau Hospital, Tours, France). HS-27a and HS-5 cell lines were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) and hMSCs and MS-5 in MEM Alpha (Life Technologies). All medium were supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (all from Life Technologies). For hMSCs culture only, 0.004 % of recombinant human FGF basic (FGF-2, R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) was added. Cells were maintained in a saturated humidified atmosphere at 37 °C and 5 % CO2. HS-27a, HS-5 and MS-5 cell lines were used for experiments between passages 5 and 20, and hMSCs at passage 2.

2.2. Spheroids formation

For one spheroid, 30,000 cells were cultured in 100 µL of medium, supplemented by 0.25 % to 1 % of either Methocult^{TM} SF H4236 or H4100 (StemCell, Grenoble, France), and seeded in U-bottomed 96-well plate (Sarstedt, Marnay, France). The medium was the same as that of the normal culture for each cell line but supplemented with heat inactivated FBS to reach 15 %. At days as detailed, microscopic analysis was performed using a Leica DMIL microscope (Leica, Nanterre, France), coupled to a DXM1200F camera (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). To determine the number of cells in each spheroid over time, 12 spheroids per experiment were pooled and dissociated with 2 mg/mL collagenase 1A (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), 10 min at 37 °C, with agitation every two minutes, and then counted by the trypan blue exclusion assay.

2.3. Time-lapse video

Automatic acquisitions were performed on a Nikon Eclipse TI-S microscope, coupled to a DS Qi2 camera (Nikon). The system includes a cage incubator (Okolab, Pozzuoli, NA,

Italy) controlling temperature and level of CO2. Analyses were performed using both NIS Element BR (Nikon) and Fiji/ImageJ softwares.

2.4. Scanning electron microscopy

Spheroids were fixed by incubation for 24 h in 4 % paraformaldehyde, 1 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). Samples were then washed in phosphate-buffered saline (PBS) and post-fixed by incubation with 2 % osmium tetroxide for 1 h. Spheroids were then fully dehydrated in a graded series of ethanol solutions, and dried in hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich). Finally, samples were coated with 40 Å platinum, using a PECS 682 apparatus (Gatan, Evry, France), before observation under an Ultra plus FEG-SEM scanning electron microscope (Zeiss, Marly-le-Roi, France).

2.5. Transmission electron microscopy

Spheroids were fixed by incubation for 24 h in 4 % paraformaldehyde, 1 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2). Samples were then washed in phosphate-buffered saline (PBS) and post-fixed by incubation with 2 % osmium tetroxide for 1 h. Spheroids were then fully dehydrated in a graded series of ethanol solutions and propylene oxide. Impregnation step was performed with a mixture of (1:1) propylene oxide/Epon resin, and then left overnight in pure resin. Samples were then embedded in Epon resin, which was allowed to polymerize for 48 h at 60 °C. Ultra-thin sections (90 nm) were obtained with an EM UC7 ultramicrotome (Leica). Sections were stained with 5 % uranyl acetate (Agar Scientific, Stansted, United Kingdom), 5 % lead citrate (Sigma-Aldrich) and observations were made with a transmission electron microscope (Jeol, JEM 1011, Croissy-sur-Seine, France).

2.6. Immunohistochemistry

At least five spheroids per conditions were pooled, fixed in formalin, embedded in paraffin and cut in 3-4 µm sections on Superfrost Plus slides. Slides were deparaffinized, rehydrated and heated in citrate buffer pH 6 for antigenic retrieval. After blocking for endogenous peroxidase with 3 % hydrogen peroxide, the primary antibodies were incubated. The panel of primary antibody included anti-HIF-1α (Abcam ab51608, Paris, France) (dilution 1/200, incubation 1 h), VEGF-A (Abcam ab1316, dilution 1/200, incubation 1 h), HO-1 (Abcam ab52947, dilution 1/1 000, incubation 1 h), CA-IX (Novocastra clone TH22, Nanterre, France) (dilution 1/100, incubation 20 min), and Ki-67 (DakoCytomation clone 39-9, Glostrup,

Denmark) (dilution 1/50, incubation 30 min). Immunohistochemistry was performed with either the automated BenchMark XT slide stainer (Ventana Medical System Inc.) using OptiView Detection Kit (Ventana Medical System Inc.) (for CA-IX and Ki-67), or manually using the streptavidin-biotin-peroxidase method with diaminobenzidine as the chromogen (Kit LSAB, DakoCytomation). Slides were finally counterstained with haematoxylin. Negative controls were obtained after omission of the primary antibody or incubation with a non-specific antibody.

2.7. Quantitative real-time PCR

Total RNAs were extracted using TRIzol reagent (15596-026, Life Technologies) and reverse transcription was performed with the SuperScriptTM VILOTM cDNA Synthesis Kit (11754-050, Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France), both according to the manufacturer's procedures. qRT-PCR was performed on a LightCycler® 480 (Roche, Switzerland) with the LightCycler® 480 Probes Master (04887301001, Roche). *GAPDH*, *ACTB*, *RPL13A* and *EF1A* genes were used as endogenous genes for normalization. Primer sequences (Supplementary Table 1) were designed with the ProbeFinder software (Roche), and all reactions were run in triplicate.

2.8. Cell cycle analysis

Spheroids were dissociated with 2 mg/mL collagenase 1A (Sigma-Aldrich), 10 min, at 37 °C, with agitation every two minutes. Cells were fixed with 2 % paraformaldehyde/0.03 % saponin for 15 min at room temperature (RT), and washed three times for 5 min with 10 % FBS/0.03 % saponin. Cells were then stained with 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, Sigma-Aldrich) and an AF488-conjugated anti-KI-67 antibody (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) or the AF488-conjugated IgG_1 isotype control (BD Biosciences). Experiments were performed on Accuri^{TM} C6 flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed with the FlowJo V10.4.1 software (Tree Star Inc.).

2.9. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software. The Mann-Whitney test was used to compare two conditions and Kruskal-Wallis for multiple comparisons, followed by a Dunn's *post hoc* test. The threshold for significance was set up to a p-value of 0.05.

3. Results

3.1. Establishment of hMSC-derived spheroids by cell aggregation method

Among different methods to form MSC-spheroids, we followed an approach based on cell aggregation in methylcellulose-based medium (Saleh et al., 2012) (Fig. 1A). To establish a protocol that is simple, reproducible and compatible with hematopoietic cell culture, two commercial methylcelluloses commonly used for hematopoietic cell assays were tested. In general, a range from 0.01 to 1 % of methylcellulose was used (Matak et al., 2017; Pennock et al., 2015; Saleh et al., 2012, 2011; Shearier et al., 2016), so we tested three different concentrations (0.25, 0.5 and 1 %). We also tested a hanging drop technique (Foty, 2011; Matak et al., 2017; Schmal et al., 2015; Shearier et al., 2016) and the previously described U-bottomed 96-well plates methods (Blocki et al., 2013; Matak et al., 2017; Pennock et al., 2015; Saleh et al., 2012, 2011). Both techniques worked well for primary hMSCs but the second was more appropriated for further analyses and offered lesser dehydration (data not shown). The SF H4236 methylcellulose at a concentration of 0.5 % was adopted because it generated one spheroid per well with lower condensation aspect for primary hMSCs (Fig. 1B). Under these culture conditions, hMSCs were able to form spheroids rapidly, in as little as five hours of culture (Supp. Video 1), which is consistent with previous studies (Pennock et al., 2015; Redondo-Castro et al., 2018; Saleh et al., 2012).

3.2. Formation of spheroids from MSC cell lines

The spheroid-forming capacity was followed for two human cell lines, HS-27a and HS-5, and compared to that of hMSCs. These cell lines have been obtained by immortalization of hMSCs with the papilloma virus E6/E7 genes (Roecklein and Torok-Storb, 1995; Torok-Storb et al., 1999). HS-27a cells support hematopoietic stem cell maintenance (self-renewal, formation of cobblestone areas), whereas HS-5 cells mainly sustain proliferation and differentiation (Torok-Storb et al., 1999; Iwata, Sandstrom, Delrow, Stamatoyannopoulos, & Torok-Storb, 2014). Unlike hMSCs, they retained the ability to form spheres but required about 10 hours to make rounded spheroids (Supp. Video 2 and 3). Although MSCs of various origins formed spheroids of equivalent sizes (about 300 µm of diameter) after 24 hours, hMSCs-derived spheroids rapidly condensed and reached half of their initial perimeter after 14 days of culture (Fig. 2A and B). In contrast to hMSCs, the perimeter of spheroids resulting from both cell lines remained constant during three weeks. Knowing that hMSCs and cell lines may differ

in their growth properties, we used the murine MS-5 cell line that has contact inhibition (Itoh et al., 1989). This cell line was able to quickly form spheroids similarly to the other cell lines (Supp. Video 4). It is noteworthy that MS-5 cells initially formed a flat multilayer disk of cells prior to contracting into spheres. Similarly to the spheroids derived from human cell lines, spheroids from MS-5 cells kept the same size over time (Supp. Fig. 1A and B). This suggests that shrinking might be an intrinsic property or extracellular matrix (ECM) composition of primary cells rather than related to cell proliferation control. We thus examined whether the difference in the size maintenance between various MSCs might be attributed to the cell number per spheroid. In order to quantify the viable cells, spheroids were dissociated at different timepoints after seeding. In accordance with the decrease in circumference, the number of cells per spheroid for hMSCs dramatically dropped within seven days (Fig. 2C), which was in agreement with other studies (Schmal et al., 2015; Shearier et al., 2016). Remarkably, although keeping the same size, HS-27a-derived spheroids, as well as the MS-5 ones, had lost viable cells similarly to hMSCs (Fig. 2C and Supp. Fig 1C). In contrast, HS-5-derived spheroids had less obvious decrease in cell number with time (Fig. 2C). Overall, the size reduction does not seem to be strictly attributable to reduced cell number in spheroids and could be possibly attributed to other factors such as the ECM composition.

3.3. Electron microscopy observation of the MSCs-derived spheroids

Scanning electron microscopy (SEM) confirmed the shrinking of hMSC-derived spheroids (Fig. 3A and Supp. Fig. 1D). SEM also revealed at higher magnification that spheroids from hMSCs are highly cohesive, showing tight intercellular connections forming a flat surface, whereas HS-27a, HS-5 and MS-5 spheroids exhibited more rounded cells at their surface (Fig. 3B and Supp. Fig. 1E). This phenomenon intensified over the time and, in line with the assumption that ECM composition is different, may explain the size reduction of hMSC-derived spheroids compared to the cell lines. From day 7 for cell lines and day 14 for primaries, spheroid structure began to change, suggesting a progressive cell death. Further analysis by transmission electron microscopy (TEM) to investigate the ultrastructure of the cells within the spheroids showed the appearance of a progressive cell injury, thus confirming induced cell death (Fig. 3C and Supp. Fig. 1F).

3.4. Cell death and proliferation analyses of the MSCs-derived spheroids

To explain why spheroids had decreased cell number over time, we proposed an imbalance between cell death and cell proliferation. Thus, apoptosis and cell cycle were measured by flow cytometry using 7-AAD/Ki-67 staining (Fig. 4A). First, increasing sub-G_0/G_1 cell population revealed a strong induction of cell death after 14 days in spheroids obtained with hMSCs, while a more moderate cell death was observed after seven days for the two human cell lines (Fig. 4B). Although harvested at the same confluency, primary cells appeared already much more quiescent than HS-27a or HS-5 cells at day 0 (Fig. 4C). Then, a significant proportion of cells remained proliferating in spheroids until day 3 for HS-27a and day 7 for HS-5 cells. Remarkably, while closer to HS-27a cells in terms of perimeter and number of cells, MS-5 cells had a massive increase in cell death and almost no proliferation (Supp. Fig. 1G and H). This suggests that, based on proliferation and cell death, the MS-5 cell line is more similar to primary cells than others, probably due to their contact inhibition, which limits their proliferation capacity. Ki-67 detection by immunochemistry, in hMSCs and human cell lines, revealed homogeneous staining at day 1 indicating proliferation in the whole spheroid (Fig. 4D) in agreement with a previous study (Li et al., 2015). It also confirmed a lower proliferation rate of hMSCs compared to cell lines and a rapid proliferation arrest with only few Ki-67-positive cells remaining at the periphery of the spheroid at day 3. A progressive decrease in the proliferation for the two human cell lines supported the results obtained by flow cytometry. Interestingly, decreased proliferation appears in the entire spheroid and is not restricted to in-depth localizations. These data showed that spheroids are characterized by imbalance between cell death and proliferation, which may explain the highest loss of cells over time.

3.5. Hypoxia and oxidative stress in MSCs-derived spheroids

Like in tumor spheres (Leek et al., 2016; Riffle and Hegde, 2017), the appearance of an oxygen gradient and hypoxia in MSCs-derived spheroids (Sharma et al., 2012) has been demonstrated. Carbonic anhydrase IX (CA-IX), a mediator of hypoxia-induced stress response, is commonly used as marker in tumors (McDonald and Dedhar, 2014). Increased CA-IX has been observed in MSCs-derived spheroids, particularly in HS-27a cells (Fig. 5A). The pro-survival adaptation to hypoxia occurs mainly through the stabilization of the hypoxia-inducible factors (HIFs). HIFs are key regulators of multiple cell processes, including cell cycle, metabolism, pH control and autophagy. Increasing expression of HIF-1α protein expression has been observed in spheroids over the time, as well as at the mRNA level mainly in hMSCs (Fig.

5B). Finally, we examined the expression of *VEGFA*, a standard HIF transcriptionally regulated gene (Zhang and Sadek, 2014). Its expression in hMSCs- and HS-27a-derived spheroids was already elevated at day 1, but strongly increased at both protein and mRNA levels over time (Fig. 5C).

In certain circumstances, very low level of oxygen (anoxia) or long exposure to hypoxia may provoke DNA damage and oxidative stress that trigger apoptosis (Riffle and Hegde, 2017). Besides hypoxia appearance in spheroids, cell aggregation may also stress the cells by itself and increase reactive oxygen species (ROS). Heme oxygenase 1 (HO-1) is induced by a variety of stressors, and is therefore a marker of hypoxia and oxidative stress (Dunn et al., 2014). Indeed, oxidative stress triggers nuclear relocation of NRF-2, a HO-1 transcription factor, which then leads to antioxidant response through induced expression of antioxidants by HO-1. In the spheroids, we observed a high expression of HO-1 at day 1, which increased over time (Fig. 6A). Conversely, among the 24 antioxidant genes (Patent WO2016083742), we found a total of seven genes upregulated in spheroids from the hMSCs and the HS-27a cell line (Fig. 6B). Remarkably, of these genes, four (*GPX1*, *PRDX2*, *SOD1* and *SOD2*) were commonly upregulated in both cell types irrespective of their initial expression level.

Together, these data indicate concomitant appearance of hypoxia and oxidative stress in established MSCs-derived spheroids, which could therefore explain initial cell cycle arrest and further apoptosis in prolonged hypoxia (Riffle et al., 2017).

3.6. Stemness in MSCs-derived spheroids

The 2D culture of MSCs critically leads to rapid loss of their pluripotency and supportive functions. In contrast, MSCs-derived spheroids have the potential to maintain stemness that could be demonstrated by the expression of three classical embryonic markers, OCT-4, SOX-2 and NANOG (Pennock et al., 2015). Furthermore, it has been described that hypoxia transcriptionally regulates these factors in a HIFs-dependent manner (Drela et al., 2014). Therefore, in order to validate whether HS-27a behave similarly to hMSCs, we examined the expression of the genes coding for the three factors, over time. Results showed that hMSCs formation was accompanied by upregulation of *OCT4* and *SOX2*, in agreement with previous studies, but surprisingly showed no upregulation of *NANOG* (Fig. 7A). HS-27a had similar expression level of the three genes to hMSCs in 2D culture and had progressive increased

expression of all three markers (Fig. 7B). These data confirmed that, like hMSCs, HS-27a had preserved a stemness capacity that could also be (re)activated during spheroid formation.

4. Discussion

In the last decade, studies have shown that MSC spheroids could be a promising model for *in vitro* culture. Indeed, some have demonstrated their benefits in studying cardiac ischemia (Ceccaldi et al., 2014), cerebral ischemia (Guo et al., 2013), hindlimb ischemia (Bhang et al., 2012) or bone repair (Yamaguchi et al., 2014). In addition, spheroids may be a good model to study the interaction of normal (De Barros et al., 2010; Futrega et al., 2017; Isern et al., 2013; Leisten et al., 2012; Wuchter et al., 2016) or malignant hematopoietic cells (Aljitawi et al., 2014; Bruce et al., 2015) with their microenvironment. For instance, spheroids could be used to study the mechanisms triggering chemoresistance in leukemias (Aljitawi et al., 2014; Bruce et al., 2015). However, studies might be limited by the availability of primary human MSCs and the reproducibility due to the different sources, while 2D co-cultures have been for a long time established with cell lines, mostly murine, such as MS-5 or M2-10B4 (Vaidya and Kale, 2015). In this study, we chose the HS-27a and HS-5 cell lines for their human origin and their capacity to sustain hematopoiesis in co-culture (Roecklein & Torok-Storb, 1995). Nonetheless, in contrast to the murine MS-5 cell line, they do not retain contact inhibition that certainly, although of human origin, have limited their use for long-term culture. We found that both human and murine cell lines, independently of their contact inhibition capacity, were able to provide quick and reproducible spheroids using standard methylcellulose, similarly to hMSCs, with the advantage of keeping the same size over time. The delay to achieve a complete spheroid, 5 h *versus* 10 h for hMSCs and cell lines, respectively, could certainly be attributed to sedimentation speed. In fact, cell lines are much smaller than primaries that could hence sediment faster. On the other hand, this phenomenon might also be attributed to spheroid condensation that could depend on ECM composition. Indeed, hMSCs-derived spheroids appeared more cohesive by SEM.

ECM may also explain, at least partially, shrinking of hMSC-derived spheroids. Shrinking has been previously reported for hMSCs (Bellotti et al., 2016; Kim et al., 2018; Pennock et al., 2015; Redondo-Castro et al., 2018; Schmal et al., 2015; Shearier et al., 2016; Tsai et al., 2015) and has been attributed to induced autophagy (Pennock et al., 2015).

Therefore, we could hypothesize that transformed cell lines may have lower autophagy, which is often induced in reduced or arrest cell growth (Neufeld, 2012). Indeed, HS-27a and HS-5 cell lines continue to proliferate until 7 days, unlike hMSCs, and could block autophagy and compensate cell death. However, the number of viable HS-27a decreased over time and no apoptosis has been detected for any of the MSCs before seven days, which could not explain the loss of cells. In agreement, other studies have also demonstrated an induction of apoptosis only after several days (Schmal et al., 2015; Tsai et al., 2015), but not at short term (Ho et al., 2018).

Studies have already reported oxygen gradients in tumor-spheres (Leek et al., 2016; Riffle and Hegde, 2017) as well as in MSCs-derived spheroids (Sharma et al., 2012). The hypoxia response mainly happens through the stabilization of hypoxia-inducible factors (HIFs), which are regulators of multiple biological processes, such as angiogenesis or energetic metabolism. HIFs have an essential pro-survival role by promoting genes, such as those involved in metabolism and autophagy (Zhang and Sadek, 2014). However, acute and prolonged hypoxia may also trigger cell death through blocking DNA replication and induced oxidative stress (Riffle and Hegde, 2017). Interestingly, cell lines showed increased hypoxia markers over time, and concomitant decreased cell cycle prior induced apoptosis. This is consistent with induced oxidative stress revealed by increased expression of HO-1 and antioxidant response.

5. Conclusions

Overall these data indicate that, like hMSCs, MSC cell lines make reproductible and easily handled spheroids. Remarkably, the HS-27a cell line more closely resemble primary cells than the HS-5 line. This is of a particular interest, since HS-27a has been shown to provide better support to HSCs (Iwata et al., 2014; Roecklein & Torok-Storb, 1995; Torok-Storb et al., 1999, unpublished data). Thus, this model could help in understanding mechanisms involved in MSC physiology and may be a simple model to study cell interactions in the hematopoietic niche. The model could also be extended to research metastatic process as previously described for breast cancer (Cavnar et al., 2015).

Author contributions

MD, NS, FM designed research studies. MD, NS, ED, HD, RG, JBG, LB acquired the data. MD, NS, and FM assembled the data. MD, NS, PR, GF, FM analyzed and interpreted the data. FM supervised the work. LRN, OH, JD provided MSC samples. MD, NS, and FM wrote the manuscript. The manuscript was reviewed, edited and approved by all authors.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Ministry of Research (MD), the ARC Foundation (MD, HD), the French Society of Hematology (MD), the "Ligue contre le Cancer (NS)", and the Lebanese south governate (HD) for their funding. This work was supported by the French Committees of the "Ligue Contre le Cancer Grand-Ouest" [16 (Charente), 36 (Indre), 37 (Indre-et-Loire), 41 (Loire et Cher), and 86 (Vendée)] and the Région Centre Val de Loire (FM).

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Aljitawi, O.S., Li, D., Xiao, Y., Zhang, D., Ramachandran, K., Stehno-Bittel, L., Van Veldhuizen, P., Lin, T.L., Kambhampati, S., Garimella, R., 2014. A novel three-dimensional stromal-based model for in vitro chemotherapy sensitivity testing of leukemia cells. Leuk. Lymphoma 55, 378-91. doi:10.3109/10428194.2013.793323

Baraniak, P.R., McDevitt, T.C., 2012. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. Cell Tissue Res. 347, 701-711. doi:10.1007/s00441-011-1215-5

Bellotti, C., Duchi, S., Bevilacqua, A., Lucarelli, E., Piccinini, F., 2016. Long term morphological characterization of mesenchymal stromal cells 3D spheroids built with a rapid method based on entry-level equipment. Cytotechnology 1-12. doi:10.1007/s10616-016-9969-y

Bhang, S.H., Lee, S., Shin, J.-Y., Lee, T.-J., Kim, B.-S., 2012. Transplantation of Cord Blood Mesenchymal Stem Cells as Spheroids Enhances Vascularization. Tissue Eng. Part A 18, 2138-2147. doi:10.1089/ten.tea.2011.0640

Blocki, A., Wang, Y., Koch, M., Peh, P., Beyer, S., Law, P., Hui, J., Raghunath, M., 2013. Not All MSCs Can Act as Pericytes : Functional In Vitro Assays to Distinguish Pericytes from Other Mesenchymal Stem Cells in Angiogenesis. Stem Cells Dev. 22, 2347-2355. doi:10.1089/scd.2012.0415

Bruce, A., Evans, R., Mezan, R., Shi, L., Moses, B.S., Martin, K.H., Gibson, L.F., Yang, Y., 2015. Three-dimensional microfluidic tri-culture model of the bone marrow microenvironment for study of acute lymphoblastic leukemia. PLoS One 10, 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0140506

Cavnar, S.P., Rickelmann, A.D., Meguiar, K.F., Xiao, A., Dosch, J., Leung, B.M., Cai Lesher-Perez, S., Chitta, S., Luker, K.E., Takayama, S., Luker, G.D., 2015. Modeling Selective Elimination of Quiescent Cancer Cells from Bone Marrow. Neoplasia 17, 625-633. doi:10.1016/j.neo.2015.08.001

Ceccaldi, C., Bushkalova, R., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Bourin, P., Frugier, C., Rouzaud-Laborde, C., Cussac, D., Parini, A., Sallerin, B., Fullana, S.G., 2014. Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. Acta Biomater. 10, 901-911. doi:10.1016/j.actbio.2013.10.027

Cesarz, Z., Tamama, K., 2016. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Int. 2016, 1-11. doi:10.1155/2016/9176357

De Barros, A.P.D.N., Takiya, C.M., Garzoni, L.R., Leal-Ferreira, M.L., Dutra, H.S., Chiarini, L.B., Meirelles, M.N., Borojevic, R., Rossi, M.I.D., 2010. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model. PLoS One 5, e9093. doi:10.1371/journal.pone.0009093

Dhami, S.P.S., Kappala, S.S., Thompson, A., Szegezdi, E., 2016. Three-dimensional ex vivo co-culture models of the leukaemic bone marrow niche for functional drug testing. Drug Discov. Today 21, 1464-1471. doi:10.1016/j.drudis.2016.04.019

Domenech, J., 2017. What Are Mesenchymal Stromal Cells? Origin and Discovery of Mesenchymal Stromal Cells, in: Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators. pp. 1-37. doi:10.1016/B978-0-12-803102-5.00001-X

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8, 315-7. doi:10.1080/14653240600855905

Drela, K., Sarnowska, A., Siedlecka, P., Szablowska-Gadomska, I., Wielgos, M., Jurga, M., Lukomska, B., Domanska-Janik, K., 2014. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. Cytotherapy 16, 881-892. doi:10.1016/j.jcyt.2014.02.009

Dunn, L.L., Midwinter, R.G., Ni, J., Hamid, H.A., Parish, C.R., Stocker, R., 2014. New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. Antioxidants Redox Signal. 20, 1723-1742. doi:10.1089/ars.2013.5675

Egger, D., Tripisciano, C., Weber, V., Dominici, M., Kasper, C., 2018. Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. Bioengineering 5, 1-15. doi:10.3390/bioengineering5020048

Foty, R., 2011. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. J. Vis. Exp. 20, 1-4. doi:10.3791/2720

Futrega, K., Atkinson, K., Lott, W.B., Doran, M.R., 2017. Spheroid Coculture of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells and Monolayer Expanded Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Polydimethylsiloxane Microwells Modestly Improves In Vitro Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Expansion. Tissue Eng. Part C Methods 23, 200-218. doi:10.1089/ten.tec.2016.0329

Ghazanfari, R., Li, H., Zacharaki, D., Lim, H.C., Scheding, S., 2016. Human Non-Hematopoietic CD271pos/CD140alow/neg Bone Marrow Stroma Cells Fulfill Stringent Stem Cell Criteria in Serial Transplantations. Stem Cells Dev. 25, 1652-1658. doi:10.1089/scd.2016.0169

Guo, L., Ge, J., Zhou, Y., Wang, S., Zhao, R.C.H., Wu, Y., 2013. Three-Dimensional Spheroid-Cultured Mesenchymal Stem Cells Devoid of Embolism Attenuate Brain Stroke Injury After Intra-Arterial Injection. Stem Cells Dev. 23, 978-989. doi:10.1089/scd.2013.0338

Ho, S.S., Hung, B.P., Heyrani, N., Lee, M.A., Leach, J.K., 2018. Hypoxic Preconditioning of Mesenchymal Stem Cells with Subsequent Spheroid Formation Accelerates Repair of Segmental Bone Defects. Stem Cells 36, 1393-403. doi:10.1002/stem.2853

Hong, S.H., Gang, E.J., Jeong, J.A., Ahn, C., Hwang, S.H., Yang, I.H., Park, H.K., Han, H., Kim, H., 2005. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived

mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 330, 1153-1161. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.086

Isern, J., Martín-Antonio, B., Ghazanfari, R., Martín, A.M., López, J.A., DelToro, R., Sánchez-Aguilera, A., Arranz, L., Martín-Pérez, D., Suárez-Lledó, M., Marín, P., VanPel, M., Fibbe, W.E., Vázquez, J., Scheding, S., Urbano-Ispizúa, Á., Méndez-Ferrer, S., 2013. Self-Renewing Human Bone Marrow Mesenspheres Promote Hematopoietic Stem Cell Expansion. Cell Rep. 3, 1714-1724. doi:10.1016/j.celrep.2013.03.041

Itoh, K., Tezuka, H., Sakoda, H., Konno, M., Nagata, K., Uchiyama, T., Uchino, H., Mori, K., 1989. Reproducible establishment of hemopoetic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. Exp Hematol 17, 145-53.

Iwata, M., Sandstrom, R.S., Delrow, J.J., Stamatoyannopoulos, J.A., Torok-Storb, B., 2014. Functionally and phenotypically distinct subpopulations of marrow stromal cells are fibroblast in origin and induce different fates in peripheral blood monocytes. Stem Cells Dev. 23, 729-740. doi:10.1089/scd.2013.0300

Kim, M., Yun, H., Young, D., Byung, P., Choi, H., 2018. Three-Dimensional Spheroid Culture Increases Exosome Secretion from Mesenchymal Stem Cells. Tissue Eng. Regen. Med. 15, 427-436. doi:10.1007/s13770-018-0139-5

Leek, R., Grimes, D.R., Harris, A.L., McIntyre, A., 2016. Methods: Using Three-Dimensional Culture (Spheroids) as an In Vitro Model of Tumour Hypoxia, in: Tumor Microenvironment. pp. 167-196. doi:10.1007/978-3-319-26666-4

Leisten, I., Kramann, R., Ventura Ferreira, M.S., Bovi, M., Neuss, S., Ziegler, P., Wagner, W., Knüchel, R., Schneider, R.K., 2012. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. Biomaterials 33, 1736-1747. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.11.034

Li, Y., Guo, G., Li, L., Chen, F., Bao, J., Shi, Y. jun, Bu, H., 2015. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. Cell Tissue Res. 360, 297-307. doi:10.1007/s00441-014-2055-x

Lin, R.Z., Chang, H.Y., 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnol. J. 3, 1172-1184. doi:10.1002/biot.200700228

Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A., Ogawa, S., 1999. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. J Clin Invest 103, 697-705. doi:10.1172/JCI5298

Matak, D., Brodaczewska, K.K., Lipiec, M., Szymanski, Ł., Szczylik, C., Czarnecka, A.M., 2017. Colony, hanging drop, and methylcellulose three-dimensional hypoxic growth optimization of renal cell carcinoma cell lines. Cytotechnology 69, 565-578. doi:10.1007/s10616-016-0063-2

McDonald, P.C., Dedhar, S., 2014. Carbonic anhydrase IX (CAIX) as a mediator of hypoxia-induced stress response in cancer cells, in: SubCellular Biochemistry. pp. 255-269. doi:10.1007/978-94-007-7359-2_13

Neufeld, T.P., 2012. Autophagy and cell growth - the yin and yang of nutrient responses. J. Cell Sci. 125, 2359-2368. doi:10.1242/jcs.103333

Ong, S.M., Zhang, C., Toh, Y.C., Kim, S.H., Foo, H.L., Tan, C.H., van Noort, D., Park, S., Yu, H., 2008. A gel-free 3D microfluidic cell culture system. Biomaterials 29, 3237-3244. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.022

Pennock, R., Bray, E., Pryor, P., James, S., McKeegan, P., Sturmey, R., Genever, P., 2015. Human cell dedifferentiation in mesenchymal condensates through controlled autophagy. Sci. Rep. 5, 13113. doi:10.1038/srep13113

Perez, J.R., Kouroupis, D., Li, D.J., Best, T.M., Kaplan, L., Correa, D., 2018. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. Front. Bioeng. Biotechnol. 6, 1-23. doi:10.3389/fbioe.2018.00105

Pinho, S., Frenette, P.S., 2019. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 20, 303-320. doi:10.1038/s41580-019-0103-9

Redondo-Castro, E., Cunningham, C.J., Miller, J., Cain, S., Allan, S.M., Pinteaux, E., 2018. Generation of Human Mesenchymal Stem Cell 3D Spheroids Using Low-binding Plates. Bio Protoc 8, 1-13. doi:10.21769/bioprotoc.2968

Riffle, S., Hegde, R.S., 2017. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. J. Exp. Clin. Cancer Res. 36, 1-10. doi:10.1186/s13046-017-0570-9

Riffle, S., Pandey, R.N., Albert, M., Hegde, R.S., 2017. Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. BMC Cancer 17, 1-12. doi:10.1186/s12885-017-3319-0

Roecklein, B.A., Torok-Storb, B., 1995. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. Blood 85, 997-1005.

Saleh, F.A., Frith, J.E., Lee, J.A., Genever, P.G., 2012. Three-Dimensional In Vitro Culture Techniques for Mesenchymal Stem Cells, in: Progenitor Cells: Methods and Protocols. pp. 31-45. doi:10.1007/978-1-61779-980-8

Saleh, F.A., Whyte, M., Genever, P.G., 2011. Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model. Eur. Cells Mater. 22, 242-257. doi:10.22203/eCM.v022a19

Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R., Sanberg, P.R., 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp. Neurol. 164, 247-256. doi:10.1006/exnr.2000.7389

Sart, S., Tsai, A.-C., Li, Y., Ma, T., 2014. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. Tissue Eng. Part B. Rev. 20, 365-380. doi:10.1089/ten.TEB.2013.0537

Schmal, O., Seifert, J., Schäffer, T., Walter, C.B., Aicher, W.K., Klein, G., 2015. Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion in Contact with Mesenchymal Stromal Cells in a

Hanging Drop Model Uncovers Disadvantages of 3D. Stem Cells Int. 2016, 2016:4148093. doi:10.1155/2016/4148093

Sharma, M.B., Limaye, L.S., Kale, V.P., 2012. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: Recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. Haematologica 97, 651-660. doi:10.3324/haematol.2011.050500

Shearier, E., Xing, Q., Qian, Z., Zhao, F., 2016. Physiologically Low Oxygen Enhances Biomolecule Production and Stemness of Mesenchymal Stem Cell Spheroids. Tissue Eng. Part C 22, 360-369. doi:10.1089/ten.tec.2015.0465

Spees, J.L., Olson, S.D., Ylostalo, J., Lynch, P.J., Smith, J., Perry, A., Peister, A., Wang, M.Y., Prockop, D.J., 2003. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 2397-2402. doi:10.1073/pnas.0437997100

Su, P., Tian, Y., Yang, C., Ma, X., Wang, X., Pei, J., Qian, A., 2018. Mesenchymal stem cell migration during bone formation and bone diseases therapy. Int. J. Mol. Sci. 19, E2343. doi:10.3390/ijms19082343

Torok-Storb, B., Iwata, M., Graf, L., Gianotti, J., Horton, H., Byrne, M.C., 1999. Dissecting the marrow microenvironment, in: Annals of the New York Academy of Sciences. pp. 164-170. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08461.x

Tsai, A.-C., Liu, Y., Yuan, X., Ma, T., 2015. Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. Tissue Eng. Part A 21, 1705-1719. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0314

Vaidya, A., Kale, V., 2015. Hematopoietic stem cells, their niche, and the concept of co-culture systems: A critical review. J. Stem Cells 10, 13-31.

Wuchter, P., Saffrich, R., Giselbrecht, S., Nies, C., Lorig, H., Kolb, S., Ho, A.D., Gottwald, E., 2016. Microcavity arrays as an in vitro model system of the bone marrow niche for hematopoietic stem cells. Cell Tissue Res. 364, 573-584. doi:10.1007/s00441-015-2348-8

Yamaguchi, Y., Ohno, J., Sato, A., Kido, H., Fukushima, T., 2014. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. BMC Biotechnol. 14, 1-10. doi:10.1186/s12896-014-0105-9

Yan, L., Zheng, D., Xu, R.H., 2018. Critical role of tumor necrosis factor signaling in mesenchymal stem cell-based therapy for autoimmune and inflammatory diseases. Front. Immunol. 9, 1658. doi:10.3389/fimmu.2018.01658

Zhang, C.C., Sadek, H.A., 2014. Hypoxia and Metabolic Properties of Hematopoietic Stem Cells. Antioxid. Redox Signal. 20, 1891-1901. doi:10.1089/ars.2012.5019

Figure legends

Figure 1. Spheroids formation from hMSCs. (A) Schematic representation of experimental plan. (B) 30,000 hMSCs per well were seeded into U-bottomed 96-well in medium containing 0.25 %, 0.5 % or 1 % of methylcellulose (Methocult^{TM} H4100 or SF H4236). Microscopy analysis was performed after 24 h (scale bars = 500 µm).

Figure 2. Follow up of the spheroids derived from various MSCs. (A) Microscopy analysis of hMSCs-, HS-27a- and HS-5-derived spheroids over 21 days in culture (scale bars = 100 µm). (B) Perimeter was measured with an arbitrary unit; each experiment is the mean of at least 10 spheroids from n = 3 experiments. Data are mean ± SD; * compared to day 1; * $p \leq 0.01$. (C) Number of living cells per spheroids over 21 days in culture (hMCSs n = 3; HS-27a and HS-5 n = 4; each experiment is the mean of 12 spheroids).

Figure 3. Electron microscopy observation of MSCs-derived spheroids. (A, B) Scanning electron microscopy (SEM) and (C) transmission electronic microscopy (TEM) analysis of spheroids derived from hMSCs, HS-27a and HS-5 cells, over 14 days (scale bars = 100 µm (A), 20 µm (B and C)).

Figure 4. Determination of proliferation and apoptosis of MSCs-derived spheroids. (A-C) Cell cycle analysis of spheroids over 21 days in culture. (A) Representative gating strategy from hMSCs at day 0, (B) sub-G_1 apoptosis quantification (hMSCs n = 6; HS-27a and HS-5 n = 3) and (C) cell cycle quantification (hMSCs n = 6; HS-27a and HS-5 n = 5; * for G_0; ǂ for G_1; # for S/G_2/M) (data are mean ± SD; */ǂ/# compared to day 0; */ǂ $p \leq 0.05$; **/ǂǂ/## $p \leq 0.01$). (D) Immunohistochemistry of Ki-67 at days 1, 3 and 7 for hMSCs-, HS-27a- and HS-5-derived spheroids (scale bars = 100 µm). Arrows indicate Ki-67-positive cells.

Figure 5. Hypoxia detection of hMSCs- and HS-27a-derived spheroids over 7 days in culture. (A) Immunohistochemistry of CA-IX. (B) Immunohistochemistry and mRNA of HIF-1α. (X) Immunohistochemistry and mRNA expression of VEGF-A (hMSCs n = 5; HS-27a n = 3; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; scale bars = 100 µm).

Figure 6. Oxidative stress detection of hMSCs- and HS-27a-derived spheroids over 7 days in culture. (A) Immunohistochemistry of HO-1 (scale bars = 100 µm). (B) Expression of antioxidant genes (n = 3; data are mean; * compared to 2D control (CTL); * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Figure 7. Stemness detection of hMSCs- and HS-27a-derived spheroids over 7 days in culture. (A and B) Gene expression of *OCT4*, *NANOG* and *SOX2* for (A) hMSCs- and (B) HS-27a-derived spheroids (hMSCs n = 5; HS-27a n = 3; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

Figure 1

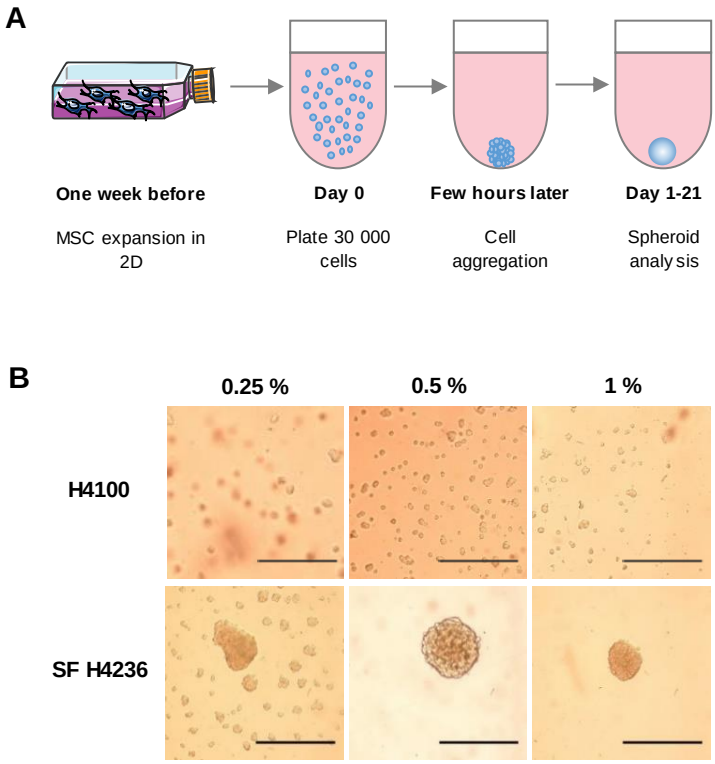

A
One week before
MSC expansion in 2D
Day 0
Plate 30 000 cells
Few hours later
Cell aggregation
Day 1-21
Spheroid analysis
B
0.25 %
0.5 %
1 %
H4100
SF H4236

Figure 2

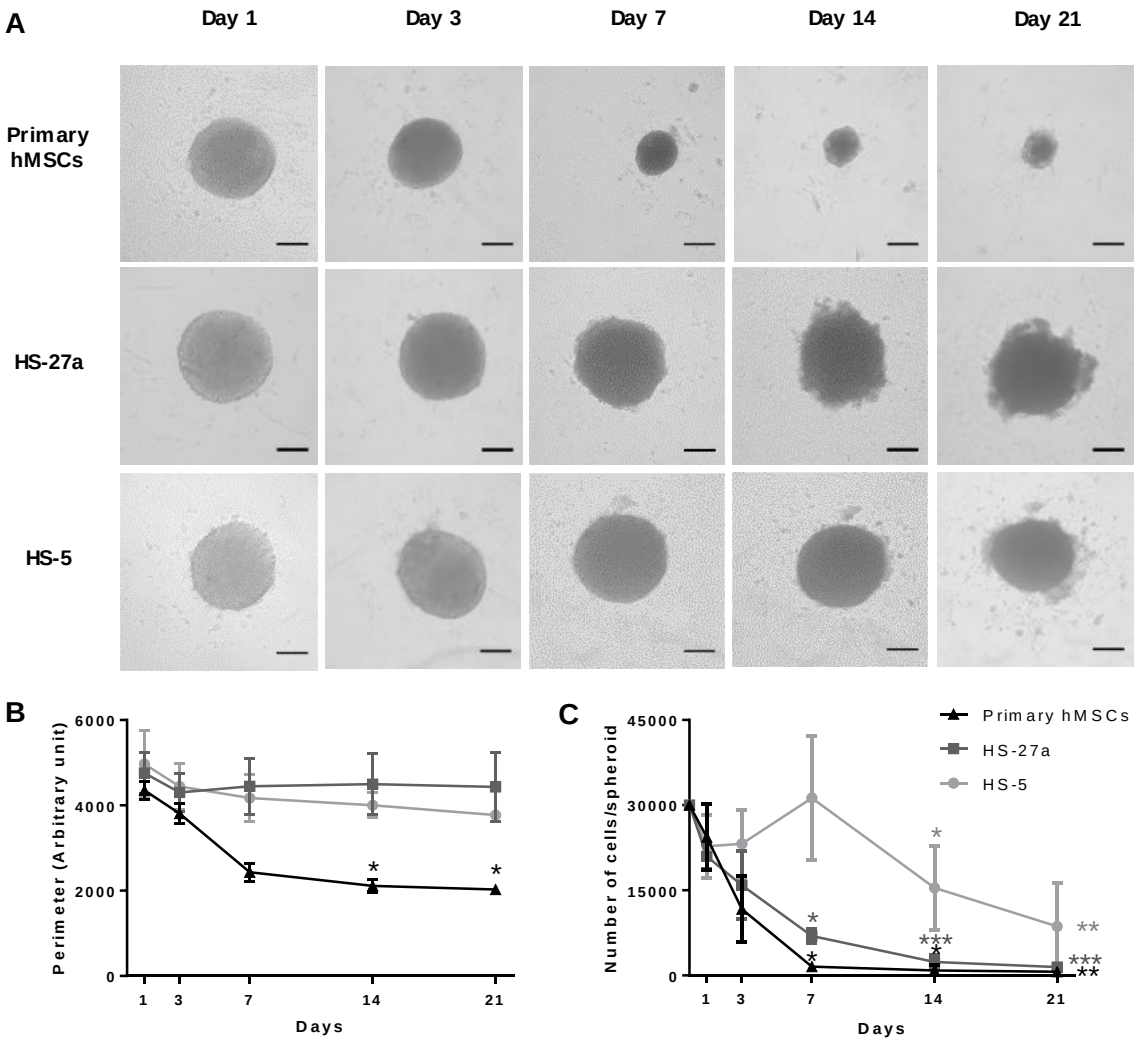

A
Day 1
Day 3
Day 7
Day 14
Day 21
Primary hMSCs
HS-27a
HS-5
B
Perimeter (Arbitrary unit)
6000
4000
2000
0
1
3
7
14
21
Days
C
Number of cells/spheroid
45000
30000
15000
0
Primary hMSCs
HS-27a
HS-5
Days

Figure 3

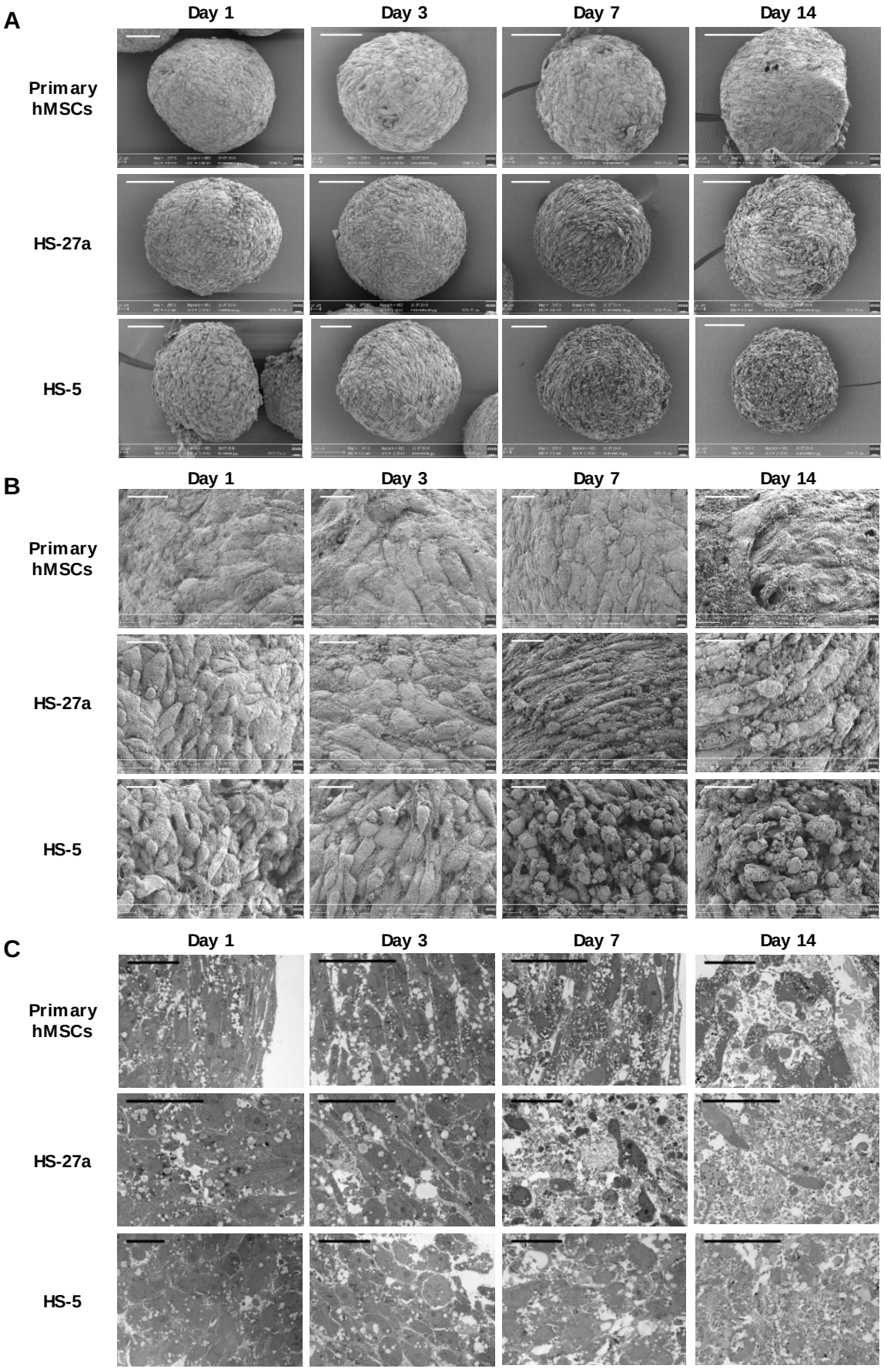

A
Day 1
Day 3
Day 7
Day 14
Primary hMSCs
HS-27a
HS-5
B
Day 1
Day 3
Day 7
Day 14
Primary hMSCs
HS-27a
HS-5
C
Day 1
Day 3
Day 7
Day 14
Primary hMSCs
HS-27a
HS-5

Figure 4

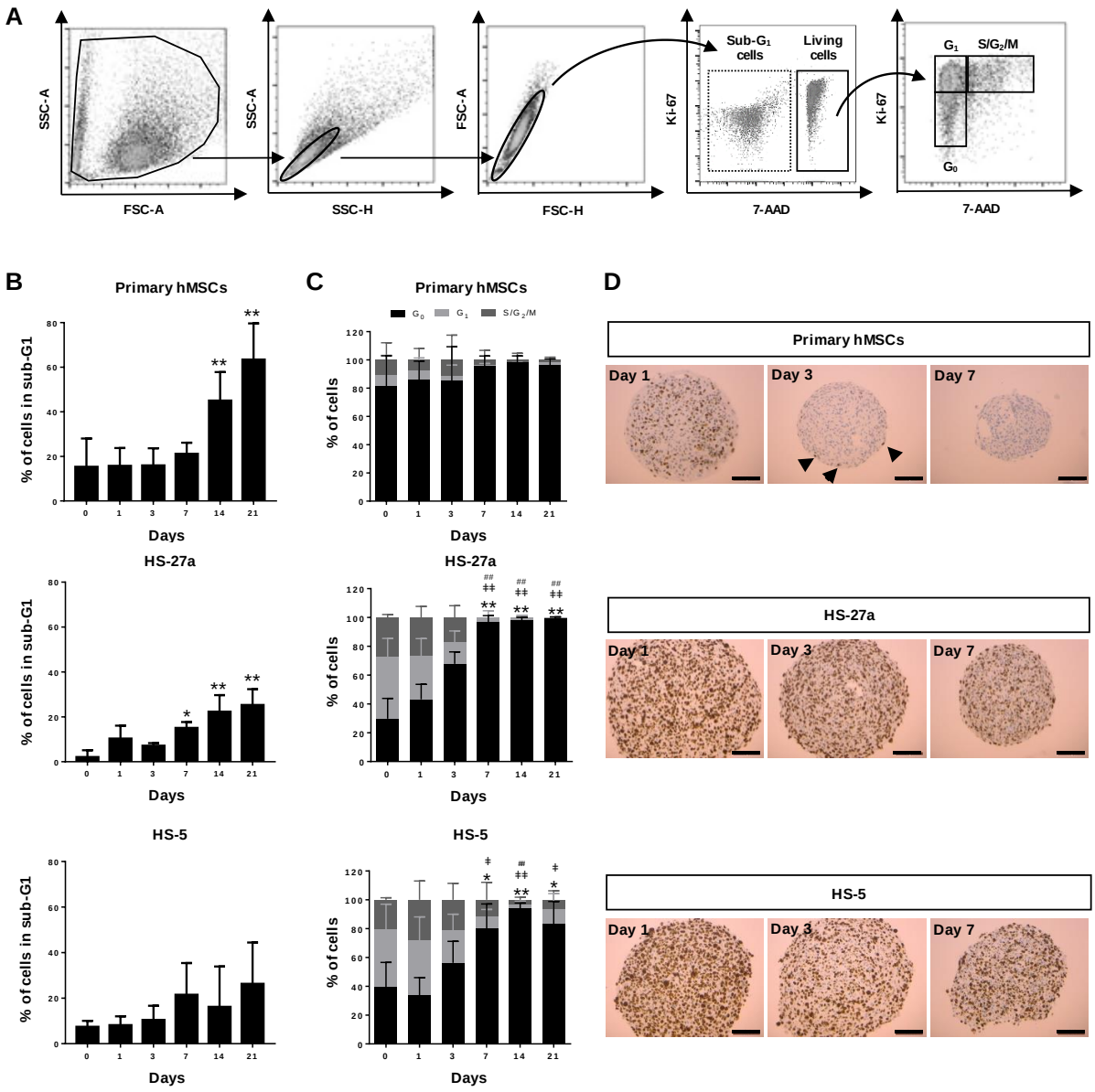

A
SSC-A
FSC-A
SSC-A
SSC-H
FSC-A
FSC-H
Ki-67
7-AAD
Sub-G1 cells
Living cells
Ki-67
7-AAD
G1
S/G2/M
G0
B
Primary hMSCs
% of cells in sub-G1
Days
HS-27a
HS-5
C
Primary hMSCs
G0
G1
S/G2/M
% of cells
Days
HS-27a
HS-5
D
Primary hMSCs
Day 1
Day 3
Day 7
HS-27a
HS-5

Figure 5

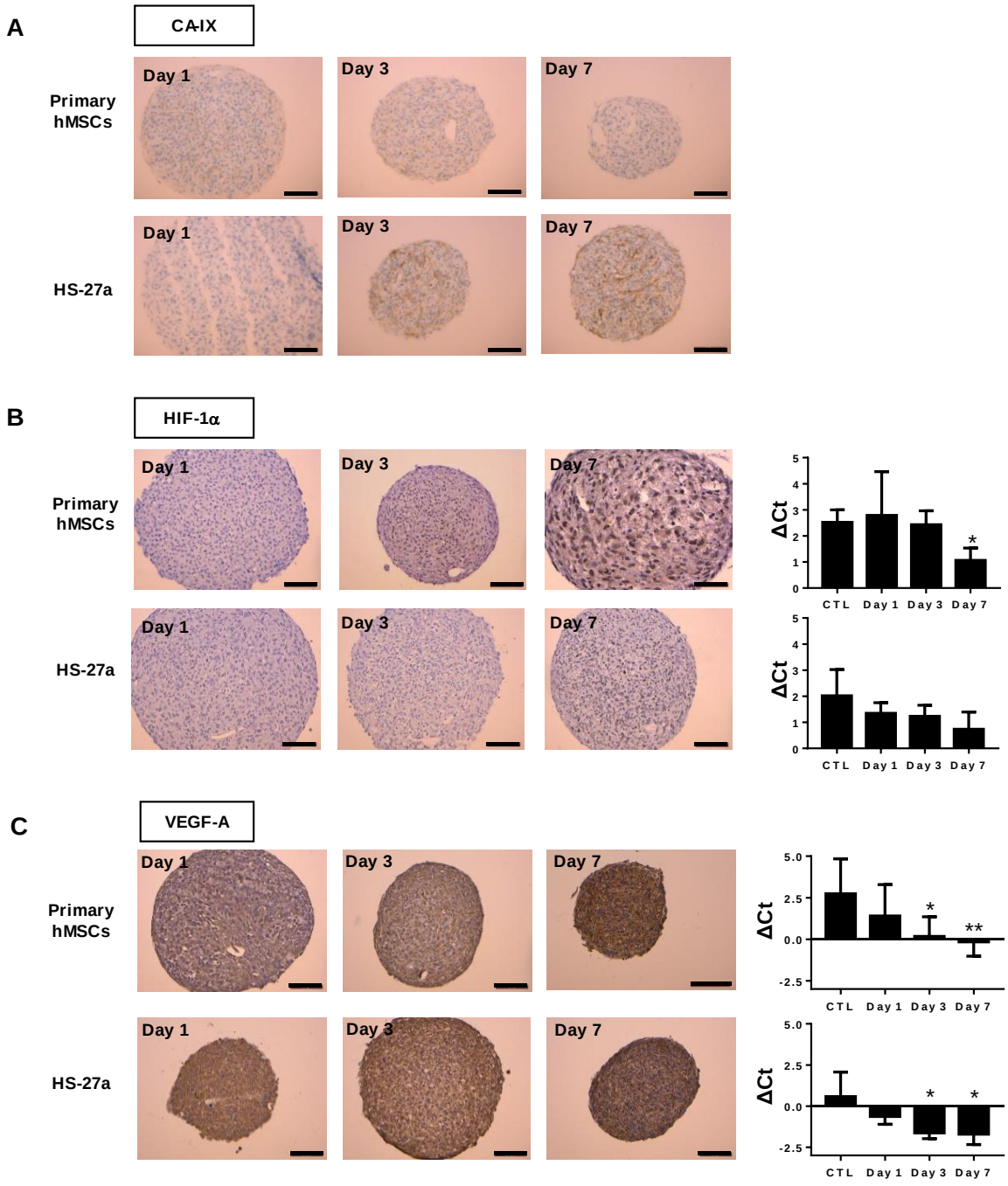

A
CA-IX
Primary hMSCs
HS-27a
Day 1
Day 3
Day 7
B
HIF-1α
ΔCt
CTL
Day 1
Day 3
Day 7
C
VEGF-A
*
**

Figure 6

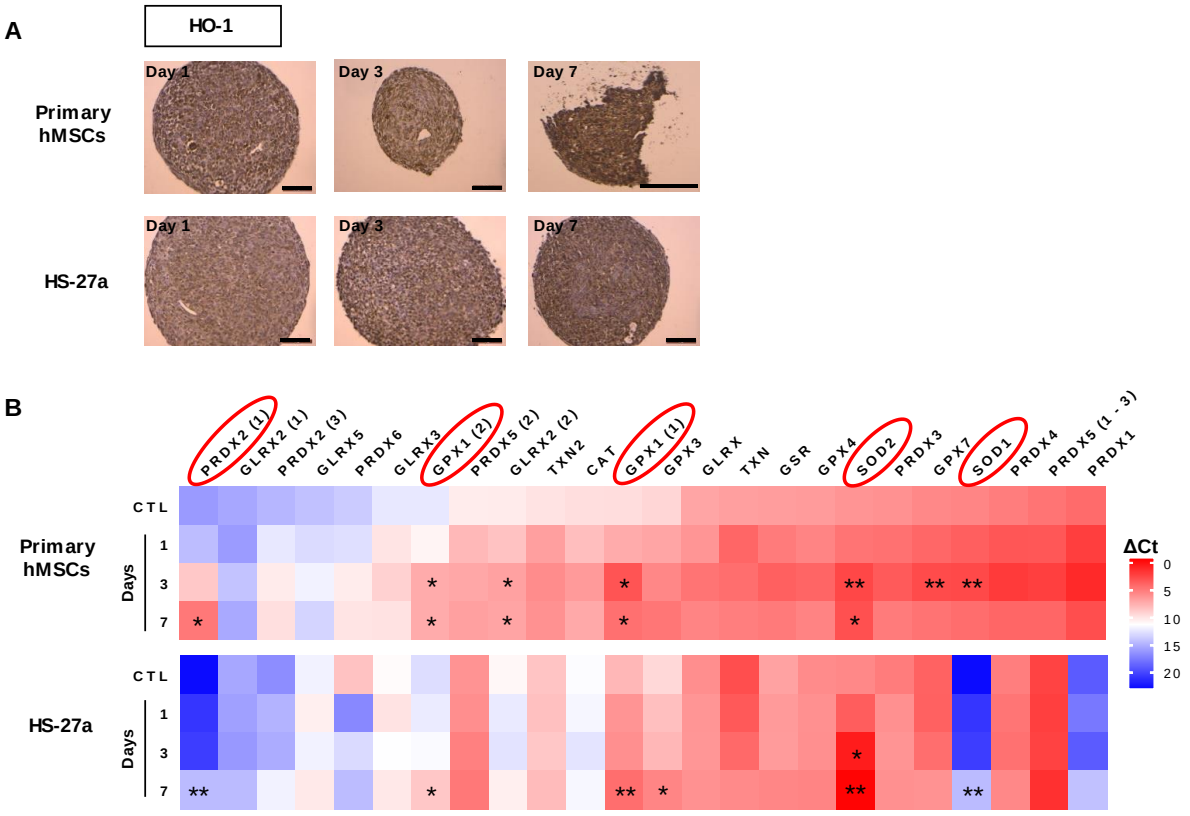
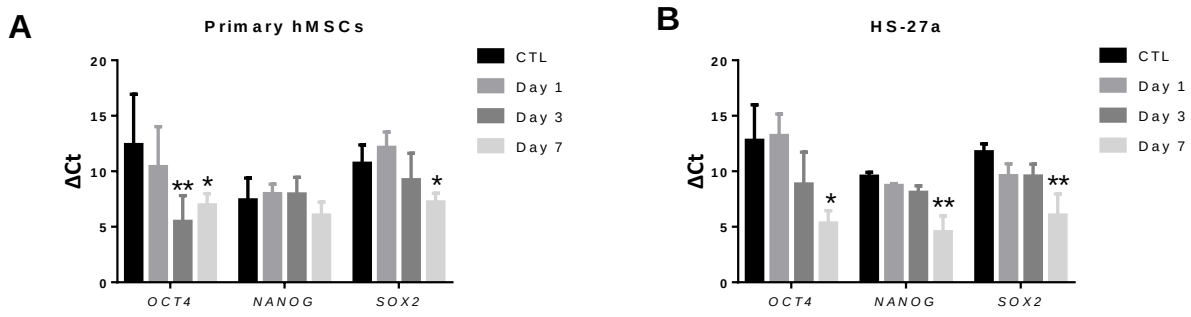

A
HO-1
Primary hMSCs
HS-27a
Day 1
Day 3
Day 7
B
PRDX2 (1)
GLRX2 (1)
PRDX2 (3)
GLRX5
PRDX6
GLRX3
GPX1 (2)
PRDX5 (2)
GLRX2 (2)
TXN2
CAT
GPX1 (1)
GPX3
GLRX
TXN
GSR
GPX4
SOD2
PRDX3
GPX7
SOD1
PRDX4
PRDX5 (1 - 3)
PRDX1
CTL
Days
1
3
7
Primary hMSCs
HS-27a
ΔCt
0
5
10
15
20

Figure 7

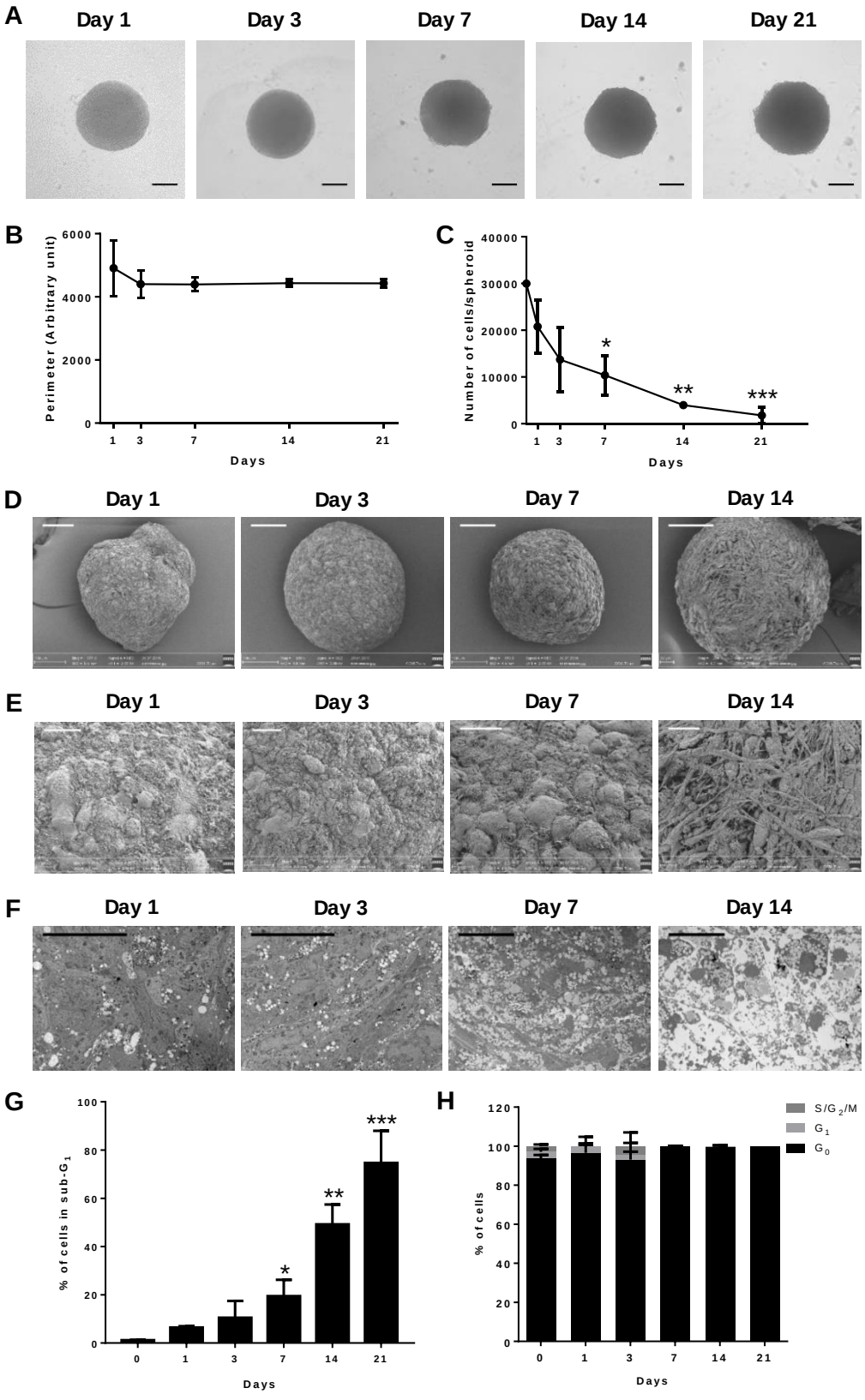

A
Primary hMSCs
ΔCt
20
15
10
5
0
**
*
OCT4
NANOG
SOX2
CTL
Day 1
Day 3
Day 7
B
HS-27a
ΔCt
20
15
10
5
0
*
**
**
OCT4
NANOG
SOX2
CTL
Day 1
Day 3
Day 7

Supplementary legends

Supplementary time-lapse videos. Spheroids formation. A representative time-lapse video of spheroid formation. 30 000 primary MSCs (A), HS-27a cells (B), HS-5 cells (C) or MS-5 cells (D) seeded into U-bottomed 96-well, in medium containing 0.5 % of methylcellulose (Methocult^{TM} SF H4236) were followed via a Nikon Eclipse TI-S microscope for 24 hours.

Supplementary Figure 1. Spheroids formation of mouse MS-5 cell line. (A) Microscopy analysis over 21 days in culture (scale bars = 100 µm). (B) Perimeter was measured with an arbitrary unit; each experiment is the mean of at least 10 spheroids (n = 3; data are mean ± SD). (C) Number of living cells per spheroids over 21 days in culture (n = 3; each experiment is the mean of 12 spheroids). (D, E) Scanning electron microscopy (SEM) and (F) transmission electronic microscopy (TEM) analysis over 14 days (scale bars = 100 µm (D), 20 µm (E and F)). (G) Sub-G_1 apoptosis quantification (n = 3) and (H) cell cycle quantification over 21 days in culture (n = 3; data are mean ± SD).

Supplementary Figure 1



Supplementary Table 1. List of primers and probes sequences.

	PROBE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
ACTB	gctggaag	attggcaatgagcggttc	cgtggatgccacaggact
BGLAP	cctggagc	ggcgctacctgtatcaatgg	tcagccaactcgtcacagtc
CAT	tgctggag	cgcagttcggttctccac	gggtcccgaactgtgtca
EF1A	ctgctggg	gaaaaatgcttttcgcgatct	atgggaggtcaggcacagt
GAPDH	tggggaag	agccacatcgctcagacac	gcccaatacgaccaaatcc
GLRX	ggtggctg	ggcttctggaatttgtcgat	tgcatccgcctatacaatctt
GLRX2 (1)	ctccatcc	gtggcactcgctggaatc	cgtcgctaaattctccaaagat
GLRX2 (2)	ccgccgcc	gctggtttggagcaggag	ccaaagatgatgatgtattgctct
GLRX3	tggtggaa	tcctcaagaaccacgctgt	tgagaagatatcaaaactgctaaactg
GLRX5	tgctggag	gtgataactggggcgttgtt	actcaggcatgcacagca
GPX1 (1)	ccaccacc	caaccagtttgggcatcag	gttcacctcgcacttctcg
GPX1 (2)	ctcctcct	cccttgtttgtggttagaacg	gagagaagggcagctagaacc
GPX3	aggtggag	cagagatccttcctaccctcaa	ccctttctcaaagagctgga
GPX4	tggggcag	tacggacccatggaggag	ccacacacttgtggagctagaa
GPX7	ggaaggag	ccatcctgccttcaagtacc	ttccatctggggctactagg
GSR	gctggaag	tgccagcttaggaataaccag	cctgcaccaacaatgacg
HIF1A	ccagccgc	aacctgatgctttaactttgctg	tggtcatcagtttctgtgtcg
NANOG	cttcctcc	atgcctcacacggagactgt	agggctgtcctgaataagca
OCT4	ctcctccc	tgcctgcccttctaggaat	caaaaccctggcacaaact
PRDX1	ccagccag	cactgacaaacatggggaagt	tttgctcttttggacatcagg
PRDX2 (1)	tggggaag	gccttccagtacacagacgag	gttgggcttaatcgtgtcact
PRDX2 (3)	cagcctcc	gcaactcagatgcaactctatctact	tgaactggagtttccatcttcat
PRDX3	ggaagcag	ctggacaccggattctccta	gggtgatctactgatttaccttctg
PRDX4	actgggaa	gcacctaagcaaagcgaaga	aaattctccatcgatcacagc
PRDX5 (1-3)	ggaaggag	tcctggctgatcccactg	atgccatcctgtaccaccat
PRDX5 (2)	ggaaggag	cacccctggatgttccaa	ggacaccagcgaatcatctagt
PRDX6	cctggagc	caatagacagtgttgaggaccatc	tttctgtgggctcttcacaa
RPL13A	ccagccgc	caagcggatgaacaccaac	tgtggggcagcatacctc
SOD1	tggggaag	gcatcatcaatttcgagcag	caggccttcagtcagtcctt
SOD2	ctgctggg	tccactgcaaggaacaacag	taagcgtgctcccacacat
SOX2	tcctcttct	ttgctgcctctttaagactagga	ctggggctcaaacttctctc
TXN	ggctgctg	ttacagccgctcgtcaga	ggcttcctgaaaagcagtctt
TXN2	ggccccag	gagacaccagtggttgtgga	gcttggccaccatcttctc
VEGFA	tggtggag	cctccgaaaccatgaacttt	atgattctgccctcctcctt

Discussion

La rechute demeure un écueil majeur dans le traitement des patients atteints de LAM et incite à chercher de nouvelles pistes thérapeutiques innovantes. Cette rechute a longtemps été associée à la présence de rares cellules souches, identifiées par xénotransplantation, avec un phénotype immature $CD34^+$ $CD38^-$ (Bonnet & Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Cependant, des études ont ensuite démontré que ce phénotype « souche » n'était pas suffisant pour les caractériser (Eppert et al., 2011; Farge et al., 2017; Henkenius et al., 2017; Sarry et al., 2011). En parallèle, la recherche a longtemps été tournée vers la découverte de mutations qui expliqueraient la résistance au traitement. Les avancées dans l'analyse moléculaire permettent maintenant de décrire les LAM comme des maladies hétérogènes (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; Papaemmanuil et al., 2016). La rechute a notamment été associée à l'apparition de clones rares ou absents au diagnostic (Desai et al., 2019; Jin & Wu, 2018).

Plus récemment, la notion de microenvironnement et de son impact dans l'initiation et le développement d'une tumeur, ainsi que dans la chimiorésistance, a fait son apparition. En effet, le microenvironnement semble en mesure de protéger les cellules leucémiques en modifiant la signalisation cellulaire et le métabolisme en lien avec la prolifération (Griessinger et al., 2014; Liu & Ma, 2015). L'utilisation des modèles murins a pris une large place pour décortiquer les mécanismes de la leucémogenèse, mais l'étude des interactions avec le microenvironnement reste encore difficile *in vivo*, bien que Duarte *et al.* ont réussi par microscopie intravitale chez la souris à étudier les mouvements migratoires de cellules de LAM et de LAL-T pré- et post-traitement (Duarte et al., 2019). Pour cela, de nombreux laboratoires cherchent à créer une niche extramédullaire chez l'animal avec plus ou moins de facilité (Abarrategi et al., 2018).

Depuis très longtemps les chercheurs ont utilisé les cellules stromales de la moelle osseuse comme support des cellules hématopoïétiques, ce qui a largement contribué à la découverte de facteurs de croissance, et l'identification des cellules souches (Dexter & Lajtha, 1974; Gartner & Kaplan, 1980; Senn et al., 1967; Sutherland et al., 1991). Ces modèles de coculture ont ensuite été utilisés comme support des cellules leucémiques (Ailles et al., 1997; Burger et al., 2003; Griessinger et al., 2014; van Gosliga et al., 2007). Certains ont même modifié l'expression du ligand *Delta-Like 1* (DLL1) dans la lignée cellulaire MS-5 afin d'activer la voie Notch, essentielle pour le maintien des cellules de LAL-T (Armstrong et al., 2009). C'est

pourquoi l'utilisation de modèles de coculture reste d'un réel intérêt pour comprendre les interactions entre cellules leucémiques et microenvironnement. Certains ont d'ailleurs montré que la combinaison d'un stroma avec des CSM pouvait conduire à la chimiorésistance (Griessinger et al., 2014). Nous avons donc cherché à mettre à profit ce modèle de coculture pour répondre à nos objectifs.

Les études distinguent classiquement deux populations de cellules hématopoïétiques (saines ou pathologiques) dans les cocultures, les cellules non adhérentes (en suspension dans le milieu) et celles au contact du stroma. Fin des années 80, la notion de nichage et de cellules souches est étroitement associée, et utilisée dans l'identification des *Cobblestone-Area Forming Cell* (CAFC) (Ploemacher, van der Sluijs, Voerman, & Brons, 1989). Plus récemment, Jing *et al.* ont décrit plusieurs types cellulaires au contact des CSM, des cellules réfringentes à la surface des CSM, et certaines non réfringentes enchâssées dans le stroma (Jing et al., 2010). La capacité des cellules leucémiques à s'enchâsser dans la couche stromale est aussi décrite par Burger *et al.*, phénomène qu'il nomme pseudo-empéripolèse (Burger et al., 2003). Nous avons développé un modèle démontrant l'existence de deux populations distinctes de cellules leucémiques au contact du stroma possédant des caractéristiques différentes, en particulier en matière de chimiorésistance. Nous avons donc eu pour objectif de mettre à profit ce modèle afin de mieux caractériser les différents types cellulaires, et de comprendre les mécanismes qui pourraient être impliqués dans la chimiorésistance avec un axe hypoxie et métabolisme oxydatif.

Différentes populations leucémiques aux propriétés distinctes existent dans une même coculture

Comme observé avec des CSH saines (Jing et al., 2010), nous avons établi l'existence de plusieurs populations leucémiques, aussi bien avec des cellules primaires que des lignées leucémiques. Les cellules non-adhérentes et adhérentes semblent fortement proliférer au cours du temps, alors que les cellules nichées restent constantes. A noter que la prolifération est exponentielle pendant les 5-6 jours de culture, ce qui suggère que nous étions dans des conditions où le milieu n'est pas épuisé en nutriments. L'augmentation de la proportion des cellules en phase G_0 du cycle cellulaire pour les cellules nichées confirme un impact du microenvironnement sur la prolifération des cellules, mais démontre que le simple contact ou le surnageant ne sont pas suffisants pour cela, comme démontré par Jing *et al.* (Jing et al., 2010).

Cependant, il faut plusieurs jours pour obtenir un arrêt du cycle, et le nombre de cellules en phase $S/G_2/M$ est identique dans les trois populations. Ceci suggère qu'une fraction non négligeable de cellules nichées demeure en cycle, ce qui est contradictoire avec le nombre stable de cellules nichées au cours du temps. En l'absence de mort cellulaire, il est très probable que les cellules nichées ont des mouvements migratoires, grossissant le pool des cellules adhérentes et non-adhérentes. L'observation en temps réel de ce phénomène de migration avec des cellules marquées pourrait certainement répondre à la question. Nous avons réalisé des vidéos préliminaires et montré une mobilité hétérogène des cellules à la surface des CSM, mais il est encore nécessaire d'améliorer les conditions d'analyses pour montrer la migration dans le stroma. Il est toutefois intéressant de noter qu'*in vivo* les cellules de LAM présentent une grande mobilité (Duarte et al., 2019).

Dans la mesure où les drogues ciblent principalement les cellules en division, la notion de quiescence est souvent associée à une plus grande chimiorésistance. En accord avec ceci, nous avons démontré que la fraction nichée, où les cellules sont plus quiescentes, est également plus résistante à la cytarabine que les deux autres populations. Cela suggère que le surnageant ou le simple contact avec des CSM ne suffisent pas à induire la résistance au traitement. De plus, nous avons démontré que la résistance n'était pas dû à une mauvaise biodisponibilité de la drogue, puisque la doxorubicine est capable de diffuser dans l'ensemble de la coculture.

A ce stade, nous avons cherché à comprendre si des propriétés intrinsèques pouvaient expliquer ces divergences en matière de prolifération et de chimiorésistance des trois populations leucémiques. D'un point de vue phénotypique, il est établi que les CSH sont $CD34^+$ $CD38^-$ (Cheng, Zheng, & Cheng, 2019). De manière intéressante, Jing *et al.* ont également montré que les CSH qui nichent sous les CSM ont un phénotype enrichi en $CD34^+$ $CD38^-$ (Jing et al., 2010). En revanche, le phénotype des CSL est plus controversé. La littérature, suite à la découverte de l'équipe du Pr. John E. Dick (Bonnet & Dick, 1997), décrit que les CSL ont le même phénotype « immature » ($CD34^+$ $CD38^-$) que les CSH. Cependant, il ne s'agit probablement que d'un enrichissement en ce phénotype, car des CSL sont aussi trouvées en grand nombre dans le phénotype correspondant aux progéniteurs $CD34^+$ $CD38^+$ (Eppert et al., 2011; Sarry et al., 2011). Nous nous sommes donc interrogés sur le phénotype des cellules de LAM nichées. En utilisant des blastes primaires ou des lignées exprimant ou non le marqueur CD34, nous avons pu démontrer tout d'abord que le nichage des cellules est indépendant de l'expression du CD34, et qu'il n'augmente pas au cours de la culture. Cependant, les blastes exprimant CD34 semblent être enrichis en $CD34^+$ dans les fractions au contact du stroma (adhérentes et nichées). Ceci

suggère que l'expression du CD34 ne confère pas des propriétés de quiescence ou de chimiorésistance, qui sont uniquement observées pour les cellules nichées. Tout ceci indique que la résistance ne peut être associée à un phénotype caractérisant les cellules souches dans notre modèle, ce qui est en accord avec les études *in vivo* (Eppert et al., 2011; Farge et al., 2017; Henkenius et al., 2017; Sarry et al., 2011; Taussig et al., 2008).

Par ailleurs, les CSL sont décrites sur leur capacité initiatrice de leucémie *in vivo*, plutôt que sur leur phénotype. Nous avons donc cherché à comprendre si les cellules nichées possédaient une telle capacité. *In vitro*, nous avons validé que les cellules nichées n'ont pas plus d'aptitude à former des colonies en milieu semi-solide ou à reformer les trois populations sur un stroma que les autres fractions. De façon intéressante, *in vivo*, bien qu'elles puissent développer une leucémie alors que la fraction en suspension ne le peut pas, il semble qu'elles greffent aussi bien que les cellules adhérentes. Le caractère souche révélé par la capacité de greffe ne peut donc expliquer la chimiorésistance. Ceci est en accord avec les études *in vivo* récentes qui montrent que les cellules chimiorésistantes n'ont pas de phénotype ou de capacité souche particulière (Farge et al., 2017), et démontre que notre modèle de coculture peut répondre à des questions habituellement posées *in vivo*.

L'adhérence cellulaire pourrait être un acteur dans la chimiorésistance

Les trois populations leucémiques étant séparées selon leur propriété d'adhérence plus ou moins forte au stroma, nous pensons que celle-ci joue un rôle prédominant dans le nichage, comme cela a déjà été proposé. Nous montrons en effet comme d'autres (Burger et al., 2003; Jing et al., 2010) que les cellules nichées ont une augmentation de l'expression de CXCR4. Une étude récente a montré que les cellules résistantes à la chimiothérapie expriment plus fortement CXCR4 après traitement (Duarte et al., 2019). Nos données sont en accord avec cette idée d'un lien entre CXCR4 et chimiorésistance, mais il faudrait analyser le niveau de CXCR4 après le traitement pour savoir si un enrichissement en cellules exprimant fortement CXCR4 se produit. De plus, nous avons démontré que les cellules nichées ont un niveau de ROS plus faible que les autres. Ceci est également en accord avec une étude qui montre que les CSH n'exprimant plus CXCR4 ont une augmentation du niveau de ROS (Zhang et al., 2016b). On peut donc penser que la diminution des ROS pourrait être liée à l'expression de CXCR4.

Pour comprendre le rôle de CXCR4 dans le nichage cellulaire, nous avons utilisé un inhibiteur, l'AMD3100. De manière surprenante dans nos conditions, nous ne voyons pas d'arrêt du

nichage en bloquant CXCR4. Cependant, le temps de demi-vie de cet inhibiteur est très court, de l'ordre de 3 à 5 heures. Il est donc possible que l'effet de cette drogue soit mineur sur le nichage aux temps courts, et plus encore après 3 jours. Il est également possible que CXCR4 ne soit pas indispensable au nichage dans ce modèle. Plus surprenant, une récente étude a montré que l'AMD3100 *in vivo* n'a pas d'effet sur la migration des cellules de LAM chimiorésistantes (Duarte et al., 2019). Pour confirmer ces observations il faudrait (1) faire des expériences en cinétique et ajouter la drogue chaque jour, (2) utiliser d'autres drogues inhibant CXCR4, comme l'ulocuplumab, le BL-8040 ou le CX-01 (Rashidi & DiPersio, 2016), et enfin (3) inhiber directement l'expression de CXCR4 par un shARN. De plus, il conviendra de tester si bloquer CXCR4 modifie le niveau des ROS et la résistance à la cytarabine.

Bien que CXCR4 ne puisse pas être requis pour le nichage et le maintien des cellules dans notre système *in vitro*, il est connu que l'hypoxie peut augmenter son expression (Fiegl et al., 2009). En effet, nous observons dans notre système une hypoxie « naturelle » qui nous laisse penser qu'elle pourrait avoir un rôle dans l'élévation d'expression de CXCR4. Cependant, cela reste à démontrer. En effet, nous pourrions observer cet effet en modulant le niveau d'oxygène dans le milieu et/ou en bloquant l'expression des HIF.

Une hypoxie apparaît naturellement dans la coculture

Le modèle de coculture établi, nous avons cherché à déterminer si l'hypoxie pouvait apparaître dans la culture comme pour les CSH (Jing et al., 2012), afin d'étudier si elle participe à la chimiorésistance. En effet, la MO possède un gradient d'oxygène de l'endosteum vers des zones péri-sinusoïdales pouvant atteindre 1,3 % d'O_2 (Spencer et al., 2014). De plus, l'hypoxie est démontrée comme un facteur de mauvais pronostic dans la LAM (Forristal et al., 2015; Gao et al., 2015; Radwan et al., 2016).

Nous avons mesuré les teneurs en oxygène dans notre système de coculture. Il avait déjà été démontré que le taux d'oxygène baisse au cours de la culture. Nous sommes certainement les premiers à mesurer les taux d'oxygène dans la coculture et a montré une forte diminution au cours du temps. Ce phénomène est plus fort dans la coculture que dans la culture des CSM ou des MV4-11 seules, ce qui peut être expliqué par la présence d'un plus grand nombre de cellules, et donc d'une consommation accrue d'oxygène. L'hypoxie est variable d'une expérience à l'autre et semble modérée. Cependant, les billes qui servent à la mesure sont posées à la surface des CSM, ce qui laisse supposer que le taux d'oxygène est encore plus faible

dans le stroma. Ceci est soutenu par le marquage au pimonidazole qui tend à augmenter dans les cellules leucémiques nichées par rapport aux deux autres fractions au jour 3. Ces expériences, difficiles à réaliser du fait de la réoxygénation très rapide du milieu de culture lorsque les cellules sont manipulées, nécessitent d'être confirmées et complétées par un marquage des gènes cibles de l'hypoxie. Il pourrait être intéressant de moduler le taux d'oxygène plus rapidement dans un incubateur prévu à cet effet, en le diminuant ou en l'augmentant, et de quantifier le nombre de cellules capables de nicher. On pourrait s'attendre à l'augmentation de leur nombre lorsque le niveau d'oxygène est plus bas. De plus, on pourrait vérifier l'expression de CXCR4 et la chimiorésistance dans ces conditions.

Il est intéressant de noter que dans des expériences de ce type, Griessinger *et al.* ont montré que la chimiorésistance est augmentée lorsque les cocultures sont placées à 3 % d'oxygène (Griessinger et al., 2014). Cependant, ils ont regardé globalement la chimiorésistance. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules nichées pouvaient être plus résistantes au traitement du fait d'une réponse à l'hypoxie accrue par rapport aux autres fractions, et qu'inhiber les HIF permettrait de lever la résistance. Ainsi, nous avons effectivement montré que l'ACF améliore l'effet de la cytarabine. L'ACF est un intercalant de l'ADN connu, et il est difficile de faire la part entre l'activité anti-HIF et les propriétés intercalantes. Il conviendrait de faire des expériences en normoxie *versus* hypoxie pour voir si l'effet est toujours additif ou synergique. Des données sur les cellules de LMC tendent à prouver que l'effet est plus fort en hypoxie qu'en normoxie (Cheloni et al., 2017, données non publiées). Il n'existe pas d'inhibiteur pharmacologique spécifique de HIF-1α. En revanche, l'inhibition spécifique de HIF-2α (PT-2385) à la dose de 20 µM ne permet pas d'améliorer l'élimination des cellules résistantes, alors que des doses similaires en combinaison avec du sorafenib ont montré un bénéfice dans le carcinome hépatocellulaire (Xu et al., 2017). Ceci suggère probablement que l'effet de l'hypoxie est dépendant de HIF-1α comme cela a été montré pour la LMC (Cheloni et al., 2017).

Les effets non spécifiques des inhibiteurs chimiques limitent les conclusions que l'on peut tirer de ces résultats. Il serait intéressant d'utiliser l'interférence par ARN (shARN) ou la stratégie CRISPR/CAS9 contre *HIF1A* et *HIF2A* en combinaison avec la cytarabine pour les confirmer. La stratégie shARN semble plus appropriée dans la mesure ou l'absence complète de HIF semble délétère pour les cellules, et qu'elle a déjà été utilisée par l'équipe (Rouault-Pierre et al., 2013). Il serait intéressant de réaliser des vecteurs inductibles pour éviter l'effet de l'inhibition elle-même sur les cellules leucémiques.

Le nichage diminue le stress oxydant mais pas le simple contact

Des études ont mis en exergue le lien entre hypoxie et métabolisme oxydatif, notamment via l'utilisation de drogues, telles que le benzène (Sun et al., 2019), le 2-methoxyestradiol (Zhe et al., 2016) ou encore l'acide bétulinique et la chidamide (Zhang et al., 2017), qui inhibent les facteurs HIF, engendrant l'augmentation des ROS et donc la mort cellulaire. De même, il a été démontré que le KO de *HIF2A* conduit à la baisse d'expression d'enzymes antioxydantes, telles que SOD2, qui induit à la formation de ROS (Rouault-Pierre et al., 2013; Scortegagna et al., 2003a). Dans notre étude, nous montrons que les cellules nichées ont moins de ROS cytoplasmiques et mitochondriales que les autres populations, ainsi qu'une baisse du potentiel de membrane mitochondrial, possiblement via la diminution du nombre de mitochondries. Il est donc probable que le profil plus hypoxique des cellules nichées puisse être associé à cette baisse du métabolisme oxydatif. De plus, les cellules simplement au contact semblaient aussi avoir un profil plus hypoxique que les cellules en suspension, mais pas de grande différence dans le niveau des ROS.

D'une part, le transfert de mitochondries des cellules leucémiques vers les CSM pourrait expliquer la perte de ces organites. Les CSM reçoivent les mitochondries des CSH via la connexine 43, faisant augmenter leur taux de ROS intracellulaires à l'inverse des CSH (Golan et al., 2016). Nos observations montrent également une augmentation des ROS mitochondriales et de la masse mitochondriale dans les CSM en présence des cellules leucémiques. Il serait intéressant de vérifier si un échange de mitochondries entre les cellules MV4-11 et les CSM est plus prononcé autour des cellules nichées. D'autre part, la perte en mitochondries peut être plus simplement la conséquence d'une autophagie déclenchée par l'hypoxie. En effet, il a été démontré que l'hypoxie via HIF-1α induit la surexpression de BNIP3 (Bellot et al., 2009), ce qui engendre une expression constitutive de Beclin-1 et ATG5 (Zhang et al., 2008), indispensables au processus d'autophagie. De plus, l'hypoxie permet la déphosphorylation de FUNDC1 (*FUN-14 Domain-Containing protein 1*), ce qui augmente son affinité avec la protéine LC3 (*Microtubule-associated proteins 1A/1B Light Chain 3B*) (Chen et al., 2014; Liu et al., 2012).

Pour faire le lien entre hypoxie, métabolisme oxydatif et chimiorésistance, il faudrait mesurer les taux de ROS, ainsi que la chimiorésistance des cellules leucémiques, en mettant la coculture en hypoxie. Ainsi, au vu de nos résultats, nous devrions trouver des taux faibles de ROS et une chimiorésistance accrue dans les trois populations leucémiques. Nous pourrions également

regarder les niveaux de ROS après inhibition des facteurs HIF par shARN ou par inhibition chimique (ACF, PT-2385), ou après surexpression des facteurs HIF. Cependant, il a été montré par Fargue *et al.* que les cellules chimiorésistantes sont plutôt les cellules avec une OXPHOS élevée. Il faudrait donc regarder si les cellules nichées ont une augmentation de l'OXPHOS après traitement. Cependant, ces expériences sont très délicates à réaliser du fait du nombre de cellules disponibles dans la coculture, d'autant plus après traitement.

Finalement, nous avons démontré que les cellules nichées, comparées aux cellules simplement adhérentes et non-adhérentes, sont plus quiescentes, hypoxiques et chimiorésistantes, avec un stress oxydant diminué et une expression du CXCR4 accrue (**Figure 34A**). L'ensemble de ces données suggère un lien entre hypoxie, métabolisme, adhérence et chimiorésistance des cellules nichées (**Figure 34B**).

Création d'un modèle de niche 3D

Les aspects tridimensionnels de la niche hématopoïétique sont faiblement représentés en coculture en 2D, ce qui n'optimise pas les interactions entre microenvironnement et cellules hématopoïétiques. C'est pourquoi il est apparu depuis quelques années des modèles de niche 3D, qui permettent de mieux mimer la complexité de la niche *in vitro*. Ainsi, des modèles simples de sphéroïdes dérivés des CSM ont été proposés, pour étudier l'interaction microenvironnement-CSH d'une part (De Barros et al., 2010; Futrega, Atkinson, Lott, & Doran, 2017; Isern et al., 2013; Leisten et al., 2012; Wuchter et al., 2016), microenvironnement-cellules malignes d'autre part (Aljitawi et al., 2014; Bruce et al., 2015), ainsi que les mécanismes de chimiorésistance. Nous avons cherché à mettre au point une méthode simple, rapide et reproductible pour créer des sphéroïdes de CSM pour mimer la niche leucémique. Afin de faciliter nos travaux, nous avons testé la possibilité de faire des sphéroïdes à partir de lignées cellulaires en comparaison avec des CSM primaires, pratiquement toujours utilisées. Nous avons choisi deux lignées cellulaires humaines, HS-27a et HS-5, connues pour soutenir l'hématopoïèse *in vitro* (Iwata et al., 2014; Torok-Storb et al., 1999), ainsi que la lignée murine MS-5 classiquement utilisée en coculture pour sa propriété d'inhibition de contact.

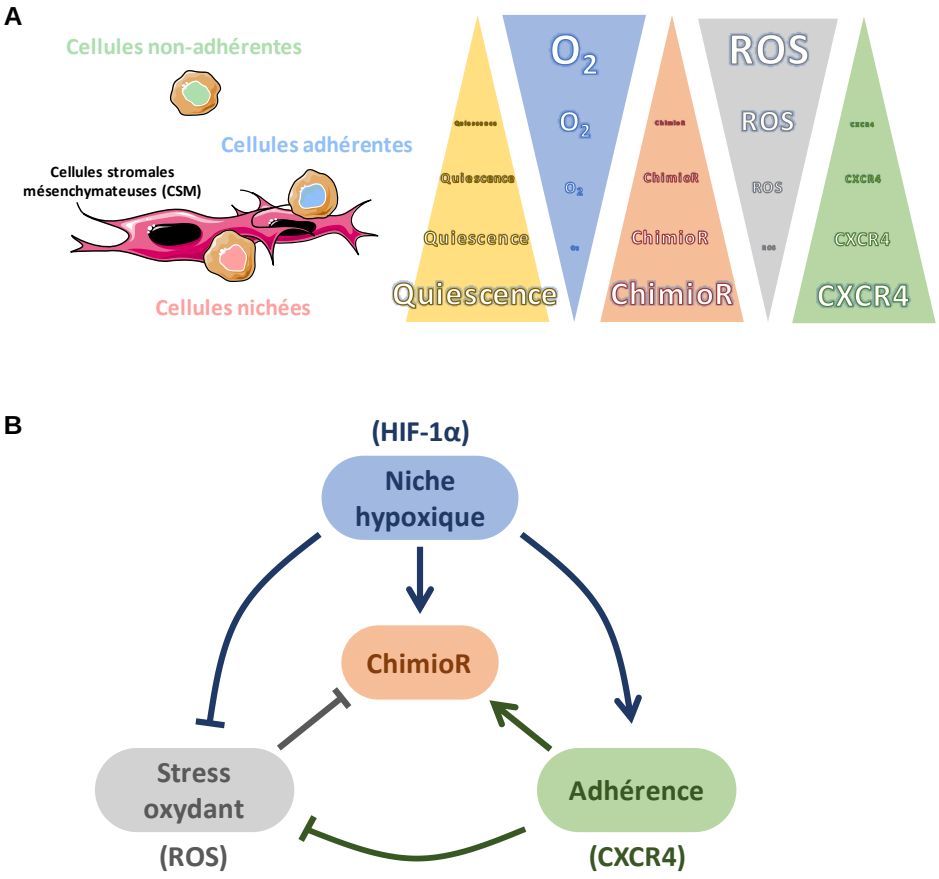


Figure 34. Schéma de conclusion. (**A**) Au sein de notre coculture se créent différents gradients rendant les cellules nichées complétement distinguables des autres populations. (**B**) Schéma du tryptique d'interactions entre hypoxie, métabolisme et adhérence, conduisant à la résistance au traitement. ChimioR : Chimiorésistance.

L'utilisation de la méthylcellulose et d'un support à fond rond ont permis d'obtenir des sphéroïdes en 5 à 10 h. La différence entre les CSM primaires et les lignées peut s'expliquer par la taille ; les CSM primaires plus grosses peuvent avoir une sédimentation plus rapide dans ce milieu légèrement visqueux. Les CSM primaires subissent une réduction rapide de leur taille, un phénomène déjà observé (Bellotti et al., 2016; Kim et al., 2018; Pennock et al., 2015; Redondo-Castro et al., 2018; Schmal et al., 2015; Shearier et al., 2016; Tsai et al., 2015). Celui-ci pourrait être dû à une plus forte cohésion des cellules et une composition de la matrice extracellulaire différente, ou bien également à l'autophagie (Pennock et al., 2015). En effet, les lignées cellulaires transformées ont moins d'autophagie car ce processus est fort dans les cellules qui prolifèrent peu ou pas (Neufeld, 2012). Or, contrairement aux CSM primaires, les lignées cellulaires prolifèrent encore à jour 7, ce qui pourrait bloquer l'autophagie.

Comme pour le modèle de niche en 2D, nous avons cherché à observer si une hypoxie se créait au sein de nos sphéroïdes. Le phénomène de gradient d'oxygène a été largement observé et

mesuré dans les sphéroïdes de tumeurs solides (Leek, Grimes, Harris, & McIntyre, 2016; Riffle & Hegde, 2017), mais nous n'avons trouvé qu'une seule étude le montrant pour des sphéroïdes de CSM (Sharma et al., 2012). Nous avons utilisé les billes CPOx, mais l'analyse sur un seul plan rend difficile la localisation des billes. Il faudrait coupler le système Opal avec un microscope confocal. Le marqueur le plus utilisé dans les tumeurs solides pour caractériser l'hypoxie est la protéine CA-IX. Nous observons une augmentation de son signal au cours du temps, corrélée à l'augmentation de l'expression de HIF-1α et de sa cible, VEGF-A, démontrant l'apparition d'une hypoxie au sein des sphéroïdes.

Nous observons également une augmentation de la mort dans les sphéroïdes. Il est rapporté qu'une hypoxie aiguë, ou l'anoxie, peut conduire à des dommages de l'ADN et à un stress oxydant conduisant à la mort cellulaire (Riffle & Hegde, 2017). La protéine HO-1 est un marqueur du stress oxydant induit par l'hypoxie (Dunn et al., 2014). L'induction de la mort cellulaire semble être précédée d'une augmentation de l'expression de HO-1, et d'une réponse antioxydante révélée par l'expression accrue de gènes codants pour des protéines antioxydantes (*GPX1*, *PRDX2*, *SOD1* et *SOD2*).

Enfin, les sphéroïdes induisent la réexpression des marqueurs « souches » tels que SOX-2, OCT-4 et NANOG dans les CSM primaires (Pennock et al., 2015), et il est connu que l'hypoxie régule l'expression de ces facteurs de manière dépendante des facteurs HIF (Drela et al., 2014). Nous avons donc regardé leur expression dans les sphéroïdes dérivés des CSM primaires et des HS-27a pour confirmer que cette lignée se comporte comme les CSM primaires. Effectivement, une expression des trois gènes est observée dans les sphéroïdes de HS-27a qui ne les expriment pas en temps normal. Nous avons donc une dédifférenciation qui s'opère dans les cellules de cette lignée durant la formation en sphéroïde. Cependant, il est impossible de savoir si cette dédifférenciation s'opère dans toutes les cellules, ou bien dans les cellules les plus hypoxiques. Un co-marquage avec les marqueurs de l'hypoxie pourrait répondre à cette interrogation.

Les lignées cellulaires possèdent, à l'instar des CSM primaires, la capacité de former des sphéroïdes, malgré quelques différences en matière de temps de formation, de nombre de cellules ou de mort cellulaire. La lignée HS-27a, connue comme supportant les CSH (Iwata et al., 2014; Torok-Storb et al., 1999), se comporte de manière très proche des CSM primaires, et pourrait être un bon modèle de substitution lorsque l'on n'a pas accès à du matériel primaire. Il reste cependant à valider sa capacité à maintenir des CSH ou des cellules leucémiques en 3D.

Conclusion et perspectives

Nous avons créé un modèle de coculture entre cellules de LAM et CSM primaires qui met en évidence n'ont pas une, comme traditionnellement décrit, mais deux populations leucémiques au contact du stroma : des cellules simplement adhérentes et des cellules qui viennent se nicher dans/sous la couche de CSM. Ce modèle a permis d'identifier différentes populations de LAM en interaction avec un même environnement, et d'associer des caractéristiques spécifiques à chacune des populations. Nous avons montré que les cellules nichées sont chimiorésistantes et possèdent un profil plus hypoxique, un niveau de ROS plus faible et une expression plus forte de CXCR4, comparées aux autres populations. Cependant, même si des liens sont suggérés entre ces différents aspects, ils restent à valider. De plus, ce modèle peut servir à cribler des drogues pour cibler les cellules réfractaires au traitement, ou bien pour étudier plus en profondeur les interactions entre cellules du microenvironnement et cellules leucémiques. En fait, toutes questions visant à mieux comprendre les mécanismes d'actions de chimiorésistance sont possibles dans ce système, car les cellules réfractaires sont différenciables des autres par leur localisation. Nous avons prouvé cette possibilité en utilisant l'ACF pour bloquer la réponse hypoxique. Pour aller plus loin dans la modélisation de niche, nous avons montré la possibilité d'utiliser les lignées pour former des structures 3D. Les sphéroïdes peuvent permettre de mieux comprendre les mécanismes de chimiorésistance dans un environnement plus physiologique, ainsi que les interactions entre cellules. Enfin, ces modèles pourraient être ouverts à d'autres pathologies, et en particulier être utilisés pour étudier les mécanismes métastatiques comme décrit pour le cancer du sein (Cavnar et al., 2015).

Bibliographie

Abarrategi, A., Foster, K., Hamilton, A., Mian, S. A., Passaro, D., Gribben, J., Mufti, G., & Bonnet, D. 2017. Versatile humanized niche model enables study of normal and malignant human hematopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*, 127(2): 543–548.

Abarrategi, A., Mian, S. A., Passaro, D., Pierre, K. R., Grey, W., & Bonnet, D. 2018. Modeling the human bone marrow niche in mice : From host bone marrow engraftment to bioengineering approaches. *Journal of Experimental Medicine*, 215(3): 729–743.

Acar, M., Kocherlakota, K. S., Murphy, M. M., Peyer, J. G., Oguro, H., Inra, C. N., Jaiyeola, C., Zhao, Z., Luby-phelps, K., & Morrison, S. J. 2015. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*, 526(7571): 126–130.

Agarwala, S., & Tamplin, O. J. 2018. Neural Crossroads in the Hematopoietic Stem Cell Niche. *Trends in Cell Biology*, 28(12): 987–998.

Ågerstam, H., Karlsson, C., Hansen, N., Sandén, C., Askmyr, M., Von Palffy, S., Högberg, C., Rissler, M., Wunderlich, M., Juliusson, G., Richter, J., Sjöström, K., Bhatia, R., Mulloy, J. C., Järås, M., & Fioretos, T. 2015. Antibodies targeting human IL1RAP (IL1R3) show therapeutic effects in xenograft models of acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34): 10786–10791.

Ailles, L. E., Gerhard, B., & Hogge, D. E. 1997. Detection and characterization of primitive malignant and normal progenitors in patients with acute myelogenous leukemia using long-term coculture with supportive feeder layers and cytokines. *Blood*, 90(7): 2555–2564.

Alakel, N., Jing, D., Muller, K., Bornhauser, M., Ehninger, G., & Ordemann, R. 2009. Direct contact with mesenchymal stromal cells affects migratory behavior and gene expression profile of CD133+ hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. *Experimental Hematology*, 37(4): 504–513.

Aleman, J., George, S. K., Herberg, S., Devarasetty, M., Porada, C. D., Skardal, A., & Almeida-Porada, G. 2019. Deconstructed Microfluidic Bone Marrow On-A-Chip to Study Normal and Malignant Hemopoietic Cell–Niche Interactions. *Small*, 15(43): e1902971.

Aljitawi, O. S., Li, D., Xiao, Y., Zhang, D., Ramachandran, K., Stehno-Bittel, L., Van Veldhuizen, P., Lin, T. L., Kambhampati, S., & Garimella, R. 2014. A novel three-dimensional stromal-based model for in vitro chemotherapy sensitivity testing of leukemia cells. *Leukemia & lymphoma*, 55(2): 378–91.

Antonelli, A., Noort, W. A., Jaques, J., de Boer, B., de Jong-Korlaar, R., Brouwers-Vos, A. Z., Lubbers-Aalders, L., Van Velzen, J. F., Bloem, A. C., Yuan, H., De Bruijn, J. D., Ossenkoppele, G. J.,

Martens, A. C. M., Vellenga, E., Groen, R. W. J., & Schuringa, J. J. 2016. Establishing human leukemia xenograft mouse models by implanting human bone marrow-like scaffold-based niches. *Blood*, 128(25): 2949–2959.

Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20): 2391–2405.

Armstrong, F., Brunet, P., Grange, D., Gerby, B., Rouyez, M., Calvo, J., Boissel, N., Landman-parker, J., & Rome, P. 2009. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood*, 113(8): 1730–1740.

Asada, N., Takeishi, S., & Frenette, P. S. 2017. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. *International Journal of Hematology*, 106(1): 45–54.

Askmyr, M., Ågerstam, H., Hansen, N., Gordon, S., Arvanitakis, A., Rissler, M., Juliusson, G., Richter, J., Järås, M., & Fioretos, T. 2013. Selective killing of candidate AML stem cells by antibody targeting of IL1RAP. *Blood*, 121(18): 3709–3713.

Augstein, A., Poitz, D. M., Braun-Dullaeus, R. C., Strasser, R. H., & Schmeisser, A. 2011. Cell-specific and hypoxia-dependent regulation of human HIF-3α: inhibition of the expression of HIF target genes in vascular cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(15): 2627–2642.

Bain, B. J. 2010. Chapter 1. The Nature of Leukaemia, Cytology, Cytochemistry and the Fab Classification of Acute Leukaemia. *Leukaemia Diagnosis, Fourth Edition* (pp. 1–63).

Barreyro, L., Will, B., Bartholdy, B., Zhou, L., Todorova, T. I., Stanley, R. F., Ben-Neriah, S., Montagna, C., Parekh, S., Pellagatti, A., Boultwood, J., Paietta, E., Ketterling, R. P., Cripe, L., Fernandez, H. F., Greenberg, P. L., Tallman, M. S., Steidl, C., Mitsiades, C. S., Verma, A., et al. 2012. Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS. *Blood*, 120(6): 1290–1298.

Bartosh, T. J., Ylöstalo, J. H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., Lee, R. H., Choi, H., & Prockop, D. J. 2010. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiin fl ammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31): 13724–13729.

Battula, V. L., Le, P. M., Sun, J. C., Nguyen, K., Yuan, B., Zhou, X., Sonnylal, S., McQueen, T., Ruvolo, V., Michel, K. A., Ling, X., Jacamo, R., Shpall, E., Wang, Z., Rao, A., Al-Atrash, G., Konopleva, M., Davis, R. E., Harrington, M. A., Cahill, C. W., et al. 2017. AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth. *The Journal of Clinical Investigation*, 2(13): e90036.

Beegle, J., Lakatos, K., Kalomoiris, S., Stewart, H., Isseroff, R. R., Nolta, J. A., & Fierro, F. A. 2015.

Hypoxic Preconditioning of Mesenchymal Stromal Cells Induces Metabolic Changes, Enhances Survival and Promotes Cell Retention in Vivo. *Stem Cells*, 33: 1818–1828.

Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. 2009. Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10): 2570–2581.

Bellotti, C., Duchi, S., Bevilacqua, A., Lucarelli, E., & Piccinini, F. 2016. Long term morphological characterization of mesenchymal stromal cells 3D spheroids built with a rapid method based on entry-level equipment. *Cytotechnology*, 68(6): 2479–2490.

Benito, J., Ramirez, M. S., Millward, N. Z., Velez, J., Harutyunyan, K. G., Lu, H., Shi, Y.-X., Matre, P., Jacamo, R., Ma, H., Konoplev, S., McQueen, T., Volgin, A., Protopopova, M., Mu, H., Lee, J., Bhattacharya, P. K., Marszalek, J. R., Davis, R. E., Bankson, J. A., et al. 2016. Hypoxia-activated prodrug TH-302 targets hypoxic bone marrow niches in pre-clinical leukemia models. *Clinical Cancer Research*, 22(7): 1687–1698.

Benito, J., Shi, Y., Szymanska, B., Carol, H., Boehm, I., Lu, H., Konoplev, S., Fang, W., Zweidler-McKay, P. a., Campana, D., Borthakur, G., Bueso-Ramos, C., Shpall, E., Thomas, D. a., Jordan, C. T., Kantarjian, H., Wilson, W. R., Lock, R., Andreeff, M., & Konopleva, M. 2011. Pronounced Hypoxia in Models of Murine and Human Leukemia: High Efficacy of Hypoxia-Activated Prodrug PR-104. *PLoS ONE*, 6(8): e23108.

Benito, J., Zeng, Z., Konopleva, M., & Wilson, W. R. 2013. Targeting hypoxia in the leukemia microenvironment. *International journal of hematologic oncology*, 2(4): 279–288.

Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., & Sultan, C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, 33(4): 451–458.

Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2): 1183–1192.

Bigarella, C. L., Liang, R., & Ghaffari, S. 2014. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*, 141(22): 4206–4218.

Blocki, A., Wang, Y., Koch, M., Peh, P., Beyer, S., Law, P., Hui, J., & Raghunath, M. 2013. Not All MSCs Can Act as Pericytes: Functional In Vitro Assays to Distinguish Pericytes from Other Mesenchymal Stem Cells in Angiogenesis. *Stem cells and development*, 22(17): 2347–55.

Bonnet, D. 2005. Normal and leukaemic stem cells. *British Journal of Haematology*, 130(4): 469–479.

Bonnet, D., & Dick, J. E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that

originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, 3(7): 730–737.

Bosse, R. C., Wasserstrom, B., Meacham, A., Wise, E., Drusbosky, L., Walter, G. A., Chaplin, D. J., Siemann, D. W., Purich, D. L., & Cogle, C. R. 2016. Chemosensitizing AML cells by targeting bone marrow endothelial cells. *Experimental Hematology*, 44(5): 363–377.

Bray, L. J., Binner, M., Körner, Y., Von Bonin, M., Bornhäuser, M., & Werner, C. 2017. A three-dimensional ex vivo tri-culture model mimics cell-cell interactions between acute myeloid leukemia and the vascular niche. *Haematologica*, 102(7): 1215–1226.

Brewer, T. F., Garcia, F. J., Onak, C. S., Carroll, K. S., & Chang, C. J. 2015. Chemical Approaches to Discovery and Study of Sources and Targets of Hydrogen Peroxide Redox Signaling Through NADPH Oxidase Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1): 765–790.

Brown, C. M. S., Larsen, S. R., Iland, H. J., Joshua, D. E., & Gibson, J. 2012. Leukaemias into the 21st century: part 1: the acute leukaemias. *Internal medicine journal*, 42(11): 1179–1186.

Bruce, A., Evans, R., Mezan, R., Shi, L., Moses, B. S., Martin, K. H., Gibson, L. F., & Yang, Y. 2015. Three-dimensional microfluidic tri-culture model of the bone marrow microenvironment for study of acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE*, 10(10): e0140506.

Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M. P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A., & Frenette, P. S. 2014. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nature medicine*, 20(11): 1315–1320.

Burger, J. A., Spoo, A., Dwenger, A., Burger, M., & Behringer, D. 2003. CXCR4 chemokine receptors (CD184) and α4β1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34+ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis). *British Journal of Haematology*, 122(4): 579–589.

Burnett, A. K., Milligan, D., Prentice, A. G., Goldstone, A. H., McMullin, M. F., Hills, R. K., & Wheatley, K. 2007. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer*, 109(6): 1114–1124.

Butler, J. M., Nolan, D. J., Vertes, E. L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A. T., Seandel, M., Shido, K., White, I. A., Kobayashi, M., Witte, L., May, C., Shawber, C., Kimura, Y., Kitajewski, J., Rosenwaks, Z., Bernstein, I. D., & Rafii, S. 2010. Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 6(3): 251–264.

Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., Milner, L. A., Kronenberg, H. M., & Scadden, D. T. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960): 841–846.

Cancer Genome Atlas Research Network. 2013. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 368(22): 2059–2074.

Cavnar, S. P., Rickelmann, A. D., Meguiar, K. F., Xiao, A., Dosch, J., Leung, B. M., Cai Lesher-Perez, S., Chitta, S., Luker, K. E., Takayama, S., & Luker, G. D. 2015. Modeling Selective Elimination of Quiescent Cancer Cells from Bone Marrow. *Neoplasia*, 17(8): 625–633.

Ceccaldi, C., Bushkalova, R., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Bourin, P., Frugier, C., Rouzaud-Laborde, C., Cussac, D., Parini, A., Sallerin, B., & Fullana, S. G. 2014. Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. *Acta Biomaterialia*, 10(2): 901–911.

Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Capla, J. M., Galiano, R. D., Levine, J. P., & Gurtner, G. C. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*, 10(8): 858–864.

Cesarz, Z., & Tamama, K. 2016. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016: e9176357.

Cheloni, G., Tanturli, M., Tusa, I., DeSouza, N. H., Shan, Y., Gozzini, A., Mazurier, F., Rovida, E., Li, S., & Dello Sbarba, P. 2017. Targeting chronic myeloid leukemia stem cells with the hypoxia-inducible factor inhibitor acriflavine. *Blood*, 130(5): 655–665.

Chen, B. P., Galy, A., Kyoizumi, S., Namikawa, R., Scarborough, J., Webb, S., Ford, B., Cen, D. Z., & Chen, S. C. 1994. Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice. *Blood*, 84(8): 2497–2505.

Chen, G., Han, Z., Feng, D., Chen, Y., Chen, L., Wu, H., Huang, L., Zhou, C., Cai, X., Fu, C., Duan, L., Wang, X., Liu, L., Liu, X., Shen, Y., Zhu, Y., & Chen, Q. 2014. A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Molecular Cell*, 54(3): 362–377.

Chen, H., Shen, Y., Gong, F., Jiang, Y., & Zhang, R. 2015. HIF-α Promotes Chronic Myelogenous Leukemia Cell Proliferation by Upregulating p21 Expression. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 72(1): 179–183.

Chen, Y., Jacamo, R., Shi, Y. X., Wang, R. Y., Battula, V. L., Konoplev, S., Strunk, D., Hofmann, N. A., Reinisch, A., Konopleva, M., & Andreeff, M. 2012. Human extramedullary bone marrow in mice: A novel in vivo model of genetically controlled hematopoietic microenvironment. *Blood*, 119(21): 4971–4980.

Cheng, H., Zheng, Z., & Cheng, T. 2019. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell*.

Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., Van Rooijen, N., Tanaka, M., Merad, M., & Frenette, P. S. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *Journal of Experimental Medicine*, 208(2): 761–771.

Chow, D. C., Wenning, L. a, Miller, W. M., & Papoutsakis, E. T. 2001. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophysical journal*, 81(2): 685–696.

Chung, S. S., Eng, W. S., Hu, W., Khalaj, M., Garrett-Bakelman, F. E., Tavakkoli, M., Levine, R. L., Carroll, M., Klimek, V. M., Melnick, A. M., & Park, C. Y. 2017. CD99 is a therapeutic target on disease stem cells in myeloid malignancies. *Science Translational Medicine*, 9(374): eaaj2025.

Coltella, N., Percio, S., Valsecchi, R., Cuttano, R., Guarnerio, J., Ponzoni, M., Pandolfi, P. P., Melillo, G., Pattini, L., & Bernardi, R. 2014. HIF factors cooperate with PML-RARα to promote acute promyelocytic leukemia progression and relapse. *EMBO Molecular Medicine*, 6(5): 640–650.

Coltella, N., Valsecchi, R., Ponente, M., Ponzoni, M., & Bernardi, R. 2015. Synergistic Leukemia Eradication by Combined Treatment with Retinoic Acid and HIF Inhibition by EZN-2208 (PEG-SN38) in Preclinical Models of PML-RAR and PLZF-RAR -Driven Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 21(16): 3685–3694.

Costello, R. T., Mallet, F., Gaugler, B., Sainty, D., Arnoulet, C., Gastaut, J. A., & Olive, D. 2000. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Research*, 60(16): 4403–4411.

Cull, E. H., & Altman, J. K. 2014. Contemporary Treatment of APL. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 9(2): 193–201.

Danlos, F. X., Papo, M., & Micol, J. B. 2019. Clonal haematopoiesis: A concise review. *Revue de Medecine Interne*, 40(10): 684–692.

De Barros, A. P. D. N., Takiya, C. M., Garzoni, L. R., Leal-Ferreira, M. L., Dutra, H. S., Chiarini, L. B., Meirelles, M. N., Borojevic, R., & Rossi, M. I. D. 2010. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model. *PLoS ONE*, 5(2): e9093.

De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. 2016. 'Acute myeloid leukemia: A comprehensive review and 2016 update.' *Blood Cancer Journal*, 6(7): e441.

de Thé, H., Pandolfi, P. P., & Chen, Z. 2017. Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer Cell*, 32(5): 552–560.

Deeb, G., Vaughan, M. M., McInnis, I., Ford, L. A., Sait, S. N. J., Starostik, P., Wetzler, M., Mashtare, T., & Wang, E. S. 2011. Hypoxia-inducible factor-1α protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 35(5): 579–584.

Defossez, G., Le Guyader-Peyrou, S., Uhry, Z., Grosclaude, P., Colonna, M., Dantony, E., Delafosse, P., Molinié, F., Woronoff, A.-S., Bouvier, A.-M., Remontet, L., Bossard, N., & Monnereau, A. 2019. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse. *Santé publique France*, 1–20.

Desai, P., Hassane, D., & Roboz, G. J. 2019. Clonal Hematopoiesis and risk of Acute Myeloid Leukemia. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, 32(2): 177–185.

Desai, P., Mencia-Trinchant, N., Savenkov, O., Simon, M. S., Cheang, G., Lee, S., Samuel, M., Ritchie, E. K., Guzman, M. L., Ballman, K. V., Roboz, G. J., & Hassane, D. C. 2018. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nature Medicine*, 24(7): 1015–1023.

Desplat, V., Faucher, J.-L., Mahon, F. X., Dello Sbarba, P., Praloran, V., & Ivanovic, Z. 2002. Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34+ CML cells. *Stem Cells*, 20: 347–354.

Dexter, T. M., & Lajtha, L. G. 1974. Proliferation of Haemopoietic Stem Cells in Vitro. *British Journal of Haematology*, 28(4): 525–530.

Dhillon, S. 2018. Ivosidenib: First Global Approval. *Drugs*, 78(14): 1509–1516.

Di Giacomo, V., Rapino, M., Miscia, S., Di Giulio, C., & Cataldi, A. 2009. Dual role of HIF-1alpha in delivering a survival or death signal in hypoxia exposed human K562 erythroleukemia cells. *Cell Biology International*, 33(1): 49–56.

DiGiusto, D., Chen, S., Combs, J., Webb, S., Namikawa, R., Tsukamoto, A., Chen, B. P., & Galy, A. H. M. 1994. Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood*, 84(2): 421–432.

Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., Ritchey, J. K., Young, M. A., Lamprecht, T., McLellan, M. D., McMichael, J. F., Wallis, J. W., Lu, C., Shen, D., Harris, C. C., Dooling, D. J., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Chen, K., Schmidt, H., et al. 2012a. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481(7382): 506–510.

Ding, L., & Morrison, S. J. 2013. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, 495(7440): 231–235.

Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., & Morrison, S. J. 2012b. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481(7382): 457–462.

Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert,

B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H., Wei, A. H., et al. 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4): 424–447.

Döhner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. 2015. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 373(12): 1136–1152.

Dombret, H., Seymour, J. F., Butrym, A., Wierzbowska, A., Selleslag, D., Jang, J. H., Kumar, R., Cavenagh, J., Schuh, A. C., Candoni, A., Récher, C., Sandhu, I., Del Castillo, T. B., Al-ali, H. K., Martinelli, G., Falantes, J., Noppeney, R., Stone, R. M., Minden, M. D., McIntyre, H., et al. 2015. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with > 30 % blasts. *Blood*, 126(3): 291–300.

Domenech, J. 2017. What Are Mesenchymal Stromal Cells? Origin and Discovery of Mesenchymal Stromal Cells. *Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators* (pp. 1–37).

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315–7.

dos Santos, G. A., Kats, L., & Pandolfi, P. P. 2013. Synergy against PML-RARa: Targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*, 210(13): 2793–2802.

Drela, K., Sarnowska, A., Siedlecka, P., Szablowska-Gadomska, I., Wielgos, M., Jurga, M., Lukomska, B., & Domanska-Janik, K. 2014. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*, 16(7): 881–892.

Drolle, H., Wagner, M., Vasold, J., Kütt, A., Deniffel, C., Sotlar, K., Sironi, S., Herold, T., Rieger, C., & Fiegl, M. 2015. Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy. *Leukemia Research*, 39(7): 779–785.

Du, W., Hu, Y., Lu, C., Li, J., Liu, W., He, Y., Wang, P., Cheng, C., Hu, Y., Huang, S., Yao, J., & Zheng, J. 2015. Cluster of differentiation 96 as a leukemia stem cell-specific marker and a factor for prognosis evaluation in leukemia. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(4): 833–838.

Duan, C. 2016. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 310(4): C260-9.

Duarte, D., Amarteifio, S., Ang, H., Kong, I. Y., Ruivo, N., Pruessner, G., Hawkins, E. D., & Celso, C. Lo. 2019. Defining the in vivo characteristics of acute myeloid leukemia cells behavior by

intravital imaging. *Immunology & Cell Biology*, 97(2): 229–235.

Dunn, L. L., Midwinter, R. G., Ni, J., Hamid, H. A., Parish, C. R., & Stocker, R. 2014. New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(11): 1723–1742.

Egger, D., Tripisciano, C., Weber, V., Dominici, M., & Kasper, C. 2018. Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *Bioengineering*, 5(2): 1–15.

Ehninger, A., Kramer, M., Röllig, C., Thiede, C., Bornhäuser, M., Von Bonin, M., Wermke, M., Feldmann, A., Bachmann, M., Ehninger, G., & Oelschlägel, U. 2014. Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer Journal*, 4: e218.

Eliasson, P., Rehn, M., Hammar, P., Larsson, P., Sirenko, O., Flippin, L. a, Cammenga, J., & Jönsson, J.-I. 2010. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Experimental hematology*, 38(4): 301–310.

Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E. R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K. H., Poeppl, A., Ling, V., Beyene, J., Canty, A. J., Danska, J. S., Bohlander, S. K., Buske, C., Minden, M. D., Golub, T. R., Jurisica, I., Ebert, B. L., & Dick, J. E. 2011. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature Medicine*, 17(9): 1086–1094.

Farge, T., Saland, E., de Toni, F., Aroua, N., Hosseini, M., Perry, R., Bosc, C., Sugita, M., Stuani, L., Fraisse, M., Scotland, S., Larrue, C., Boutzen, H., Féliu, V., Nicolau-Travers, M. L., Cassant-Sourdy, S., Broin, N., David, M., Serhan, N., Sarry, A., et al. 2017. Chemotherapy-resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism. *Cancer Discovery*, 7(7): 716–735.

Ferrando, A. A., & López-otín, C. 2017. Clonal evolution in leukemia. *Nature Medicine*, 23(10): 1135–1145.

Fiegl, M., Samudio, I., Clise-Dwyer, K., Burks, J. K., Mnjoyan, Z., & Andreeff, M. 2009. CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure. *Blood*, 113(7): 1504–12.

Florian, S., Sonneck, K., Hauswirth, A. W., Krauth, M.-T., Schernthaner, G.-H., Sperr, W. R., & Valent, P. 2006. Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38- stem cells in various myeloid malignancies. *Leukemia & lymphoma*, 47(2): 207–222.

Fonds Anticancer, & ESMO. 2011. *Qu'est-ce que la leucémie aiguë myéloblastique ? Laissez-nous vous expliquer*.

Forristal, C. E., Brown, A. L., Helwani, F. M., Winkler, I. G., Nowlan, B., Barbier, V., Powell, R. J., Engler, G. a, Diakiw, S. M., Zannettino, a C. W., Martin, S., Pattabiraman, D., D'Andrea, R. J., Lewis, I. D., & Levesque, J. P. 2015. Hypoxia inducible factor (HIF)-2α accelerates disease progression in mouse models of leukemia and lymphoma but is not a poor prognosis factor in human AML. *Leukemia*, 29(10): 2075–85.

Forristal, C. E., Winkler, I. G., Nowlan, B., Barbier, V., Walkinshaw, G., & Levesque, J. P. 2013. Pharmacologic stabilization of HIF-1α increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood*, 121(5): 759–769.

Freireich, E. J., Wiernik, P. H., & Steensma, D. P. 2014. The Leukemias: A Half-Century of Discovery. *Journal of Clinical Oncology*, 32(31): 3463–3469.

Futrega, K., Atkinson, K., Lott, W. B., & Doran, M. R. 2017. Spheroid Coculture of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells and Monolayer Expanded Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Polydimethylsiloxane Microwells Modestly Improves In Vitro Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Expansion . *Tissue Engineering Part C: Methods*, 23(4): 200–218.

Galland, S., & Stamenkovic, I. 2019. Mesenchymal stromal cells in cancer: A review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *The Journal of Pathology*.

Gao, X. N., Yan, F., Lin, J., Gao, L., Lu, X. L., Wei, S. C., Shen, N., Pang, J. X., Ning, Q. Y., Komeno, Y., Deng, a L., Xu, Y. H., Shi, J. L., Li, Y. H., Zhang, D. E., Nervi, C., Liu, S. J., & Yu, L. 2015. AML1/ETO cooperates with HIF1α to promote leukemogenesis through DNMT3a transactivation. *Leukemia*, 29(8): 1730–1740.

Gartner, S., & Kaplan, H. S. 1980. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(8): 4756–4759.

Gezer, D., Vukovic, M., Soga, T., Pollard, P. J., & Kranc, K. R. 2014. Concise review: genetic dissection of hypoxia signaling pathways in normal and leukemic stem cells. *Stem Cells*, 32(6): 1390–1397.

Giambra, V., Jenkins, C. E., Lam, S. H., Hoofd, C., Belmonte, M., Wang, X., Gusscott, S., Gracias, D., & Weng, A. P. 2015. Leukemia stem cells in T-ALL require active Hif1α and Wnt signaling. *Blood*, 125(25): 3917–3927.

Gibbs, B. F., Yasinska, I. M., Oniku, A. E., & Sumbayev, V. V. 2011. Effects of Stem Cell Factor on Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha Accumulation in Human Acute Myeloid Leukaemia and LAD2 Mast Cells. *PLoS ONE*, 6(7): e22502.

Giuntoli, S., Rovida, E., Barbetti, V., Cipolleschi, M. G., Olivotto, M., & Dello Sbarba, P. 2006. Hypoxia suppresses BCR/Abl and selects imatinib-insensitive progenitors within clonal CML populations. *Leukemia*, 20(7): 1291–1293.

Giuntoli, S., Rovida, E., Gozzini, A., Barbetti, V., Cipolleschi, M. G., Olivotto, M., & Dello Sbarba, P. 2007. Severe hypoxia defines heterogeneity and selects highly immature progenitors within clonal erythroleukemia cells. *Stem cells*, 25(5): 1119–1125.

Giuntoli, S., Tanturli, M., Di Gesualdo, F., Barbetti, V., Rovida, E., & Dello Sbarba, P. 2011. Glucose availability in hypoxia regulates the selection of chronic myeloid leukemia progenitor subsets with different resistance to imatinib-mesylate. *Haematologica*, 96(2): 204–12.

Golan, K., Wellendorf, A., Takihara, Y., Kumari, A., Khatib-Massalha, E., Kollet, O., Cheng, H., Cheng, T., Althoff, M. J., Gur-Cohen, S., Itkin, T., Fillipi, M.-D., Cancelas, J. A., Suda, T., & Lapidot, T. 2016. Mitochondria Transfer from Hematopoietic Stem and Progenitor Cells to Pdgfrα+/Sca-1-/CD48dim BM Stromal Cells Via CX43 Gap Junctions and AMPK Signaling Inversely Regulate ROS Generation in Both Cell Populations. *Blood*, 128(22): 5. Retrieved from https://ash.confex.com/ash/2016/webprogram/Paper94553.html

Grayson, W. L., Zhao, F., Izadpanah, R., Bunnell, B., & Ma, T. 2006. Effects of Hypoxia on Human Mesenchymal Stem Cell Expansion and Plasticity in 3D Constructs. *Journal of cellular physiology*, 207(1): 331–339.

Greenberger, L. M., Horak, I. D., Filpula, D., Sapra, P., Westergaard, M., Frydenlund, H. F., Albaek, C., Schroder, H., & Orum, H. 2008. A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1 , EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(11): 3598–3608.

Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Pizzitola, I., Rouault-Pierre, K., Vargaftig, J., Taussig, D., Gribben, J., Lassailly, F., & Bonnet, D. 2014. A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(4): 520–529.

Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Vargaftig, J., Taussig, D. C., Lassailly, F., Prebet, T., Imbert, V., Nebout, M., Vey, N., Chabannon, C., Filby, A., Bollet-Quivogne, F., Gribben, J. G., Peyron, J.-F., & Bonnet, D. 2016. Frequency and Dynamics of Leukemia-Initiating Cells during Short-term Ex Vivo Culture Informs Outcomes in Acute Myeloid Leukemia Patients . *Cancer Research*, 76(8): 2082–2086.

Groen, R. W. J., Noort, W. A., Raymakers, R. A., Prins, H. J., Aalders, L., Hofhuis, F. M., Moerer, P., Van Velzen, J. F., Bloem, A. C., Van Kessel, B., Rozemuller, H., Van Binsbergen, E., Buijs, A., Yuan, H., De Bruijn, J. D., De Weers, M., Parren, P. W. H. I., Schuringa, J. J., Lokhorst, H. M., Mutis, T., et al. 2012. Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: Opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood*, 120(3): 9–17.

Guitart, A. V, Subramani, C., Armesilla-Diaz, A., Smith, G., Sepulveda, C., Gezer, D., Vukovic, M., Dunn, K., Pollard, P., Holyoake, T. L., Enver, T., Ratcliffe, P. J., & Kranc, K. R. 2013. Hif-2 alpha

is not essential for cell-autonomous hematopoietic stem cell maintenance. *Blood*, 122(10): 1741–1745.

Gupta, N., & Wish, J. B. 2017. Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitors: A Potential New Treatment for Anemia in Patients With CKD. *American Journal of Kidney Diseases*, 69(6): 815–826.

Hammoud, M., Vlaski, M., Duchez, P., Chevaleyre, J., Lafarge, X., Boiron, J.-M., Praloran, V., Brunet De La Grange, P., & Ivanovic, Z. 2012. Combination of low O2 concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34+ cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *Journal of cellular physiology*, 227(6): 2750–2758.

Hanekamp, D., Cloos, J., & Schuurhuis, G. J. 2017. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *International Journal of Hematology*, 105(5): 549–557.

Hanoun, M., Zhang, D., Mizoguchi, T., Pinho, S., Pierce, H., Kunisaki, Y., Lacombe, J., Armstrong, S. A., Dührsen, U., & Frenette, P. S. 2014. Acute myelogenous leukemia-induced sympathetic neuropathy promotes malignancy in an altered hematopoietic stem cell Niche. *Cell Stem Cell*, 15(3): 365–375.

Harrison, J. S., Rameshwar, P., Chang, V., & Bandari, P. 2002. Oxygen saturation in the bone marow of healthy volunteers. *Blood*, 99(1): 394.

Heikkilä, M., Pasanen, A., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. 2011. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3α variants in the hypoxia response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(23): 3885–3901.

Hematocell. 2019. Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers. Retrieved from http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale

Henkenius, K., Greene, B. H., Barckhausen, C., Hartmann, R., Märken, M., Kaiser, T., Rehberger, M., Metzelder, S. K., Parak, W. J., Neubauer, A., Brendel, C., & Mack, E. 2017. Maintenance of cellular respiration indicates drug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 62: 56–63.

Herault, O., Hope, K. J., Deneault, E., Mayotte, N., Chagraoui, J., Wilhelm, B. T., Cellot, S., Sauvageau, M., Andrade-Navarro, M. a., Hebert, J., & Sauvageau, G. 2012. A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells. *Journal of Experimental Medicine*, 209(5): 895–901.

Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., & Fujii-Kuriyama, Y. 1996. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Molecular and Cellular Biology*, 16(4): 1706–1713.

Hole, P. S., Darley, R. L., & Tonks, A. 2011. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood*, 117(22): 5816–5826.

Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, Å., Gradin, K., Poellinger, L., & Påhlman, S. 2006. Recruitment of HIF-1α and HIF-2α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*, 10(5): 413–423.

Holzapfel, B. M., Hutmacher, D. W., Nowlan, B., Barbier, V., Thibaudeau, L., Theodoropoulos, C., Hooper, J. D., Loessner, D., Clements, J. A., Russell, P. J., Pettit, A. R., Winkler, I. G., & Levesque, J. P. 2015. Tissue engineered humanized bone supports human hematopoiesis in vivo. *Biomaterials*, 61: 103–114.

Holzwarth, C., Vaegler, M., Gieseke, F., Pfister, S. M., Handgretinger, R., Kerst, G., & Müller, I. 2010. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Molecular Cell Biology*, 11(11).

Hong, S., Lee, H., & Kim, K. 2004. HIF-1 α: a Valid Therapeutic Target for Tumor Therapy. *Cance Research and Treatment*, 36(6): 343–353.

Hosen, N., Park, C. Y., Tatsumi, N., Oji, Y., Sugiyama, H., Gramatzki, M., Krensky, A. M., & Weissman, I. L. 2007. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26): 11008–11013.

Hu, J., Handisides, D. R., Van Valckenborgh, E., De Raeve, H., Menu, E., Vande Broek, I., Liu, Q., Sun, J. D., Van Camp, B., Hart, C. P., & Vanderkerken, K. 2010. Targeting the multiple myeloma hypoxic niche with TH-302, a hypoxia-activated prodrug. *Blood*, 116(9): 1524–1527.

Ianniciello, A., Rattigan, K. M., & Helgason, G. V. 2018. The Ins and Outs of Autophagy and Metabolism in Hematopoietic and Leukemic Stem Cells: Food for Thought. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6: e120.

Imai, T., Muz, B., Yeh, C. H., Yao, J., Zhang, R., Azab, A. K., & Wang, L. 2017. Direct measurement of hypoxia in a xenograft multiple myeloma model by optical-resolution photoacoustic microscopy. *Cancer Biology and Therapy*, 18(2): 101–105.

Isern, J., Martín-Antonio, B., Ghazanfari, R., Martín, A. M., López, J. A., DelToro, R., Sánchez-Aguilera, A., Arranz, L., Martín-Pérez, D., Suárez-Lledó, M., Marín, P., VanPel, M., Fibbe, W. E., Vázquez, J., Scheding, S., Urbano-Ispizúa, Á., & Méndez-Ferrer, S. 2013. Self-Renewing Human Bone Marrow Mesenspheres Promote Hematopoietic Stem Cell Expansion. *Cell Reports*, 3(5): 1714–1724.

Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T.,

Tomiyama, H., Saito, N., Fukata, M., Miyamoto, T., Lyons, B., Ohshima, K., Uchida, N., Taniguchi, S., Ohara, O., Akashi, K., Harada, M., & Shultz, L. D. 2007. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1315–1321.

Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J. a, Schajnovitz, A., Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P., Ledergor, G., Jung, Y., Milo, I., Poulos, M. G., Kalinkovich, A., Ludin, A., Kollet, O., Shakhar, G., Butler, J. M., Rafii, S., Adams, R. H., Scadden, D. T., Lin, C. P., & Lapidot, T. 2016. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*, 532(7599): 323–8.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., & Matsuoka, S. 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431(7011): 997–1002.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., & Kaelin, J. 2001. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science*, 292(5516): 464–468.

Iwata, M., Sandstrom, R. S., Delrow, J. J., Stamatoyannopoulos, J. A., & Torok-Storb, B. 2014. Functionally and phenotypically distinct subpopulations of marrow stromal cells are fibroblast in origin and induce different fates in peripheral blood monocytes. *Stem cells and development*, 23(7): 729–740.

Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Von Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516): 468–472.

Jan, M., Chao, M. P., Cha, A. C., Alizadeh, A. A., Gentlese, A. J., Weissmana, I. L., & Majeti, R. 2011. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12): 5009–5014.

Jang, Y., & Sharkis, S. J. 2007. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 110(8): 3056–3063.

Jensen, P. O., Mortensen, B. T., Hodgkiss, R. J., Iversen A, P. O., Christensen, I. J., Helledie, N., & Larsen, J. K. 2000. Increased cellular hypoxia and reduced proliferation of both normal and leukaemic cells during progression of acute myeloid leukaemia in rats. *Cell Proliferation*, 33(6): 381–395.

Jethava, Y. S., Sica, S., Savani, B., Socola, F., Jagasia, M., Mohty, M., Nagler, A., & Bacigalupo, A. 2017. Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation*, 52(11): 1504–1511.

Jin, L., & Wu, L. 2018. Recent Advances in Characterization of Pre-Leukemic/ Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Cellular Molecular Medecine Research*, 000(000): 0–0.

Jing, D., Fonseca, A. V., Alakel, N., Fierro, F. A., Muller, K., Bornhauser, M., Ehninger, G., Corbeil, D., & Ordemann, R. 2010. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells - modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica*, 95(4): 542–550.

Jing, D., Wobus, M., Poitz, D. M., Bornhauser, M., Ehninger, G., & Ordemann, R. 2012. Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment in vitro. *Haematologica*, 97(2): 331–339.

Jordan, C. T., Upchurch, D., Szilvassy, S. J., Guzman, M. L., Howard, D. S., Pettigrew, a L., Meyerrose, T., Rossi, R., Grimes, B., Rizzieri, D. a, Luger, S. M., & Phillips, G. L. 2000. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*, 14(10): 1777–1784.

Kantarjian, H. M., Thomas, X. G., Dmoszynska, A., Wierzbowska, A., Mazur, G., Mayer, J., Gau, J. P., Chou, W. C., Buckstein, R., Cermak, J., Kuo, C. Y., Oriol, A., Ravandi, F., Faderl, S., Delaunay, J., Lysák, D., Minden, M., & Arthur, C. 2012. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 30(21): 2670–2677.

Karpova, D., & Bonig, H. 2015. CXCR4/CXCL12 signaling in immature hematopoiesis - lessons from pharmacological and genetic models. *Stem Cells*, 33(8): 2391–2399.

Katayama, Y., Battista, M., Kao, W. M., Hidalgo, A., Peired, A. J., Thomas, S. A., & Frenette, P. S. 2006. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 124(2): 407–421.

Kawada, H., Kaneko, M., Sawanobori, M., Uno, T., Matsuzawa, H., Nakamura, Y., Matsushita, H., & Ando, K. 2013. High Concentrations of L-Ascorbic Acid Specifically Inhibit the Growth of Human Leukemic Cells via Downregulation of HIF-1α Transcription. *PLoS ONE*, 8(4): e62717.

Keith, B., Johnson, R. S., & Simon, M. C. 2012. HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature Reviews Cancer*, 12(1): 9–22.

Kersten, B., Valkering, M., Wouters, R., van Amerongen, R., Hanekamp, D., Kwidama, Z., Valk, P., Ossenkoppele, G., Zeijlemaker, W., Kaspers, G., Cloos, J., & Schuurhuis, G. J. 2016. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 173(2): 219–235.

Khan, N., Hills, R. K., Knapper, S., Steadman, L., Qureshi, U., Rector, J. L., Bradbury, C., Russell, N. H., Vyas, P., Burnett, A. K., Grimwade, D., Hole, P. S., & Freeman, S. D. 2016. Normal

hematopoietic progenitor subsets have distinct reactive oxygen species, BCL2 and cell-cycle profiles that are decoupled from maturation in acute myeloid leukemia. *PLoS ONE*, 11(9): e0163291.

Kietzmann, T., Mennerich, D., & Dimova, E. Y. 2016. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4: e11.

Kikushige, Y., & Miyamoto, T. 2013. TIM-3 as a novel therapeutic target for eradicating acute myelogenous leukemia stem cells. *International Journal of Hematology*, 98(6): 627–633.

Kim, J. A., Shim, J. S., Lee, G. Y., Yim, H. W., Kim, T. M., Kim, M., Leem, S. H., Lee, J. W., Min, C. K., & Oh, I. H. 2015a. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Research*, 75(11): 2222–2231.

Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3): 177–185.

Kim, M., Yun, H., Young, D., Byung, P., & Choi, H. 2018. Three-Dimensional Spheroid Culture Increases Exosome Secretion from Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15(4): 427–436.

Kim, S. H., Hwang, D., Park, H., Yang, E. G., Chung, H. S., & Kim, S. Y. 2015b. The action of HIF-3α variants on HIF-2α-HIF-1α heterodimer formation is directly probed in live cells. *Experimental Cell Research*, 336(2): 329–337.

Kirito, K., Fox, N., Komatsu, N., Kaushansky, K., & Tpo, T. 2005. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1α. *Hematopoiesis*, 105(11): 4258–4263.

Kocabas, F., Xie, L., Xie, J., Yu, Z., DeBerardinis, R. J., Kimura, W., Thet, S. W., Elshamy, A. F., Abouellail, H., Muralidhar, S., Liu, X., Chen, C., Sadek, H. A., Zhang, C. C., & Zheng, J. 2015. Hypoxic metabolism in human hematopoietic stem cells. *Cell and Bioscience*, 5(1): 18–25.

Kocabas, F., Zheng, J., Thet, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. a., DeBerardinis, R. J., Zhang, C., & Sadek, H. a. 2012. Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood*, 120(25): 4963–4972.

Kode, A., Manavalan, J. S., Mosialou, I., Bhagat, G., Rathinam, C. V., Luo, N., Khiabanian, H., Lee, A., Murty, V. V., Friedman, R., Brum, A., Park, D., Galili, N., Mukherjee, S., Teruya-Feldstein, J., Raza, A., Rabadan, R., Berman, E., & Kousteni, S. 2014. Leukaemogenesis induced by an activating β-catenin mutation in osteoblasts. *Nature*, 506(7487): 240–244.

Koh, M. Y., & Powis, G. 2012. Passing the baton: the HIF switch. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(9): 364–372.

Kolonko, M., & Greb-Markiewicz, B. 2019. bHLH–PAS Proteins: Their Structure and Intrinsic Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15): 3653.

Kong, D., Park, E. J., Stephen, A. G., Calvani, M., Cardellina, J. H., Monks, A., Fisher, R. J., Shoemaker, R. H., & Melillo, G. 2005. Echinomycin, a Small-Molecule Inhibitor of Hypoxia-Inducible Factor-1 DNA-Binding Activity. *Cancer Research*, 65(19): 9047–9055.

Konopleva, M., Thall, P. F., Yi, C. a., Borthakur, G., Coveler, a., Bueso-Ramos, C., Benito, J., Konoplev, S., Gu, Y., Ravandi, F., Jabbour, E., Faderl, S., Thomas, D., Cortes, J., Kadia, T., Kornblau, S., Daver, N., Pemmaraju, N., Nguyen, H. Q., Feliu, J., et al. 2015. Phase I/II study of the hypoxia-activated prodrug PR104 in refractory/relapsed acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 100(7): 927–934.

Kontos, C. K., Papageorgiou, S. G., Diamantopoulos, M. A., Scorilas, A., Bazani, E., Vasilatou, D., Gkontopoulos, K., Glezou, E., Stavroulaki, G., Dimitriadis, G., & Pappa, V. 2017. mRNA overexpression of the hypoxia inducible factor 1 alpha subunit gene (HIF1A): An independent predictor of poor overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 53: 65–73.

Kops, G. J. P. L., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W. A., Coffer, P. J., Huang, T. T., Bos, J. L., Medema, R. H., & Burgering, B. M. T. 2002. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419(6904): 316–321.

Kumar, B., Garcia, M., Weng, L., Jung, X., Murakami, J. L., Hu, X., McDonald, T., Lin, A., Kumar, A. R., Digiusto, D. L., Stein, A. S., Pullarkat, V. A., Hui, S. K., Carlesso, N., Kuo, Y. H., Bhatia, R., Marcucci, G., & Chen, C. C. 2018. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia*, 32(3): 575–587.

Kumar, S., & Geiger, H. 2017. HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends in Molecular Medicine*, 23(9): 799–819.

Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., Mar, J. C., Bergman, A., & Frenette, P. S. 2013. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, 502(7473): 637–643.

Kyoizumi, S., Baum, C. M., Kaneshima, H., McCune, J. M., Yee, E. J., & Namikawa, R. 1992. Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice. *Blood*, 79(7): 1704–1711.

Lagadinou, E. D., Sach, A., Callahan, K., Rossi, R. M., Neering, S. J., Minhajuddin, M., Ashton, J. M.,

Pei, S., Grose, V., O'Dwyer, K. M., Liesveld, J. L., Brookes, P. S., Becker, M. W., & Jordan, C. T. 2013. BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 12(3): 329–341.

Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., & Bruick, R. K. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development*, 16(12): 1466–1471.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. a, & Dick, J. E. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464): 645–648.

Larrosa-Garcia, M., & Baer, M. R. 2017. FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(6): 991–1001.

Laschke, M. W., & Menger, M. D. 2017. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends in Biotechnology*, 35(2): 133–144.

Laurenti, E., & Göttgens, B. 2018. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*, 553(7689): 418–426.

Lechman, E. R., Gentner, B., Ng, S. W. K., Schoof, E. M., van Galen, P., Kennedy, J. A., Nucera, S., Ciceri, F., Kaufmann, K. B., Takayama, N., Dobson, S. M., Trotman-Grant, A., Krivdova, G., Elzinga, J., Mitchell, A., Nilsson, B., Hermans, K. G., Eppert, K., Marke, R., Isserlin, R., et al. 2016. MiR-126 Regulates Distinct Self-Renewal Outcomes in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells. *Cancer Cell*, 29(2): 214–228.

Lee, K. E., & Simon, M. C. 2012. From stem cells to cancer stem cells: HIF takes the stage. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(2): 232–235.

Lee, K., Zhang, H., Qian, D. Z., Rey, S., Liu, J. O., & Semenza, G. L. 2009. Acriflavine inhibitis HIF-1 dimerization, tumor growth, and Vascularization, 106(42): 17910–17915.

Leek, R., Grimes, D. R., Harris, A. L., & McIntyre, A. 2016. Methods: Using Three-Dimensional Culture (Spheroids) as an In Vitro Model of Tumour Hypoxia. *Tumor microenvironment* (pp. 167–196).

Leisten, I., Kramann, R., Ventura Ferreira, M. S., Bovi, M., Neuss, S., Ziegler, P., Wagner, W., Knüchel, R., & Schneider, R. K. 2012. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials*, 33(6): 1736–1747.

Lévesque, J.-P., Winkler, I. G., Hendy, J., Williams, B., Helwani, F., Barbier, V., Nowlan, B., & Nilsson, S. K. 2007. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-

inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. *Stem cells*, 25(8): 1954–1965.

Li, Y., & Ye, D. 2010. Cancer therapy by targeting hypoxia-inducible factor-1. *Current Cancer Drug Targets*, 10(7): 782–796.

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. 2009. Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell*, 15(6): 501–513.

Lichtman, M. A. 2013. A historical perspective on the development of the cytarabine (7 days) and daunorubicin (3 days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia: 2013 the 40th anniversary of 7+3. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50(2): 119–130.

Lin, R. Z., & Chang, H. Y. 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9–10): 1172–1184.

Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., et al. 2012. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 14(2): 177–185.

Liu, P., Ma, D., Yu, Z., Zhe, N., Ren, M., Wang, P., Yu, M., Huang, J., Fang, Q., & Wang, J. 2017. Overexpression of heme oxygenase-1 in bone marrow stromal cells promotes microenvironment-mediated imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 91: 21–30.

Liu, W., Guo, M., Xu, Y.-B., Li, D., Zhou, Z.-N., Wu, Y.-L., Chen, Z., Kogan, S. C., & Chen, G.-Q. 2006. Induction of tumor arrest and differentiation with prolonged survival by intermittent hypoxia in a mouse model of acute myeloid leukemia. *Blood*, 107(2): 698–707.

Liu, Y., & Ma, T. 2015. Metabolic Regulation of Mesenchymal Stem Cell in Expansion and Therapeutic Application. *Biotechnology Progress*, 31(2): 468–481.

Luengo, A., Gui, D. Y., & Heiden, M. G. Vander. 2017. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chemical Biology*, 24(9): 1161–1180.

Luppi, M., Fabbiano, F., Visani, G., Martinelli, G., & Venditti, A. 2018. Novel agents for acute myeloid leukemia. *Cancers*, 10(11): e429.

Magliulo, D., & Bernardi, R. 2018. HIF-α factors as potential therapeutic targets in leukemia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(11): 917–928.

Mantel, C. R., O'Leary, H. A., Chitteti, B. R., Huang, X., Cooper, S., Hangoc, G., Brustovetsky, N., Srour, E. F., Lee, M. R., Messina-Graham, S., Haas, D. M., Falah, N., Kapur, R., Pelus, L. M.,

Bardeesy, N., Fitamant, J., Ivan, M., Kim, K.-S., & Broxmeyer, H. E. 2015. Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock. *Cell*, 161(7): 1553–1565.

Marin, J. J. G., Briz, O., Rodríguez-Macias, G., Díez-Martín, J. L., & Macias, R. I. R. 2016. Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*, 30(1): 55–64.

Marlein, C. R., Zaitseva, L., Piddock, R. E., Robinson, S. D., Edwards, D. R., Shafat, M. S., Zhou, Z., Lawes, M., Bowles, K. M., & Rushworth, S. A. 2017. NADPH oxidase-2 derived superoxide drives mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to leukemic blasts. *Blood*, 130(14): 1649–1660.

Marshall, J., Barnes, A., & Genever, P. 2018. Analysis of the Intrinsic Self-Organising Properties of Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Co-Culture Models with Endothelial Cells. *Bioengineering*, 5(4): e92.

Martin, S. K., Diamond, P., Gronthos, S., Peet, D. J., & Zannettino, A. C. W. 2011. The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia*, 25(10): 1533–1542.

Maryanovich, M., Oberkovitz, G., Niv, H., Vorobiyov, L., Zaltsman, Y., Brenner, O., Lapidot, T., Jung, S., & Gross, A. 2012. The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. *Nature Cell Biology*, 14(5): 535–541.

Matak, D., Brodaczewska, K. K., Lipiec, M., Szymanski, Ł., Szczylik, C., & Czarnecka, A. M. 2017. Colony, hanging drop, and methylcellulose three dimensional hypoxic growth optimization of renal cell carcinoma cell lines. *Cytotechnology*, 69(4): 565–578.

Matsunaga, T., Imataki, O., Torii, E., Kameda, T., Shide, K., Shimoda, H., Kamiunten, a., Sekine, M., Taniguchi, Y., Yamamoto, S., Hidaka, T., Katayose, K., Kubuki, Y., Dobashi, H., Bandoh, S., Ohnishi, H., Fukai, F., & Shimoda, K. 2012. Elevated HIF-1α expression of acute myelogenous leukemia stem cells in the endosteal hypoxic zone may be a cause of minimal residual disease in bone marrow after chemotherapy. *Leukemia Research*, 36(6): e122–e124.

Maynard, M. a, Qi, H., Chung, J., Lee, E. H. L., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R. C., Conaway, J. W., & Ohh, M. 2003. Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *The Journal of biological chemistry*, 278(13): 11032–11040.

McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M., & Weissman, I. L. 1988. The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*, 241(4873): 1632–1639.

Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., & Frenette, P. S. 2008. Haematopoietic stem cell release is

regulated by circadian oscillations. *Nature*, 452(7186): 442–447.

Méndez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., MacArthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N., & Frenette, P. S. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466(7308): 829–834.

Mimeault, M., & Batra, S. K. 2013. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1): 30–54.

Miyoshi, H., Morita, M., Ohshima, N., & Sato, C. 2015. Expansion of mouse hematopoietic progenitor cells in three-dimensional cocultures on frozen-thawed stromal cell layers formed within porous scaffolds. *Experimental Hematology*, 43(2): 115–124.

Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., & Quiñones-Hinojosa, A. 2010. Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 7(2): 150–161.

Moloney, J. N., & Cotter, T. G. 2018. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80: 50–64.

Monnereau, A., Uhry, Z., Cowppli-Bony, A., Voirin, N., Delafosse, P., Remontet, L., Troussard, X., & Maynadié, M. 2016. Survie des personnes atteintes de cancers solides en France métropolitaine, 1989–2013. Partie 2 - Hémopathies malignes. *Institut de veille sanitaire*, 1–148.

Mortera-Blanco, T., Rende, M., Macedo, H., Farah, S., Bismarck, A., Mantalaris, A., & Panoskaltsis, N. 2012. Ex vivo mimicry of normal and abnormal human hematopoiesis. *Journal of Visualized Experiments*, (62): e3654.

Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., Saland, E., Castellano, R., Pouyet, L., Collette, Y., Vey, N., Chabannon, C., Recher, C., Sarry, J.-E., Alcor, D., Peyron, J.-F., & Griessinger, E. 2016. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood*, 128(2): 253–264.

Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Fujioka, M., & Suda, T. 2014. Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 454(2): 353–357.

Neufeld, T. P. 2012. Autophagy and cell growth - the yin and yang of nutrient responses. *Journal of Cell Science*, 125(10): 2359–2368.

Ng, S. W. K., Mitchell, A., Kennedy, J. A., Chen, W. C., McLeod, J., Ibrahimova, N., Arruda, A., Popescu, A., Gupta, V., Schimmer, A. D., Schuh, A. C., Yee, K. W., Bullinger, L., Herold, T., Görlich, D., Büchner, T., Hiddemann, W., Berdel, W. E., Wörmann, B., Cheok, M., et al. 2016. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*, 540(7633):

433–437.

Nguyen-Khac, F., Della Valle, V., Lopez, R. G., Ravet, E., Mauchauffé, M., Friedman, a D., Huang, L. E., Fichelson, S., Ghysdael, J., & Bernard, O. a. 2006. Functional analyses of the TEL-ARNT fusion protein underscores a role for oxygen tension in hematopoietic cellular differentiation. *Oncogene*, 25(35): 4840–4847.

Nilsson, S. K., Johnston, H. M., Whitty, G. A., Williams, B., Webb, R. J., Denhardt, D. T., Bertoncello, I., Bendall, L. J., Simmons, P. J., & Haylock, D. N. 2005. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 106(4): 1232–1239.

Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K. J., Mahoney, J. E., Park, S.-Y., Lu, J., Protopopov, A., Harley, B., & Silberstein, L. E. 2013. Quantitative Imaging of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell localization and hypoxic status in the Bone Marrow microenvironment. *Nature Cell Biology*, 15(5): 533–543.

Nombela-Arrieta, C., & Silberstein, L. E. 2014. The science behind the hypoxic niche of hematopoietic stem and progenitors. *Hematology*, 2014(1): 542–547.

Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V., & Kaelin, W. G. 2000. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β-domain of the von Hippel - Lindau protein. *Nature Cell Biology*, 2(7): 423–427.

Palazon, A., Goldrath, A. W., Nizet, V., & Johnson, R. S. 2014. HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. *Immunity*, 41(4): 518–528.

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Roberts, N. D., Potter, N. E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., Van Loo, P., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O'Meara, S., Raine, K., Jones, D. R., Teague, J. W., et al. 2016. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(23): 2209–2221.

Pasanen, A., Heikkilä, M., Rautavuoma, K., Hirsilä, M., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. 2010. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3α is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(7): 1189–1200.

Patel, S. a, & Simon, M. C. 2008. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell death and differentiation*, 15(4): 628–634.

Patterson, A. V., Ferry, D. M., Edmunds, S. J., Gu, Y., Singleton, R. S., Patel, K., Pullen, S. M., Hicks, K. O., Syddall, S. P., Atwell, G. J., Yang, S., Denny, W. a., & Wilson, W. R. 2007. Mechanism of Action and Preclinical Antitumor Activity of the Novel Hypoxia-Activated DNA Cross-Linking

Agent PR-104. *Clinical Cancer Research*, 13(13): 3922–3932.

Pedersen, M., Löfstedt, T., Sun, J., Holmquist-Mengelbier, L., Påhlman, S., & Rönnstrand, L. 2008. Stem cell factor induces HIF-1α at normoxia in hematopoietic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1): 98–103.

Peng, G., & Liu, Y. 2015. Hypoxia-inducible factors in cancer stem cells and inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(6): 374–383.

Pennock, R., Bray, E., Pryor, P., James, S., McKeegan, P., Sturmey, R., & Genever, P. 2015. Human cell dedifferentiation in mesenchymal condensates through controlled autophagy. *Scientific Reports*, 5: e13113.

Petit, C., Gouel, F., Dubus, I., Heuclin, C., Roget, K., & Vannier, J. P. 2016. Hypoxia promotes chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia cell lines by modulating death signaling pathways. *BioMed Central Cancer*, 16(1): e746.

Pinho, S., & Frenette, P. S. 2019. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(5): 303–320.

Ploemacher, R. E., van der Sluijs, J. P., Voerman, J. S. A., & Brons, N. H. C. 1989. An In Vitro Limiting-Dilution Assay of Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells in the Mouse. *Blood*, 74(8): 2755–2763.

Pollyea, D. A., Gutman, J. A., Gore, L., Smith, C. A., & Jordan, C. T. 2014. Targeting acute myeloid leukemia stem cells: a review and principles for the development of clinical trials. *Haematologica*, 99(8): 1277–1284.

Ponce, L. P., Fenn, N. C., Moritz, N., Krupka, C., Kozik, J. H., Lauber, K., Subklewe, M., & Hopfner, K. P. 2017. SIRPα-antibody fusion proteins stimulate phagocytosis and promote elimination of acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*, 8(7): 11284–11301.

Ponomaryov, T., Peled, A., Petit, I., Taichman, R. S., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Magerus, A., Caruz, A., Fujii, N., Nagler, A., Lahav, M., Szyper-Kravitz, M., Zipori, D., & Lapidot, T. 2000. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *Journal of Clinical Investigation*, 106(11): 1331–1339.

Portwood, S., Lal, D., Hsu, Y. C., Vargas, R., Johnson, M. K., Wetzler, M., Hart, C. P., & Wang, E. S. 2013. Activity of the Hypoxia-Activated Prodrug, TH-302, in Preclinical Human Acute Myeloid Leukemia Models. *Clinical Cancer Research*, 19(23): 6506–6519.

Raaijmakers, M. H. G. P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J. A., Ebert, B. L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R. P., Scadden, E. O., Aung, Z., Matza, M., Merkenschlager, M., Lin, C., Rommens, J. M., & Scadden, D. T. 2010. Bone progenitor dysfunction induces

myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*, 464(7290): 852–857.

Radwan, S. M., Hamdy, N. M., Hegab, H. M., & El-Mesallamy, H. O. 2016. Beclin-1 and hypoxia-inducible factor-1α genes expression: Potential biomarkers in acute leukemia patients. *Cancer Biomarkers*, 16(4): 619–626.

Rafii, S., Shapiro, F., Pettengell, R., Ferris, B., Nachman, R. L., Moore, M. A. S., & Asch, A. S. 1995. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood*, 86(9): 3353–3363.

Rankin, E. B., & Giaccia, A. J. 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation*, 15(4): 678–685.

Rashidi, A., & DiPersio, J. F. 2016. Targeting the leukemia–stroma interaction in acute myeloid leukemia: rationale and latest evidence. *Therapeutic Advances in Hematology*, 7(1): 40–51.

Reagan, M. R., Mishima, Y., Glavey, S. V, Zhang, Y., Manier, S., Lu, Z. N., Memarzadeh, M., Zhang, Y., Sacco, A., Aljawai, Y., Shi, J., Tai, Y., John, E., Kaplan, D. L., Roccaro, A. M., Ghobrial, I. M., & Ready, J. E. 2014. Investigating osteogenic differentiation in multiple myeloma using a novel 3D bone marrow niche model. *Blood*, 124(22): 3250–3259.

Redondo-Castro, E., Cunningham, C. J., Miller, J., Cain, S., Allan, S. M., & Pinteaux, E. 2018. Generation of Human Mesenchymal Stem Cell 3D Spheroids Using Low-binding Plates. *Bio Protocol*, 8(16): e2968.

Reinisch, A., Hernandez, D. C., Schallmoser, K., & Majeti, R. 2017. Generation and use of a humanized bone-marrow-ossicle niche for hematopoietic xenotransplantation into mice. *Nature Protocols*, 12(10): 2169–2178.

Reinisch, A., Thomas, D., Corces, M. R., Zhang, X., Gratzinger, D., Hong, W.-J., Schallmoser, K., Strunk, D., & Majeti, R. 2016. A humanized bone marrow ossicle xenotransplantation model enables improved engraftment of healthy and leukemic human hematopoietic cells. *Nature Medicine*, 22(7): 812–821.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. 2001. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Stem Cells*, 414(6859): 105–111.

Rezvani, H. R., Rossignol, R., Ali, N., Benard, G., Tang, X., Yang, H. S., Jouary, T., de Verneuil, H., Taïeb, A., Kim, A. L., & Mazurier, F. 2011. XPC silencing in normal human keratinocytes triggers metabolic alterations through NOX-1 activation-mediated reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(6): 609–619.

Richardson, C., Yan, S., & Vestal, C. 2015. Oxidative Stress, Bone Marrow Failure, and Genome Instability in Hematopoietic Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2):

2366–2385.

Riffle, S., & Hegde, R. S. 2017. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1): e102.

Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J., Strowig, T., Gearty, S. V., Teichmann, L. L., Saito, Y., Marches, F., Halene, S., Palucka, A. K., Manz, M. G., & Flavell, R. A. 2014. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nature Biotechnology*, 32(4): 364–372.

Rouault-Pierre, K., Lopez-Onieva, L., Foster, K., Anjos-Afonso, F., Lamrissi-Garcia, I., Serrano-Sanchez, M., Mitter, R., Ivanovic, Z., de Verneuil, H., Gribben, J., Taussig, D., Rezvani, H. R., Mazurier, F., & Bonnet, D. 2013. HIF-2α Protects Human Hematopoietic Stem/Progenitors and Acute Myeloid Leukemic Cells from Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Stem Cell*, 13(5): 549–563.

Rytelewski, M., Haryutyunan, K., Nwajei, F., Shanmugasundaram, M., Wspanialy, P., Zal, M. A., Chen, C. H., El Khatib, M., Plunkett, S., Vinogradov, S. A., Konopleva, M., & Zal, T. 2019. Merger of dynamic two-photon and phosphorescence lifetime microscopy reveals dependence of lymphocyte motility on oxygen in solid and hematological tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1): e78.

Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. 2014. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature Reviews Cancer*, 14(11): 709–721.

Saito, Y., Kitamura, H., Hijikata, A., Tomizawa-murasawa, M., Tanaka, S., Takagi, S., Uchida, N., Suzuki, N., Sone, A., Najima, Y., Ozawa, H., Wake, A., Taniguchi, S., Shultz, L. D., Ohara, O., & Ishikawa, F. 2010. Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells. *Science Translational Medicine*, 2(17): 17ra9.

Saleh, F. A., Frith, J. E., Lee, J. A., & Genever, P. G. 2012. Three-Dimensional In Vitro Culture Techniques for Mesenchymal Stem Cells. *Progenitor Cells: Methods and Protocols* (Vol. 916, pp. 31–45).

Saleh, F. A., Whyte, M., & Genever, P. G. 2011. Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model. *European Cells and Materials*, 22: 242–257.

Salomon-Nguyen, F., Della-Valle, V., Mauchauffé, M., Busson-le Coniat, M., Ghysdael, J., Berger, R., & Bernard, O. A. 2000. The t(1;12)(q21;p13) translocation of human acute myeloblastic leukemia results in a TEL-ARNT fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12): 6757–6762.

Sarry, J., Murphy, K., Perry, R., Sanchez, P. V, Secreto, A., Keefer, C., Swider, C. R., Strzelecki, A.,

Cavelier, C., Récher, C., Mas, V. M., Delabesse, E., Danet-Desnoyers, G., & Carroll, M. 2011. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rγc-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(1): 384–295.

Sart, S., Tsai, A.-C., Li, Y., & Ma, T. 2014. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 20(5): 365–380.

Schepers, K., Campbell, T. B., & Passegué, E. 2015. Normal and Leukemic Stem Cell Niches: Insights and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*, 16(3): 254–267.

Schepers, K., Pietras, E. M., Reynaud, D., Flach, J., Binnewies, M., Garg, T., Wagers, A. J., Hsiao, E. C., & Passegué, E. 2013. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*, 13(3): 285–299.

Schmal, O., Seifert, J., Schäffer, T., Walter, C. B., Aicher, W. K., & Klein, G. 2015. Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion in Contact with Mesenchymal Stromal Cells in a Hanging Drop Model Uncovers Disadvantages of 3D. *Stem Cells International*, 2016: e4148093.

Scortegagna, M., Ding, K., Oktay, Y., Gaur, A., Thurmond, F., Yan, L. J., Marck, B. T., Matsumoto, A. M., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Bennet, M. J., & Garcia, J. A. 2003a. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1-/- mice. *Nature Genetics*, 35(4): 331–340.

Scortegagna, M., Morris, M. a, Oktay, Y., Bennett, M., & Garcia, J. a. 2003b. The HIF family member EPAS1 / HIF-2α is required for normal hematopoiesis in mice. *Differences*, 102(5): 1634–1640.

Selak, M. A., Armour, S. M., MacKenzie, E. D., Boulahbel, H., Watson, D. G., Mansfield, K. D., Pan, Y., Simon, M. C., Thompson, C. B., & Gottlieb, E. 2005. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 7(1): 77–85.

Semenza, G. L. 2012. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(4): 207–214.

Semenza, G. L. 2013. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(9): 3664–3671.

Semenza, G. L., & Wang, G. L. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*, 12(12): 5447–5454.

Senn, J. S., McCulloch, E. A., & Till, J. E. 1967. Comparison of colony-forming ability of normal and leukaemic human marrow in cell culture. *The Lancet*, 2(7516): 597–598.

Shafat, M. S., Oellerich, T., Mohr, S., Robinson, S. D., Edwards, D. R., Marlein, C. R., Piddock, R. E.,

Fenech, M., Zaitseva, L., Abdul-Aziz, A., Turner, J., Watkins, J. A., Lawes, M., Bowles, K. M., & Rushworth, S. A. 2017. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood*, 129(10): 1320–1332.

Shah, S., & Kang, K. 2018. Two-Cell Spheroid Angiogenesis Assay System Using Both Endothelial Colony Forming Cells and Mesenchymal Stem Cells. *Biomolecules & Therapeutics*, 26(5): 474–480.

Sharma, M. B., Limaye, L. S., & Kale, V. P. 2012. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: Recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. *Haematologica*, 97(5): 651–660.

Shearier, E., Xing, Q., Qian, Z., & Zhao, F. 2016. Physiologically Low Oxygen Enhances Biomolecule Production and Stemness of Mesenchymal Stem Cell Spheroids. *Tissue Engineering Part C*, 22(4): 360–369.

Shlush, L. I., Mitchell, A., Heisler, L., Abelson, S., Ng, S. W. K., Trotman-Grant, A., Medeiros, J. J. F., Rao-Bhatia, A., Jaciw-Zurakowsky, I., Marke, R., McLeod, J. L., Doedens, M., Bader, G., Voisin, V., Xu, C., McPherson, J. D., Hudson, T. J., Wang, J. C. Y., Minden, M. D., & Dick, J. E. 2017. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature*, 547(7661): 104–108.

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., McLeod, J. L., Doedens, M., Medeiros, J. J. F., Marke, R., Kim, H. J., Lee, K., McPherson, J. D., Hudson, T. J., Brown, A. M. K., Trinh, Q. M., et al. 2014. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*, 506(7488): 328–333.

Sieber, S., Wirth, L., Cavak, N., Koenigsmark, M., Marx, U., Lauster, R., & Rosowski, M. 2018. Bone marrow-on-a-chip: Long-term culture of human haematopoietic stem cells in a three-dimensional microfluidic environment. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2): 479–489.

Silveira, V. S., Freire, B. M. R., Borges, K. S., Andrade, A. F., Cruzeiro, G. a. V., Sabino, J. P. J., Glass, M. L., Yunes, J. A., Brandalise, S. R., Tone, L. G., & Scrideli, C. A. 2014. Hypoxia-related gene expression profile in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Leukemia & Lymphoma*, 55(8): 1751–1757.

Škrtić, M., Sriskanthadevan, S., Jhas, B., Gebbia, M., Wang, X., Wang, Z., Hurren, R., Jitkova, Y., Gronda, M., Maclean, N., Lai, C. K., Eberhard, Y., Bartoszko, J., Spagnuolo, P., Rutledge, A. C., Datti, A., Ketela, T., Moffat, J., Robinson, B. H., Cameron, J. H., et al. 2011. Inhibition of Mitochondrial Translation as a Therapeutic Strategy for Human Acute Myeloid Leukemia. *Cancer*

Cell, 20(5): 674–688.

Song, K., Li, M., Xu, X.-J., Xuan, L., Huang, G.-N., Song, X.-L., & Liu, Q.-F. 2014. HIF-1α and GLUT1 Gene Expression is Associated with Chemoresistance of Acute Myeloid Leukemia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(4): 1823–1829.

Spencer, J. A., Ferraro, F., Roussakis, E., Klein, A., Wu, J., Runnels, J. M., Zaher, W., Mortensen, L. J., Alt, C., Turcotte, R., Yusuf, R., Côté, D., Vinogradov, S. A., Scadden, D. T., & Lin, C. P. 2014. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*, 508(7495): 269–273.

Speth, J. M., Hoggatt, J., Singh, P., & Pelus, L. M. 2014. Pharmacologic increase in HIF1α enhances hematopoietic stem and progenitor homing and engraftment. *Blood*, 123(2): 203–207.

Stein, E. M., DiNardo, C. D., Pollyea, D. A., Fathi, A. T., Roboz, G. J., Altman, J. K., Stone, R. M., Deangelo, D. J., Levine, R. L., Flinn, I. W., Kantarjian, H. M., Collins, R., Patel, M. R., Frankel, A. E., Stein, A., Sekeres, M. A., Swords, R. T., Medeiros, B. C., Willekens, C., Vyas, P., et al. 2017. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 130(6): 722–731.

Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. 2006. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity*, 25(6): 977–988.

Sun, R., Meng, X., Pu, Y., Sun, F., Man, Z., Zhang, J., Yin, L., & Pu, Y. 2019. Overexpression of HIF-1a could partially protect K562 cells from 1,4-benzoquinone induced toxicity by inhibiting ROS, apoptosis and enhancing glycolysis. *Toxicology in Vitro*, 55: 18–23.

Sutherland, H. J., Eaves, C. J., Lansdorp, P. M., Thacker, J. D., & Hogge, D. E. 1991. Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. *Blood*, 78(3): 666–672.

Tahara, E. B., Navarete, F. D. T., & Kowaltowski, A. J. 2009. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(9): 1283–1297.

Taichman, R. S., & Emerson, S. G. 1994. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine*, 179(5): 1677–1682.

Taichman, R. S., Reilly, M. J., & Emerson, S. G. 1996. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in in vitro bone marrow cultures. *Blood*, 87(2): 518–524.

Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R. S.,

Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. 2010. Regulation of the HIF-1α Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7(3): 391–402.

Takubo, K., & Suda, T. 2012. Roles of the hypoxia response system in hematopoietic and leukemic stem cells. *International Journal of Hematology*, 95(5): 478–483.

Tamama, K., Kawasaki, H., Kerpedjieva, S. S., Guan, J., Ganju, R. K., & Sen, C. K. 2011. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *Journal of cellular biochemistry*, 112(3): 804–817.

Taussig, D. C., Miraki-moud, F., Anjos-afonso, F., Pearce, D. J., Allen, K., Ridler, C., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S. G., Lister, T. A., Gribben, J. G., & Bonnet, D. 2008. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating celss. *Blodd*, 112(3): 568–575.

Terwijn, M., Feller, N., van Rhenen, A., Kelder, A., Westra, G., Zweegman, S., Ossenkoppele, G., & Schuurhuis, G. J. 2009. Interleukin-2 receptor alpha-chain (CD25) expression on leukaemic blasts is predictive for outcome and level of residual disease in AML. *European Journal of Cancer*, 45(9): 1692–1699.

Till, J. E., & McCulloch, E. A. 1961. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research*, 14(2): 213–222.

Tong, H., Hu, C., Zhuang, Z., Wang, L., & Jin, J. 2012. Hypoxia-inducible factor-1α expression indicates poor prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leukemia & lymphoma*, 53(12): 2412–2418.

Torok-Storb, B., Iwata, M., Graf, L., Gianotti, J., Horton, H., & Byrne, M. C. 1999. Dissecting the marrow microenvironment. *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 872, pp. 164–170).

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B. J., Lee, B. H., Castrillon, D. H., Cullen, D. E., McDowell, E. P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I. R., Sears, C., Armstrong, S. A., Passegué, E., DePinho, R. A., & Gilliland, D. G. 2007. FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell*, 128(2): 325–339.

Travlos, G. S. 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicologic Pathology*, 34(5): 548–565.

Tsai, A.-C., Liu, Y., Yuan, X., & Ma, T. 2015. Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. *Tissue engineering. Part A*, 21(9–10): 1705–1719.

Vaidya, A., & Kale, V. 2015. Hematopoietic stem cells, their niche, and the concept of co-culture systems: A critical review. *Journal of Stem Cells*, 10(1): 13–31.

van Gosliga, D., Schepers, H., Rizo, A., van der Kolk, D., Vellenga, E., & Schuringa, J. J. 2007. Establishing long-term cultures with self-renewing acute myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Experimental Hematology*, 35(10): 1538–1549.

van Rhenen, A., Dongen, G. A. M. S. Van, Rombouts, E. J., Feller, N., Moshaver, B., Walsum, M. S., Zweegman, S., Ossenkoppele, G. J., & Schuurhuis, G. J. 2007a. The novel AML stem cell – associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*, 110(7): 2659–2666.

van Rhenen, A., Moshaver, B., Kelder, A., Feller, N., Nieuwint, A. W. M., Zweegman, S., Ossenkoppele, G. J., & Schuurhuis, G. J. 2007b. Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia*, 21(8): 1700–1707.

Velasco-Hernandez, T., Hyrenius-Wittsten, A., Rehn, M., Bryder, D., & Cammenga, J. 2014. HIF-1α can act as a tumor suppressor gene in murine Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, 124(24): 3597–3607.

Velasco-Hernandez, T., Soneji, S., Hidalgo, I., Erlandsson, E., Cammenga, J., & Bryder, D. 2019. Hif-1α Deletion May Lead to Adverse Treatment Effect in a Mouse Model of MLL-AF9-Driven AML. *Stem Cell Reports*, 12(1): 112–121.

Velasco-Hernandez, T., Tornero, D., & Cammenga, J. 2015. Loss of HIF-1α accelerates murine FLT-3ITD-induced myeloproliferative neoplasia. *Leukemia*, 29(12): 2366–2374.

Vergez, F., Green, A. S., Tamburini, J., Sarry, J. E., Gaillard, B., Cornillet-Lefebvre, P., Pannetier, M., Neyret, A., Chapuis, N., Ifrah, N., Dreyfus, F., Manenti, S., Demur, C., Delabesse, E., Lacombe, C., Mayeux, P., Bouscary, D., Recher, C., & Bardet, V. 2011. High levels of CD34 +CD38 low/-CD123 + blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: A groupe ouest-est des leucémies aiguës et maladies du sang (GOELAMS) study. *Haematologica*, 96(12): 1792–1798.

Vukovic, M., Guitart, A. V., Sepulveda, C., Villacreces, A., O'Duibhir, E., Panagopoulou, T. I., Ivens, A., Menendez-Gonzalez, J., Iglesias, J. M., Allen, L., Glykofrydis, F., Subramani, C., Armesilla-Diaz, A., Post, A. E. M., Schaak, K., Gezer, D., So, C. W. E., Holyoake, T. L., Wood, A., O'Carroll, D., et al. 2015. Hif-1α and Hif-2α synergize to suppress AML development but are dispensable for disease maintenance. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(13): 2223–2234.

Walkley, C. R., Olsen, G. H., Dworkin, S., Fabb, S. A., Swann, J., McArthur, G. A. A., Westmoreland, S. V., Chambon, P., Scadden, D. T., & Purton, L. E. 2007a. A Microenvironment-Induced Myeloproliferative Syndrome Caused by Retinoic Acid Receptor γ Deficiency. *Cell*, 129(6): 1097–

1110.

Walkley, C. R., Shea, J. M., Sims, N. A., Purton, L. E., & Orkin, S. H. 2007b. Rb Regulates Interactions between Hematopoietic Stem Cells and Their Bone Marrow Microenvironment. *Cell*, 129(6): 1081–1095.

Wallace, E. M., Rizzi, J. P., Han, G., Wehn, P. M., Cao, Z., Du, X., Cheng, T., Czerwinski, R. M., Dixon, D. D., Goggin, B. S., Grina, J. A., Halfmann, M. M., Maddie, M. A., Olive, S. R., Schlachter, S. T., Tan, H., Wang, B., Wang, K., Xie, S., Xu, R., et al. 2016. A small-molecule antagonist of HIF2α is efficacious in preclinical models of renal cell carcinoma. *Cancer Research*, 76(18): 5491–5500.

Walter, M. J., Shen, D., Ding, L., Shao, J., Koboldt, D. C., Chen, K., Larson, D. E., McLellan, M. D., Dooling, D., Abbott, R., Fulton, R., Magrini, V., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O'Laughlin, M., Fan, X., Grillot, M., Witowski, S., Heath, S., Frater, J. L., et al. 2012. Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 366(12): 1090–1098.

Wang, A., & Zhong, H. 2018. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematology*, 23(10): 729–739.

Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. a, & Semenza, G. L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12): 5510–5514.

Wang, J., Liu, X., Qiu, Y., Shi, Y., Cai, J., Wang, B., Wei, X., Ke, Q., Sui, X., Wang, Y., Huang, Y., Li, H., Wang, T., Lin, R., Liu, Q., & Xiang, A. P. 2018. Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of Hematology and Oncology*, 11(1): 11.

Wang, Y., Liu, Y., Malek, S. N., Zheng, P., & Liu, Y. 2011. Targeting HIF1α Eliminates Cancer Stem Cells in Hematological Malignancies. *Cell Stem Cell*, 8(4): 399–411.

Wang, Y., Liu, Y., Tang, F., Bernot, K. M., Schore, R., Marcucci, G., Caligiuri, M. a, & Zheng, P. 2014. Echinomycin protects mice against relapsed acute myeloid leukemia without adverse effect on hematopoietic stem cells. *Blood*, 124(7): 1127–1136.

Warfel, N. A., Sainz, A. G., Song, J. H., & Kraft, A. S. 2016. PIM Kinase Inhibitors Kill Hypoxic Tumor Cells by Reducing Nrf2 Signaling and Increasing Reactive Oxygen Species, 15(7): 1637–1647.

Welch, J. S., Ley, T. J., Link, D. C., Miller, C. A., Larson, D. E., Koboldt, D. C., Wartman, L. D., Lamprecht, T. L., Liu, F., Xia, J., Kandoth, C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Dooling, D. J., Wallis, J. W., Chen, K., Harris, C. C., Schmidt, H. K., Kalicki-Veizer, J. M., Lu, C., et al. 2012. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, 150(2): 264–278.

Wellmann, S., Guschmann, M., Griethe, W., Eckert, C., Stackelberg, A., Lottaz, C., Moderegger, E., Einsiedel, H. G., Eckardt, K.-U., Henze, G., & Seeger, K. 2004. Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia*, 18(5): 926–933.

Wilson, A., & Trumpp, A. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 6(2): 93–106.

Winkler, I. G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R. N., Forristal, C. E., Patton, J. T., Magnani, J. L., & Lévesque, J. P. 2012. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nature Medicine*, 18(11): 1651–1657.

Winkler, I. G., Sims, N. A., Pettit, A. R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I. J., Van Rooijen, N., Alexander, K. A., Raggatt, L. J., & Lévesque, J. P. 2010. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, 116(23): 4815–4828.

Wuchter, P., Saffrich, R., Giselbrecht, S., Nies, C., Lorig, H., Kolb, S., Ho, A. D., & Gottwald, E. 2016. Microcavity arrays as an in vitro model system of the bone marrow niche for hematopoietic stem cells. *Cell and Tissue Research*, 364(3): 573–584.

Xu, J., Zheng, L., Chen, J., Sun, Y., Lin, H., Jin, R., Tang, M., Liang, X., & Cai, X. 2017. Increasing AR by HIF-2 α inhibitor (PT-2385) overcomes the side-effects of sorafenib by suppressing hepatocellular carcinoma invasion via alteration of pSTAT3 , pAKT and pERK signals. *Nature Publishing Group*, 8(10): e3095.

Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M. M., Karlsson, S., Iwama, A., & Nakauchi, H. 2011. Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*, 147(5): 1146–1158.

Yang, S. L., Wu, C., Xiong, Z. F., & Fang, X. 2015. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Molecular medicine reports*, 12(2): 2411–2416.

Zagozdzon, R., & Golab, J. 2015. Cancer stem cells in haematological malignancies. *Contemporary oncology*, 19(1A): A1–A6.

Zambetti, N. A., Ping, Z., Chen, S., Kenswil, K. J. G., Mylona, M. A., Sanders, M. A., Hoogenboezem, R. M., Bindels, E. M. J., Adisty, M. N., Van Strien, P. M. H., van der Leije, C. S., Westers, T. M., Cremers, E. M. P., Milanese, C., Mastroberardino, P. G., van Leeuwen, J. P. T. M., van der Eerden, B. C. J., Touw, I. P., Kuijpers, T. W., Kanaar, R., et al. 2016. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Cell Stem Cell*, 19(5): 613–627.

Zeijlemaker, W., Kelder, A., Oussoren-Brockhoff, Y. J. M., Scholten, W. J., Snel, A. N., Veldhuizen, D., Cloos, J., Ossenkoppele, G. J., & Schuurhuis, G. J. 2016. A simple one-tube assay for

immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 30(2): 439–446.

Zhang, C. C., & Sadek, H. A. 2014. Hypoxia and Metabolic Properties of Hematopoietic Stem Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(12): 1891–1901.

Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L. A., Yee, S. T., Jin, H. B., Wesley, J. B., Gonzalez, F. J., & Semenza, G. L. 2008. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16): 10892–10903.

Zhang, H., Li, H., Xi, H. S., & Li, S. 2012. HIF1α is required for survival maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood*, 119(11): 2595–2607.

Zhang, H., Li, L., Li, M., Huang, X., Xie, W., Xiang, W., & Yao, P. 2017. Combination of betulinic acid and chidamide inhibits acute myeloid leukemia by suppression of the HIF1α pathway and generation of reactive oxygen species. *Oncotarget*, 8(55): 94743–94758.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., & Li, L. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960): 836–841.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. 2016a. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: e4350965.

Zhang, Y., Dépond, M., He, L., Foudi, A., Kwarteng, E. O., Lauret, E., Plo, I., Desterke, C., Dessen, P., Fujii, N., Opolon, P., Herault, O., Solary, E., Vainchenker, W., Joulin, V., Louache, F., & Wittner, M. 2016b. CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress. *Scientific Reports*, 6: e37827.

Zhe, N., Chen, S., Zhou, Z., Liu, P., Lin, X., Yu, M., Cheng, B., Zhang, Y., & Wang, J. 2016. HIF-1α inhibition by 2-methoxyestradiol induces cell death via activation of the mitochondrial apoptotic pathway in acute myeloid leukemia. *Cancer Biology & Therapy*, 17(6): 625–634.

Zhe, N., Wang, J., Chen, S., Lin, X., Chai, Q., Zhang, Y., Zhao, J., & Fang, Q. 2015. Heme oxygenase-1 plays a crucial role in chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Hematology*, 20(7): 384–391.

Zhou, D., Shao, L., & Spitz, D. R. 2014. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Redox and Cancer Part A* (Vol. Volume 122, pp. 1–67).

Zou, J., Li, P., Lu, F., Liu, N., Dai, J., Ye, J., Qu, X., Sun, X., Ma, D., Park, J., & Ji, C. 2013. Notch1 is required for hypoxia-induced proliferation, invasion and chemoresistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of hematology & oncology*, 6(3).

Annexes

Annexe 1 : Revue publiée en 2016 dans *Frontiers in Oncology*

Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Leukemias

Margaux Deynoux[1], Nicola Sunter[1], Olivier Hérault[1,2] et Frédéric Mazurier[1]

[1] Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer (GICC) UMR 7292, CNRS, UFR de Médecine, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

[2] Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, Tours, France

frontiers in Oncology

MINI REVIEW
published: 26 February 2016
doi: 10.3389/fonc.2016.00041

Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Leukemias

*Margaux Deynoux[1], Nicola Sunter[1], Olivier Hérault[1,2] and Frédéric Mazurier[1]**

[1] Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer (GICC) UMR 7292, CNRS, UFR de Médecine, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France, [2] Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, Tours, France

Despite huge improvements in the treatment of leukemia, the percentage of patients suffering relapse still remains significant. Relapse most often results from a small number of leukemic stem cells (LSCs) within the bone marrow, which are able to self-renew, and therefore reestablish the full tumor. The marrow microenvironment contributes considerably in supporting the protection and development of leukemic cells. LSCs share specific niches with normal hematopoietic stem cells with the niche itself being composed of a variety of cell types, including mesenchymal stem/stromal cells, bone cells, immune cells, neuronal cells, and vascular cells. A hallmark of the hematopoietic niche is low oxygen partial pressure, indeed this hypoxia is necessary for the long-term maintenance of hematopoietic stem/progenitor cells. Hypoxia is a strong signal, principally maintained by members of the hypoxia-inducible factor (HIF) family. In solid tumors, it has been well established that hypoxia triggers intrinsic metabolic changes and microenvironmental modifications, such as the stimulation of angiogenesis, through activation of HIFs. As leukemia is not considered a "solid" tumor, the role of oxygen in the disease was presumed to be inconsequential and remained long overlooked. This view has now been revised since hypoxia has been shown to influence leukemic cell proliferation, differentiation, and resistance to chemotherapy. However, the role of HIF proteins remains controversial with HIFs being considered as either oncogenes or tumor suppressor genes, depending on the study and model. The purpose of this review is to highlight our knowledge of hypoxia and HIFs in leukemic development and therapeutic resistance and to discuss the recent hypoxia-based strategies proposed to eradicate leukemias.

Keywords: hypoxia, hypoxia-inducible factors, leukemia, microenvironment, cancer

OPEN ACCESS

Edited by:
Christian Gomez, University of Mississippi Medical Center, USA

Reviewed by:
Persio Dello Sbarba, Università degli Studi di Firenze, Italy
Daniele Tibullo, University of Catania, Italy
Carine Michiels, University of Namur, Belgium

****Correspondence:***
Frédéric Mazurier
frederic.mazurier@inserm.fr

Specialty section:
This article was submitted to Molecular and Cellular Oncology, a section of the journal Frontiers in Oncology

Received: *12 January 2016*
Accepted: *08 February 2016*
Published: *26 February 2016*

Citation:
Deynoux M, Sunter N, Hérault O and Mazurier F (2016) Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Leukemias. Front. Oncol. 6:41. doi: 10.3389/fonc.2016.00041

LEUKEMIAS AND HYPOXIA

Leukemia is characterized by uncontrolled proliferation of hematopoietic cells within bone marrow (BM). Lymphoid leukemias can be distinguished from myeloid according to the abnormal cell lineage, and acute from chronic leukemias according to the maturity of the blood cells involved and progression rate. Acute leukemias are characterized by rapid proliferation of immature hematopoietic cells, termed blasts, which fail to differentiate into mature cells. Their accumulation in BM also prevents growth and differentiation of normal hematopoietic cells. The clinical evolution is fast (1). In contrast, in chronic leukemia, the growth advantage of neoplastic cells leads to the generation of a more mature cell population that outcompetes normal hematopoiesis, and clinical evolution is longer (several months to years) (2). To date, although the majority of pediatric acute lymphoid

leukemia (ALL) and chronic myeloid leukemia (CML) cases (3) are cured or well controlled under treatment, chronic lymphoid leukemia (CLL) and, even more, acute myeloid leukemia (AML) have a high risk of relapse, despite therapeutic progressions (4). While treatments often target cycling cells, the idea that a small population of quiescent leukemic cells survive and trigger relapse regardless of treatment has emerged (5). In the early 90s, the team of John E. Dick established a hierarchy in leukemic cell populations which, by analogy with that of normal hematopoietic cells, led to the introduction of the concept of cancer stem cells for all cancers [reviewied in Ref. (5, 6)]. Their work identified a subpopulation of leukemic cells able to initiate leukemic growth after transplantation into immune-deficient mice. These stem-like cells, named leukemia-initiating cells (LICs) or leukemic stem cells (LSCs) (7, 8), arise from hematopoietic stem/progenitor cells (HSCs) that reside in the most hypoxic tissue areas within the normal HSC niche (9, 10). The oxygen partial pressure (ppO_2) in tissues is much lower compared to that in the atmosphere (160 mmHg corresponding to around 21% oxygen). In particular, in BM an oxygen gradient exists ranging from <6% oxygen, close to the vessels, to anoxia in the most distant regions from blood vessels (11–15). However, O_2 level differs according to the nature of the hematopoietic niche; the sinusoidal niche is around 10 mmHg (equivalent to 1.3% O_2) (16).

In solid cancers, it is well established that uncontrolled proliferation leads to profound hypoxia, associated with tumor development, metabolic changes, metastatic propagation, immune response modulation, and increased mortality (17, 18). Consequently, it could be assumed that intense blast cell proliferation would eventually decrease the oxygen availability by high consumption. This assumption is particularly difficult to validate by direct measurement in human BM. However, Fiegl et al. (19) demonstrated in total BM aspirates from AML patients that oxygen percentage was highly comparable to the normal counterpart. Using a rat model of an acute AML subtype, the promyelocytic leukemia, Jensen et al. (20) noted an increasing level of hypoxia during disease progression, comparable to that observed with solid tumours. In this model, both normal and leukemic cells stained with 2-nitroimidazole (hypoxic marker) underwent decreased proliferation. In agreement with this observation, the hypoxic culture of normal hematopoietic (21–23) and CML cells (24–27) led to decreased proliferation. Nevertheless, a small fraction of leukemic cells remained insensitive to hypoxia-induced proliferation arrest (26), probably triggering tumor growth (20). Moreover, it has been established that mild hypoxia such as ≤3% O_2 sustains both primary CML (24) and AML cell (28) maintenance longer than normoxia.

Low oxygen might also affect hematopoietic cells through the modulation of the stromal cells. Indeed, hypoxia has been shown to impact on survival, proliferation capability, and differentiation as well as metabolism of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) (29–31). Hypoxia triggers secretion by MSCs of numerous factors, including SDF-1, VEGF, and IL-6, known to promote HSC maintenance. Interestingly, even in normoxia, HSCs present a hypoxic profile when seeded on MSCs, suggesting appearance of "microhypoxic" regions (32, 33). Moreover, MSCs and hypoxic culture synergize to sustain *in vitro* normal stem cells (23) and primary AML cells (28). Finally, the poorly oxygenized niche enhances resistance to treatments (28, 34, 35), thus protecting from various stresses, such as DNA damage, cell death stimuli, or oxidative stress signals (36–38).

HYPOXIA-INDUCIBLE FACTORS IN LEUKEMIAS

The master regulators mediating cell responses to hypoxia are the hypoxia-inducible factors (HIFs). These heterodimer complexes are composed of one of three oxygen-regulated HIF-alpha subunits (HIF-1alpha, HIF-2alpha, and HIF-3alpha) and the constitutively expressed HIF-beta subunit [HIF-1-beta, also known as aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)] (39–41). The *HIF1A* gene is ubiquitously expressed (42). *HIF2A*, also termed endothelial Per-ARNT-Sim (PAS) protein 1 (*EPAS1*), is expressed in a more tissue specific manner, particularly in blood vessels (39, 40, 43). Little is currently known about expression and function of *HIF3A*, but at least 10 splice variants have been described to date (44, 45). HIF-1alpha and HIF-2alpha proteins share similar structural domains such as an N-terminal basic helix-loop-helix (bHLH) domain involved in DNA binding, the two PAS domains allowing dimerization, an oxygen-dependent degradation domain (ODDD) plus N- and C-terminal transactivation domains (NTAD and CTAD). Although HIF-3alpha also exhibits high similarity in bHLH and PAS domains, the lack of the CTAD precludes binding to p300 coactivator (45, 46). Under atmospheric conditions, HIF-alpha subunits are differentially hydroxylated by prolyl hydroxylase domain 1–3 (PHDs) on two proline residues in the ODDD, with oxygen and α-ketoglutarate as substrates. The hydroxylated motif allows binding to von Hippel–Lindau (VHL) tumor suppressor, which leads to HIF-alpha ubiquitination and consequent degradation by 26S proteasome (39–41, 47). In parallel, the hydroxylation of HIF-1alpha by factor inhibiting HIF-1 (FIH1) triggers inhibition of p300/CBP coactivator recruitment (48). PHD activity falls with decreasing oxygen levels, thereby triggering HIF-alpha stabilization and nuclear translocation where it heterodimerizes with HIF-1beta. HIF complexes bind to specific HIF-response elements consisting of specific RCGTG sequences within target gene promoters. Although HIF-1 and HIF-2 share common targets, additional genomic regions and cofactor-binding specifically drive the transcriptional initiation of genes involved in many pathways, such as angiogenesis, differentiation, stem cells maintenance, apoptosis, and invasion (35, 39, 40).

HIF-1alpha mainly participates in the initial response to acute hypoxia, whereas HIF-2alpha responds to chronic exposure (47, 49). Additionally, even in prolonged hypoxia HIF-1alpha undergoes feedback control, whereas HIF-2alpha is stabilized. The multiple HIF-3alpha splice variants appear essentially to regulate HIF-1alpha and HIF-2alpha activity by sequestrating HIF-1beta or by acting as dominant negative regulators (40, 44, 45, 50). HIFs, moreover, can be regulated by oxygen-independent mechanisms. Factors involved in hematopoiesis such as MEIS1 (51), TPO (52), and SCF (53, 54) positively regulate expression of HIFs. Conversely, factors implicated in metabolic changes like

the SIRT1 (55, 56) or SDH (57) inhibit the expression of HIFs. Furthermore, downregulation of HIFs may be achieved by tumor suppressor genes like p53 (58, 59) or GSK3 (60) and the upregulation by oncogenes such as PI3K/AKT (60, 61) or mTORC1 (62). Genetic abnormalities encountered in leukemia such as the *IDH* mutation decrease expression of HIFs by stimulating PHD activity (63) or conversely, *FLT3-ITD* stimulates translation of HIFs *via* the PI3K/AKT pathway (40).

Elevated expression of HIFs is considered to be a marker of poor prognosis in solid cancers (64–77). Overall, increased expression of HIFs is correlated with tumor growth and resistance to therapies, which leads to disease relapse (37). The subject is somewhat more complex and controversial in leukemia. Overexpression of HIF-1alpha in leukemia has been suggested as a marker of poor prognosis and chemotherapy outcomes (78–81). Elevated levels of HIF-1alpha are reported, in the majority of studies, in AML (79, 82–84), acute promyelocytic leukemia (APL) (85), ALL (82), and CML (86, 87). Disease severity and survival have been shown to be influenced by HIF-1alpha levels, in AML and myelodysplastic syndromes (84, 88, 89); the protein expression of HIF-2alpha, usually absent in normal cells, has been observed in both AML and ALL, but has not been correlated with outcome (82, 90, 91). Thus, leukemic subtype, disease stage or the molecular abnormality involved might explain the variability. To explore potential functions of HIFs in leukemogenesis, various mouse models have been proposed (**Table 1**). Several studies have shown that inhibition of HIF-1alpha, either by RNAi targeting or by small molecular inhibition, resulted in a failure of primary cells to form *in vitro* colonies and decreased tumor growth and leukemic progression. *In vivo*, dramatic decrease and potential eradication of primary AML cell xenografts have been shown and a complete absence of leukemic induction in secondary transplantation has been reported in cells in which HIF-1alpha was inhibited (79, 84, 85, 92). This has also been confirmed in ALL (93, 94) and CML (83, 87). Similarly, knockdown of HIF-2alpha with shRNA triggers leukemic inhibition (82, 85, 90), which is demonstrated *in vitro* by limited cellular proliferation as well as *in vivo* by absence or poor engraftment.

Hypoxia *via* HIFs may promote disease maintenance and progression through different mechanisms including energy metabolism (98–100), cycle and quiescence (101, 102), and immune function (103) that are important in normal physiology and deregulated in cancer (47, 104). On one hand, HIF-1alpha and HIF-2alpha influence signaling pathways relevant to leukemia maintenance and propagation. HIF-1alpha activates the Notch1 pathway, which leads to leukemia invasion (94), and promotes the Wnt pathway, consequently preserving LSCs (93). On the other hand, HIF-1alpha acts as an inhibitor of the expression of tumor suppressor genes, such as p15, p16, p19, and p53 (79, 87). Indeed, HIF-1alpha-transactivated DNMT3a methylates DNA, which inhibits tumor suppressors and leads to tumor growth (79). In AML, DNMT3a plays a crucial role since more than 20% of patients exhibit *DNMT3A* mutation (105), conferring a global hypomethylation of DNA and predisposition to developing hematological diseases (106). In contrast, in T-ALL this mutation confers hypermethylation, so the contribution of hypomethylation and hypermethylation to disease development remains to be elucidated (106). Interestingly, taken from non-hematopoietic tissue and cancers, studies have explored the role of hypoxia in epigenetic modifications, through HIF-1alpha stabilization, such as DNA methylation, histone modifications, and non-coding RNA expression (107). Promoter methylation is modified by hypoxia and regulates neural progenitor cell fate (108). The histone demethylase JMJD1A and 1B are targets of HIFs in normal and cancer cells (109–111). Finally in HIF-2alpha-deficient cells, transcriptomic approaches have identified deregulated genes involved in energetic and oxidative metabolisms, plus endoplasmic reticulum (ER) stress, indicating that HIF-2alpha protects AML cells from apoptosis induced by ER stress (90).

One consequences of the expression of HIFs is the promotion of quiescence, which favors chemoresistance. Hypoxia-induced HIF-1alpha promotes entry into G_0/G_1 and decreases S phase in AML cells through, in part, upregulation of p27 (112). Quiescence enhances chemoresistance of leukemic cells to cytosine arabinoside (Ara-C) (112, 113) and adriamycin (ADR) (88), since these agents target cycling cells. Coculture of primary AML cells with stromal cells in hypoxia (3% O_2) confers resistance to Ara-C through stabilization of HIFs and induction of quiescence (28). Antiapoptotic signaling is observed through increased XIAP level, an apoptosis-inhibitory protein, and the activation of the PI3K/AKT pro-survival pathway (112). HIF-1alpha activation by a PHD inhibitor, cobalt chloride ($CoCl_2$), protects HL-60 leukemic cells against arsenic trioxide (ATO) by inhibiting BAX and Caspase 3 and 9 and promoting HSP70 protein and p38/ERK pro-survival factors (114). In T-ALL, through Notch1 activation, HIF-1alpha induces BCL2 and BCL-XL upregulation and the downregulation of Caspase 3 and 9 activities, which decreased dexamethasone-induced apoptosis in leukemic cells (94).

Conversely, low oxygen and hypoxia-mimicking agents such as $CoCl_2$ or desferrioxamine induce AML cell differentiation through HIF-1alpha accumulation (115, 116). In fact, HIF-1alpha mediates differentiation by binding to C/EBPα and promoting its transcriptional activity (115–117) as well as that of RUNX1 and PU.1 (118, 119). Additionally, C/EBPα/HIF-1alpha induces AML differentiation through c-MYC inhibition and further suppression of miR17 and miR20a expression. The knockdown of p21 and STAT3, two inhibitory targets of miR17 and miR20A, reverses HIF-1alpha-induced AML differentiation (120). In renal cell carcinoma, HIF-1alpha inhibits c-MYC/MAX association, which decreases *c-MYC* promoter binding and thus blocks cells in G_1 (121). Conversely, HIF-2alpha triggers cell cycle progression and proliferation by enhancing the formation of c-MYC/MAX and its activity. Since HIF-2alpha and HIF-1alpha have dual effects on cell cycle progression according to cell types, more investigations are needed on their antagonistic effects in leukemias. Nguyen-Khac et al. (122) discovered a translocation involving TEL and ARNT in an AML patient exerting a dominant/negative activity on HIF-1alpha. The fusion protein blocks leukemic differentiation, thus conferring a tumor suppressor function for HIF-1alpha. In line with this, data have previously shown that intermittent hypoxia slows down leukemic development in mice (123). However, *in vivo* hypoxia may have unrelated consequences on leukemic cell physiology. More recently, Velasco-Hernandez et al. (124) using different AML models found reduced survival of mice

TABLE 1 | Models used to characterize *HIF1A* and *HIF2A* as oncogenes in leukemias.

Leukemia	Cell types	Mouse models	HIFs inhibition or overexpression	Phenotypes	Reference
CML	**Human cells**				
	K562	Nude (in subcutaneous)	Human *HIF1A* cDNA + L-ascorbic acid[a]	No decreased tumor growth	(83)
	Mouse cells				
	Vav-Cre-HIF1a$^{flox/flox}$ transduced with BCR–ABL retrovirus	C57BL/6 J	*Vav-Cre-Hif1a*$^{flox/flox}$ system	No leukemia induction in second transplantation Decreased LSCs number	(87)
AML	**Human cells**				
	Primary	NOD-SCID	Echinomycin[b]	Decreased/eliminated leukemia cells No leukemia induction in serial transplantation	(84)
	Primary	NOD-SCID gamma	sh*HIF2A*	Decreased/no engraftment	(90)
	HL-60	NOD-SCID gamma	sh*HIF2A*	Increased mice survival	(82)
	NB4	NOD-SCID gamma	sh*HIF1A*, sh*HIF2A*, or EZN-2968[c]	Increased mice survival Delayed leukemia progression	(85)
	SKNO-1	Athymic nude	Echinomycin[b]	Decreased tumor growth	(79)
	HL-60	Nude (in subcutaneous)	L-ascorbic acid[a]	Decreased tumor growth	(83)
	Mouse cells				
	PML-RARα Lin$^-$	129Sv	*Ex vivo* electroporation with EZN-2968[c]	Increased mice survival	(85)
	PML-RARα Lin$^-$	129Sv	EZN-2208[c] ATRA[d] + EZN-2208[c]	Increased mice survival Synergy of both treatments to leukemia eradication No leukemia induction in serial transplantation	(95)
	FDCP1	DBA/2	Human *HIF2A* cDNA	Accelerated leukemia progression	(82)
	Relapsed *Mll*$^{PTD/WT}$:*Flt3*$^{ITD/WT}$	C57BL/6 Ly5.1	Echinomycin[b]	Decreased AML blasts (≤20%) Increased mice survival	(92)
	A/E9a transgenic mouse cells	C57BL/6 J	Human *HIF1A* cDNA si*HIF1A*	Enhanced leukemia disease Suppressed leukemia disease	(79)
ALL	**Human cells**				
	Jurkat Sup-T1	Transwell matrigel-coated chambers	Hypoxia (2% O_2)	Increased tumor invasion	(94)
	Primary T-ALL	NOD-SCID gamma	sh*HIF1A*	Increased mice survival Decreased LSCs frequency	(93)
	Mouse cells				
	Primary (NOTCH1-ΔE/NGFR retrovirus)	NOD-SCID gamma	*Hif1a*$^{loxP/loxP}$/CreERT2/GFP system	Increased mice survival	(93)

[a]*L-ascorbic acid indirectly inhibits HIF-1alpha expression by inhibiting NF-κB translocation into the nucleus (83).*
[b]*Echinomycin binds the core-binding site of HIF-1alpha and inhibits its DNA-binding activity (96).*
[c]*EZN-2968 and EZN-2208 specifically target HIF-1alpha (85, 95, 97).*
[d]*ATRA target RARα moiety in PML-RARα mutation of APL (95).*

transplanted with HIF-1alpha KO cells (**Table 2**). These observations were confirmed in myeloproliferative neoplasia through a FLT3^{ITD}-induced mouse model (125). Overall, *Hifa* KO enhanced disease progression and severity, making it a tumor suppressor gene. However, authors show that HIF-1alpha deletion may promote compensatory effects *via* overexpression of HIF-2alpha, which may eventually mask the role of HIF-1alpha. This elevation was already seen in HIF-1alpha-deficient cells (90). The *Hif2a* KO in MLL-AF9-driven and Meis1/HoxA9-induced murine AML enhances LSCs development but, once leukemias are established, HIF-2alpha has no impact on their maintenance and propagation. Furthermore, double inhibition of HIF-1alpha and HIF-2alpha demonstrated that HIFs synergize to inhibit AML development, without any role in leukemic propagation (126). Transcriptomic analysis reveals that HIF-1alpha and HIF-2alpha promote a set of genes that fosters survival and proliferation of leukemic cells.

Off-target effects of shRNAs and poor specificity of drugs that inhibit HIFs compared to KO might explain this controversy between studies. However, KO may also induce slow cellular adaptation with compensatory effects. Differences may also arise from the model used, mouse versus human, and the different protumoral gene constructions used to generate the leukemia. It will be pertinent to assess the overexpression of HIFs in AML models, and thus observe whether increased HIF delays disease

TABLE 2 | Models used to characterize *HIF1A* and *HIF2A* as tumor suppressor genes in leukemias.

Leukemia	Cell types	Mouse models	HIFs inhibition or overexpression	Phenotypes	Reference
CML	**Human**				
	K562	–	Mixture with 10% O_2 for 5 or 22 + 1 or 24 h of reoxygenation	Survival signals with 5 h hypoxia Death signals with 22 h hypoxia	(127)
AML	**Human**				
	MLL-AF9 THP-1 transduced with *HIF2A* sgRNAs + Cas9 nuclease	–	Two independent sgRNAs against the exon 12 of *HIF2A*	Same leukemic propagation than control	(126)
	Mouse				
	hMRP8-PML-RARα	FVB-NICO	Intermittent hypoxia equivalent to an altitude of 6000 m (≈10% O_2) for 18 h/day	Increased mice survival Decreased tumor infiltration/invasion	
	Hif1a$^{fl/fl}$; *Mx1-Cre* transduced with *A/E9a* retrovirus	B6SJL	*Hif1a*$^{fl/fl}$/CreERT2 system	HIF-1alpha does not affect AML initiation/progression Decreased mice survival in second transplantation	(123)
	Hif1a$^{fl/fl}$; *Mx1-Cre* transduced with *HoxA9-Meis1* retrovirus *Hif1a*$^{fl/fl}$; *Mx1-Cre* transduced with *MLL-AF9* retrovirus *Hif2a*$^{fl/fl}$; *Vav-iCre* transduced with *Meis1* and *HoxA9* retroviruses	C57BL/6 Ly5.1/ Ly5.2	*Hif2a*$^{fl/fl}$; *Vav-iCre* system	HIF-1alpha does not affect AML initiation/progression HIF-1alpha does not affect AML initiation/progression Decreased mice survival Same AML aggressiveness to control mice	(124)
	MLL-AF9$^{KI/+}$; *Hif2a*$^{fl/fl}$; *Vav-iCre* *Hif1a*$^{fl/fl}$; *Hif2a*$^{fl/fl}$; *Vav-iCre* transduced with *Meis1* and *HoxA9* retrovirus	C57BL/6 Ly5.1/ Ly5.2	*Hif1a*$^{fl/fl}$; *Hif2a*$^{fl/fl}$; *Vav-iCre* system	Accelerated leukemia disease Decreased mice survival	(126)

development and, even, eradicate leukemia. HIFs may also differently impact on LSCs and more mature blasts cells, conferring pro-survival effect on LSCs and differentiation on blasts. In favor of this hypothesis, intermittent hypoxia increases survival of APL mice (123). Similarly, in CML, HIF-1alpha induction following short (5 h) hypoxia exposure delivered a survival signal to cells, whereas it promoted cell death within a longer period (22 h) (127). In the ALL model, 24 h-exposure to hypoxia conferred chemoresistance in contrast to longer exposure (48–72 h) (128). These data suggest that duration of hypoxia incubation may promote or inhibit leukemia progression and maintenance, thus explaining the oncogenic or tumor suppressor activity. The link between HIFs and tumor suppressor activity has been previously demonstrated in other cancers (71, 129–131). Taken together, these data suggest that not only the level but also the duration of activity dictates HIF action and hence cellular response in leukemia.

THERAPEUTIC STRATEGIES: TARGETING HIFs OR NOT?

In light of the results summarized above, it could be difficult to affirm that downregulation of HIFs could be a therapeutic approach. Nevertheless, chemical inhibitors have been tested and the proof-of-concept was first illustrated using echinomycin, which blocks HIF-1alpha-binding activity. This drug preferentially targets AML LSCs through apoptosis, decreasing leukemia burden, prolonging mouse survival, and abrogating disease development in secondary transplantation (84, 92). Echinomycin does not impact on self-renewal and differentiation of normal HSCs, which makes it an ideal molecule to treat leukemia (92). L-ascorbic acid has also been shown to inhibit expression of HIF-1alpha in CML cells and consequently reduces tumor growth. This effect is specific to HIF-1alpha since its overexpression in L-ascorbic acid-treated mice antagonizes leukemic growth inhibition (83). In APL, EZN-2968 and EZN-2208 confer antileukemic activity and prolong mouse survival; in combination with all-trans retinoic acid (ATRA), leukemia eradication was observed, along with survival of mice; fortunately, both compounds are non-toxic to normal HSCs (85, 95). Overall, these data offer new therapeutic options, targeting HIF in leukemia with no impact on normal hematopoiesis. Another approach will be the combination of HIF inhibitors with treatments capable of determining the departure of LSCs from quiescence, and then with treatments that target cycling cells, such as Ara-C.

An alternative strategy will consist of taking advantage of hypoxia to activate drugs and thus to target LSCs in the niche. TH-302 is a hypoxia-activated prodrug, which exhibits a specific cytotoxicity in hypoxia (132, 133). In primary AML, TH-302 hampers tumor growth through multiple mechanisms (cycle arrest, DNA cross-linking, DNA damage). In mouse models, it decreases leukemia burden and prolongs survival (133). PR-104 quickly undergoes alcohol hydrolysis and induces DNA cross-linking in hypoxic cells, impairs ALL progression, decreases tissue infiltration, and prolongs mice survival (134, 135). In a phase I/II study, PR-104 reduced the number of AML and ALL cells in refractory and relapsed

patients (136). Despite some side effects, including myelosuppression, febrile neutropenia, and infections, collectively, these results propose innovative therapies for leukemia based on hypoxia-activated prodrugs.

CONCLUSION

Overall, these data argue that hypoxia and HIF-mediated signaling play a crucial role in leukemia and leukemogenic processes. However, they conflict in determining whether HIFs act as oncogenes or tumor suppressors, certainly because of the different leukemic models, study design, oxygen level, and hypoxia duration. However, therapies targeting hypoxia and HIFs have proven their efficacy in treating mouse models and may benefit leukemic patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors designed, wrote, and revised the manuscript.

FUNDING

The authors acknowledge La Ligue contre le Cancer for funding NS, the Ministry of Research for Funding MD, and the Région Center. La Ligue contre le Cancer, CANCEN, and Les Sapins de l'Espoir associations supported this work.

REFERENCES

1. Brown CMS, Larsen SR, Iland HJ, Joshua DE, Gibson J. Leukaemias into the 21st century: part 1: the acute leukaemias. *Intern Med J* (2012) **42**(11):1179–86. doi:10.1111/j.1445-5994.2012.02938.x
2. Gibson J, Iland HJ, Larsen SR, Brown CMS, Joshua DE. Leukaemias into the 21st century – part 2: the chronic leukaemias. *Intern Med J* (2013) **43**(5):484–94. doi:10.1111/imj.12135
3. Freireich EJ, Wiernik PH, Steensma DP. The leukemias: a half-century of discovery. *J Clin Oncol* (2014) **32**(31):3463–9. doi:10.1200/JCO.2014.57.1034
4. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* (2015) **373**(12):1136–52. doi:10.1056/NEJMra1406184
5. Zagozdzon R, Golab J. Cancer stem cells in haematological malignancies. *Contemp Oncol* (2015) **19**(1A):A1–6. doi:10.5114/wo.2014.47127
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Stem Cells* (2001) **414**(6859):105–11. doi:10.1007/978-1-60327-933-8
7. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* (1997) **3**(7):730–7. doi:10.1038/nm0797-730
8. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* (1994) **367**(6464):645–8. doi:10.1038/367645a0
9. Schepers K, Campbell TB, Passegué E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* (2015) **16**(3):254–67. doi:10.1016/j.stem.2015.02.014
10. Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol* (2014) **164**(6):767–78. doi:10.1111/bjh.12725
11. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J* (2001) **81**(2):675–84. doi:10.1016/S0006-3495(01)75733-5
12. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* (2001) **81**(2):685–96. doi:10.1016/S0006-3495(01)75733-5
13. Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. Oxygen saturation in the bone marow of healthy volunteers. *Blood* (2012) **99**(1):394. doi:10.1182/blood.V98.1.250
14. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Canty KJ, Mahoney JE, Park S-Y, et al. Quantitative imaging of hematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* (2013) **15**(5):533–43. doi:10.1038/ncb2730
15. Parmar K, Mauch P, Vergilio J-A, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) **104**(13):5431–6. doi:10.1073/pnas.0701152104
16. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* (2014) **508**(7495):269–73. doi:10.1038/nature13034
17. Quail D, Joyce J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* (2013) **19**(11):1423–37. doi:10.1038/nm.3394
18. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* (2013) **123**(9):3664–71. doi:10.1172/JCI67230.3664
19. Fiegl M, Samudio I, Clise-Dwyer K, Burks JK, Mnjoyan Z, Andreeff M. CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure. *Blood* (2009) **113**(7):1504–12. doi:10.1182/blood-2008-06-161539
20. Jensen PO, Mortensen BT, Hodgkiss RJ, Iversen APO, Christensen IJ, Helledie N, et al. Increased cellular hypoxia and reduced proliferation of both normal and leukaemic cells during progression of acute myeloid leukaemia in rats. *Cell Prolif* (2000) **33**(6):381–95. doi:10.1046/j.1365-2184.2000.00183.x
21. Eliasson P, Rehn M, Hammar P, Larsson P, Sirenko O, Flippin LA, et al. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp Hematol* (2010) **38**(4):301–310.e2. doi:10.1016/j.exphem.2010.01.005
22. Ivanovic Z, Hermitte F, Brunet de La Grange P, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, et al. Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O_2 concentration (3%). *Stem Cells* (2004) **22**:716–24. doi:10.1634/stemcells.2004-0094
23. Hammoud M, Vlaski M, Duchez P, Chevaleyre J, Lafarge X, Boiron J-M, et al. Combination of low O_2 concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34+ cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* (2012) **227**(6):2750–8. doi:10.1002/jcp.23019
24. Desplat V, Faucher J-L, Mahon FX, Dello Sbarba P, Praloran V, Ivanovic Z. Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34+ CML cells. *Stem Cells* (2002) **20**:347–54. doi:10.1634/stemcells.20-4-347
25. Giuntoli S, Rovida E, Barbetti V, Cipolleschi MG, Olivotto M, Dello Sbarba P. Hypoxia suppresses BCR/Abl and selects imatinib-insensitive progenitors within clonal CML populations. *Leukemia* (2006) **20**(7):1291–3. doi:10.1038/sj.leu.2404224
26. Giuntoli S, Rovida E, Gozzini A, Barbetti V, Cipolleschi MG, Olivotto M, et al. Severe hypoxia defines heterogeneity and selects highly immature progenitors within clonal erythroleukemia cells. *Stem Cells* (2007) **25**(5):1119–25. doi:10.1634/stemcells.2006-0637
27. Giuntoli S, Tanturli M, Di Gesualdo F, Barbetti V, Rovida E, Dello Sbarba P. Glucose availability in hypoxia regulates the selection of chronic myeloid leukemia progenitor subsets with different resistance to imatinib-mesylate. *Haematologica* (2011) **96**(2):204–12. doi:10.3324/haematol.2010.029082
28. Griessinger E, Anjos-Afonso F, Pizzitola I, Rouault-Pierre K, Vargaftig J, Taussig D, et al. A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms. *Stem Cells Transl Med* (2014) **3**:520–9. doi:10.5966/sctm.2013-0166
29. Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, Stewart H, Isseroff RR, Nolta JA, et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells* (2015) **33**:1818–28. doi:10.1002/stem.1976
30. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, et al. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation

of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol* (2010) **11**:11. doi:10.1186/1471-2121-11-11
31. Tamama K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, Guan J, Ganju RK, Sen CK. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *J Cell Biochem* (2011) **112**(3):804–17. doi:10.1002/jcb.22961
32. Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells – modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica* (2010) **95**(4):542–50. doi:10.3324/haematol.2009.010736
33. Jing D, Wobus M, Poitz DM, Bornhauser M, Ehninger G, Ordemann R. Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment in vitro. *Haematologica* (2012) **97**(2):331–9. doi:10.3324/haematol.2011.050815
34. Benito J, Zeng Z, Konopleva M, Wilson WR. Targeting hypoxia in the leukemia microenvironment. *Int J Hematol Oncol* (2013) **2**(4):279–88. doi:10.2217/IJH.13.32
35. Martin SK, Diamond P, Gronthos S, Peet DJ, Zannettino ACW. The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia* (2011) **25**(10):1533–42. doi:10.1038/leu.2011.122
36. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol* (2007) **25**(11):1315–21. doi:10.1038/nbt1350
37. Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med* (2013) **17**(1):30–54. doi:10.1111/jcmm.12004
38. Pollyea DA, Gutman JA, Gore L, Smith CA, Jordan CT. Targeting acute myeloid leukemia stem cells: a review and principles for the development of clinical trials. *Haematologica* (2014) **99**(8):1277–84. doi:10.3324/haematol.2013.085209
39. Lee KE, Simon MC. From stem cells to cancer stem cells: HIF takes the stage. *Curr Opin Cell Biol* (2012) **24**(2):232–5. doi:10.1016/j.ceb.2012.01.005
40. Peng G, Liu Y. Hypoxia-inducible factors in cancer stem cells and inflammation. *Trends Pharmacol Sci* (2015) **36**(6):374–83. doi:10.1016/j.tips.2015.03.003
41. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* (2012) **33**(4):207–14. doi:10.1016/j.tips.2012.01.005
42. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O_2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**(12):5510–4. doi:10.1073/pnas.92.12.5510
43. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* (2012) **12**(1):9–22. doi:10.1038/nrc3183
44. Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am J Physiol Cell Physiol* (2016) **310**(4):C260–9. doi:10.1152/ajpcell.00315.2015
45. Heikkilä M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3α variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci* (2011) **68**(23):3885–901. doi:10.1007/s00018-011-0679-5
46. Augstein A, Poitz DM, Braun-Dullaeus RC, Strasser RH, Schmeisser A. Cell-specific and hypoxia-dependent regulation of human HIF-3α: inhibition of the expression of HIF target genes in vascular cells. *Cell Mol Life Sci* (2011) **68**(15):2627–42. doi:10.1007/s00018-010-0575-4
47. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci* (2012) **37**(9):364–72. doi:10.1016/j.tibs.2012.06.004
48. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* (2002) **16**(12):1466–71. doi:10.1101/gad.991402.1466
49. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1α and HIF-2α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* (2006) **10**(5):413–23. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.026
50. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* (2009) **15**(6):501–13. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018
51. Kocabas F, Zheng J, Thet S, Copeland NG, Jenkins NA, DeBerardinis RJ, et al. Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood* (2012) **120**(25):4963–72. doi:10.1182/blood-2012-05-432260
52. Kirito K, Fox N, Komatsu N, Kaushansky K, Tpo T. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1α. *Blood* (2005) **105**(11):4258–63. doi:10.1182/blood-2004-07-2712
53. Gibbs BF, Yasinska IM, Oniku AE, Sumbayev VV. Effects of stem cell factor on hypoxia-inducible factor 1 alpha accumulation in human acute myeloid leukaemia and LAD2 mast cells. *PLoS One* (2011) **6**(7):e22502. doi:10.1371/journal.pone.0022502
54. Pedersen M, Löfstedt T, Sun J, Holmquist-Mengelbier L, Påhlman S, Rönnstrand L. Stem cell factor induces HIF-1α at normoxia in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) **377**(1):98–103. doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.102
55. Dioum EM, Chen R, Alexander MS, Zhang Q, Hogg RT, Gerard RD, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 2α signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* (2009) **324**(5932):1289–93. doi:10.1126/science.1169956
56. Lim J-H, Lee Y-M, Chun Y-S, Chen J, Kim J-E, Park J-W. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1α. *Mol Cell* (2010) **38**(6):864–78. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.023
57. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* (2005) **7**(1):77–85. doi:10.1016/j.ccr.2004.11.022
58. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1α. *Genes Dev* (2000) **14**(1):34–44. doi:10.1101/gad.14.1.34
59. Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, Hruban RH, Karim B, Mendell JT, et al. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**(14):6334–9. doi:10.1073/pnas.0911082107
60. Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem* (2003) **278**(33):31277–85. doi:10.1074/jbc.M300763200
61. Zhang Q, Oh CK, Messadi DV, Duong HS, Kelly AP, Soo C, et al. Hypoxia-induced HIF-1 α accumulation is augmented in a co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: involvement of ERK1/2 and PI-3K/Akt. *Exp Cell Res* (2006) **312**(2):145–55. doi:10.1016/j.yexcr.2005.10.006
62. Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, et al. PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* (2006) **442**(7104):779–85. doi:10.1038/nature05029
63. Takubo K, Suda T. Roles of the hypoxia response system in hematopoietic and leukemic stem cells. *Int J Hematol* (2012) **95**(5):478–83. doi:10.1007/s12185-012-1071-4
64. Bangoura G, Liu Z-S, Qian Q, Jiang C-Q, Yang G-F, Jing S. Prognostic significance of HIF-2alpha/EPAS1 expression in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* (2007) **13**(23):3176–82. doi:10.3748/wjg.v13.i23.3176
65. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* (2000) **60**(17):4693–6.
66. Chi J-T, Wang Z, Nuyten DSA, Rodriguez EH, Schaner ME, Salim A, et al. Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med* (2006) **3**(3):e47. doi:10.1371/journal.pmed.0030047
67. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* (2001) **85**(6):881–90. doi:10.1054/bjoc.2001.2018
68. Hui EP, Chan ATC, Pezzella F, Turley H, To K-F, Poon TCW, et al. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res* (2002) **8**:2595–604.
69. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Turley H, Talks K, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck

cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2002) **53**(5):1192–202. doi:10.1016/S0360-3016(02)02848-1
70. Matsuyama T, Nakanishi K, Hayashi T, Yoshizumi Y, Aiko S, Sugiura Y, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* (2005) **96**(3):176–82. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00025.x
71. Noguera R, Fredlund E, Piqueras M, Pietras A, Beckman S, Navarro S, et al. HIF-1α and HIF-2α are differentially regulated in vivo in neuroblastoma: high HIF-1α correlates negatively to advanced clinical stage and tumor vascularization. *Clin Cancer Res* (2009) **15**(23):7130–6. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0223
72. Scrideli CA, Carlotti CG, Mata JF, Neder L, Machado HR, Oba-Sinjo SM, et al. Prognostic significance of co-overexpression of the EGFR/IGFBP-2/HIF-2A genes in astrocytomas. *J Neurooncol* (2007) **83**(3):233–9. doi:10.1007/s11060-007-9328-0
73. Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Association of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* (2002) **95**(5):1055–63. doi:10.1002/cncr.10774
74. Theodoropoulos VE, Lazaris AC, Sofras F, Gerzelis I, Tsoukala V, Ghikonti I, et al. Hypoxia-inducible factor 1α expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer. *Eur Urol* (2004) **46**(2):200–8. doi:10.1016/j.eururo.2004.04.008
75. Trastour C, Benizri E, Ettore F, Ramaioli A, Chamorey E, Pouysségur J, et al. HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. *Int J Cancer* (2007) **120**(7):1451–8. doi:10.1002/ijc.22436
76. Wu X-H, Qian C, Yuan K. Correlations of hypoxia-inducible factor-1α/hypoxia-inducible factor-2α expression with angiogenesis factors expression and prognosis in non-small cell lung cancer. *Chin Med J* (2011) **124**(1):11–8. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2011.01.004
77. Yoshimura H, Dhar D, Kohno H, Kubota H, Fujii T, Ueda S, et al. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res* (2004) **10**(24):8554–60. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0946-03
78. Deeb G, Vaughan MM, McInnis I, Ford LA, Sait SNJ, Starostik P, et al. Hypoxia-inducible factor-1α protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res* (2011) **35**(5):579–84. doi:10.1016/j.leukres.2010.10.020
79. Gao XN, Yan F, Lin J, Gao L, Lu XL, Wei SC, et al. AML1/ETO cooperates with HIF1α to promote leukemogenesis through DNMT3a transactivation. *Leukemia* (2015) **29**(8):1730–40. doi:10.1038/leu.2015.56
80. Li Y, Ye D. Cancer therapy by targeting hypoxia-inducible factor-1. *Curr Cancer Drug Targets* (2010) **10**(7):782–96. doi:10.2174/156800910793605857
81. Zhe N, Wang J, Chen S, Lin X, Chai Q, Zhang Y, et al. Heme oxygenase-1 plays a crucial role in chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Hematology* (2015) **20**(7):384–91. doi:10.1179/1607845414Y.0000000212
82. Forristal CE, Brown AL, Helwani FM, Winkler IG, Nowlan B, Barbier V, et al. Hypoxia inducible factor (HIF)-2α accelerates disease progression in mouse models of leukemia and lymphoma but is not a poor prognosis factor in human AML. *Leukemia* (2015) **29**(10):2075–85. doi:10.1038/leu.2015.102
83. Kawada H, Kaneko M, Sawanobori M, Uno T, Matsuzawa H, Nakamura Y, et al. High concentrations of L-ascorbic acid specifically inhibit the growth of human leukemic cells via downregulation of HIF-1α transcription. *PLoS One* (2013) **8**(4):e62717. doi:10.1371/journal.pone.0062717
84. Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P, Liu Y. Targeting HIF1α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell* (2011) **8**(4):399–411. doi:10.1016/j.stem.2011.02.006
85. Coltella N, Percio S, Valsecchi R, Cuttano R, Guarnerio J, Ponzoni M, et al. HIF factors cooperate with PML-RARα to promote acute promyelocytic leukemia progression and relapse. *EMBO Mol Med* (2014) **6**(5):640–50. doi:10.1002/emmm.201303065
86. Chen H, Shen Y, Gong F, Jiang Y, Zhang R. HIF-α promotes chronic myelogenous leukemia cell proliferation by upregulating p21 expression. *Cell Biochem Biophys* (2015) **72**(1):179–83. doi:10.1007/s12013-014-0434-2
87. Zhang H, Li H, Xi HS, Li S. HIF1α is required for survival maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood* (2012) **119**(11):2595–607. doi:10.1182/blood-2011-10-387381
88. Song K, Li M, Xu X-J, Xuan L, Huang G-N, Song X-L, et al. HIF-1α and GLUT1 gene expression is associated with chemoresistance of acute myeloid leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* (2014) **15**(4):1823–9. doi:10.7314/APJCP.2014.15.4.1823
89. Tong H, Hu C, Zhuang Z, Wang L, Jin J. Hypoxia-inducible factor-1α expression indicates poor prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* (2012) **53**(12):2412–8. doi:10.3109/10428194.2012.696637
90. Rouault-Pierre K, Lopez-Onieva L, Foster K, Anjos-Afonso F, Lamrissi-Garcia I, Serrano-Sanchez M, et al. HIF-2α protects human hematopoietic stem/progenitors and acute myeloid leukemic cells from apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cell Stem Cell* (2013) **13**(5):549–63. doi:10.1016/j.stem.2013.08.011
91. Wellmann S, Guschmann M, Griethe W, Eckert C, Stackelberg A, Lottaz C, et al. Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia* (2004) **18**(5):926–33. doi:10.1038/sj.leu.2403332
92. Wang Y, Liu Y, Tang F, Bernot KM, Schore R, Marcucci G, et al. Echinomycin protects mice against relapsed acute myeloid leukemia without adverse effect on hematopoietic stem cells. *Blood* (2014) **124**(7):1127–36. doi:10.1182/blood-2013-12-544221.The
93. Giambra V, Jenkins CE, Lam SH, Hoofd C, Belmonte M, Wang X, et al. Leukemia stem cells in T-ALL require active Hif1α and Wnt signaling. *Blood* (2015) **125**(25):3917–27. doi:10.1182/blood-2014-10-609370
94. Zou J, Li P, Lu F, Liu N, Dai J, Ye J, et al. Notch1 is required for hypoxia-induced proliferation, invasion and chemoresistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Hematol Oncol* (2013) **6**:3. doi:10.1186/1756-8722-6-3
95. Coltella N, Valsecchi R, Ponente M, Ponzoni M, Bernardi R. Synergistic leukemia eradication by combined treatment with retinoic acid and HIF inhibition by EZN-2208 (PEG-SN38) in preclinical models of PML-RAR and PLZF-RAR-driven leukemia. *Clin Cancer Res* (2015) **21**(16):3685–94. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3022
96. Vlaminck B, Toffoli S, Ghislain B, Demazy C, Raes M. Dual effect of echinomycin on hypoxia-inducible factor-1 activity under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS J* (2007) **274**:5533–42. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06072.x
97. Greenberger LM, Horak ID, Filpula D, Sapra P, Westergaard M, Frydenlund HF, et al. A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1, EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Mol Cancer Ther* (2008) **7**(11):3598–608. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0510
98. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* (2010) **7**(3):380–90. doi:10.1016/j.stem.2010.07.011
99. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* (2011) **9**(4):298–310. doi:10.1016/j.stem.2011.09.010
100. Zhang CC, Sadek HA. Hypoxia and metabolic properties of hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal* (2014) **20**(12):1891–901. doi:10.1089/ars.2012.5019
101. Forristal CE, Winkler IG, Nowlan B, Barbier V, Walkinshaw G, Levesque JP. Pharmacologic stabilization of HIF-1α increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood* (2013) **121**(5):759–69. doi:10.1182/blood-2012-02-408419
102. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, et al. Regulation of the HIF-1α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* (2010) **7**(3):391–402. doi:10.1016/j.stem.2010.06.020
103. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* (2014) **41**(4):518–28. doi:10.1016/j.immuni.2014.09.008
104. Gezer D, Vukovic M, Soga T, Pollard PJ, Kranc KR. Concise review: genetic dissection of hypoxia signaling pathways in normal and leukemic stem cells. *Stem Cells* (2014) **32**(6):1390–7. doi:10.1002/stem.1657
105. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer* (2015) **15**(3):152–65. doi:10.1038/nrc3895
106. Mayle A, Yang L, Rodriguez B, Zhou T, Chang E, Curry CV, et al. Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation. *Blood* (2015) **125**(4):629–39. doi:10.1182/blood-2014-08-594648
107. Watson JA, Watson CJ, McCann A, Baugh J. Epigenetics, the epicenter of the hypoxic response. *Epigenetics* (2010) **5**(4):293–6. doi:10.4161/epi.5.4.11684

108. Mutoh T, Sanosaka T, Ito K, Nakashima K. Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells via hypoxia-inducible factor 1α-Notch signal interaction in the developing brain. *Stem Cells* (2012) **30**(3):561–9. doi:10.1002/stem.1019
109. Beyer S, Kristensen MM, Jensen KS, Johansen JV, Staller P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *J Biol Chem* (2008) **283**(52):36542–52. doi:10.1074/jbc.M804578200
110. Fu L, Chen L, Yang J, Ye T, Chen Y, Fang J. HIF-1alpha-induced histone demethylase JMJD2B contributes to the malignant phenotype of colorectal cancer cells via an epigenetic mechanism. *Carcinogenesis* (2012) **33**(9):1664–73. doi:10.1093/carcin/bgs217
111. Krieg AJ, Rankin EB, Chan D, Razorenova O, Fernandez S, Giaccia AJ. Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene expression and tumor growth. *Mol Cell Biol* (2010) **30**(1):344–53. doi:10.1128/MCB.00444-09
112. Drolle H, Wagner M, Vasold J, Kütt A, Deniffel C, Sotlar K, et al. Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy. *Leuk Res* (2015) **39**(7):779–85. doi:10.1016/j.leukres.2015.04.019
113. Matsunaga T, Imataki O, Torii E, Kameda T, Shide K, Shimoda H, et al. Elevated HIF-1α expression of acute myelogenous leukemia stem cells in the endosteal hypoxic zone may be a cause of minimal residual disease in bone marrow after chemotherapy. *Leuk Res* (2012) **36**(6):e122–4. doi:10.1016/j.leukres.2012.02.028
114. Yook Y-J, Seo Y-J, Kang HJ, Ko S-H, Shin HY, Lee JJ, et al. Induction of hypoxia-inducible factor-1α inhibits drug-induced apoptosis in the human leukemic cell line HL-60. *Korean J Hematol* (2010) **45**(3):158–63. doi:10.5045/kjh.2010.45.3.158
115. Huang Y, Du KM, Xue ZH, Yan H, Li D, Liu W, et al. Cobalt chloride and low oxygen tension trigger differentiation of acute myeloid leukemic cells: possible mediation of hypoxia-inducible factor-1α. *Leukemia* (2003) **17**(11):2065–73. doi:10.1038/sj.leu.2403141
116. Jiang Y, Xue ZH, Shen WZ, Du KM, Yan H, Yu Y, et al. Desferrioxamine induces leukemic cell differentiation potentially by hypoxia-inducible factor-1α that augments transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein-α. *Leukemia* (2005) **19**(7):1239–47. doi:10.1038/sj.leu.2403734
117. Kim JS, Cho EW, Chung HW, Kim IG. Effects of Tiron, 4,5-dihydroxy-1,3-benzene disulfonic acid, on human promyelotic HL-60 leukemia cell differentiation and death. *Toxicology* (2006) **223**(1–2):36–45. doi:10.1016/j.tox.2006.03.004
118. Zhang J, Chen G-Q. Hypoxia-HIF-1α-C/EBPα/Runx1 signaling in leukemic cell differentiation. *Pathophysiology* (2009) **16**(4):297–303. doi:10.1016/j.pathophys.2009.02.005
119. Zhang J, Song L-P, Huang Y, Zhao Q, Zhao K-W, Chen G-Q. Accumulation of hypoxia-inducible factor-1 protein and its role in the differentiation of myeloid leukemic cells induced by all-trans retinoic acid. *Haematologica* (2008) **93**(10):1480–7. doi:10.3324/haematol.13096
120. He M, Wang QY, Yin QQ, Tang J, Lu Y, Zhou CX, et al. HIF-1α downregulates miR-17/20a directly targeting p21 and STAT3: a role in myeloid leukemic cell differentiation. *Cell Death Differ* (2013) **20**(3):408–18. doi:10.1038/cdd.2012.130
121. Gordan JD, Bertout JA, Hu C-J, Diehl JA, Simon MC. HIF-2α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-Myc transcriptional activity. *Cancer Cell* (2007) **11**(4):335–47. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.006
122. Nguyen-Khac F, Della Valle V, Lopez RG, Ravet E, Mauchauffé M, Friedman AD, et al. Functional analyses of the TEL-ARNT fusion protein underscores a role for oxygen tension in hematopoietic cellular differentiation. *Oncogene* (2006) **25**(35):4840–7. doi:10.1038/sj.onc.1209503
123. Liu W, Guo M, Xu Y-B, Li D, Zhou Z-N, Wu Y-L, et al. Induction of tumor arrest and differentiation with prolonged survival by intermittent hypoxia in a mouse model of acute myeloid leukemia. *Blood* (2006) **107**(2):698–707. doi:10.1182/blood-2005-03-1278
124. Velasco-Hernandez T, Hyrenius-Wittsten A, Rehn M, Bryder D, Cammenga J. HIF-1α can act as a tumor suppressor gene in murine acute myeloid leukemia. *Blood* (2014) **124**(24):3597–607. doi:10.1182/blood-2014-04-567065
125. Velasco-Hernandez T, Tornero D, Cammenga J. Loss of HIF-1α accelerates murine FLT-3ITD-induced myeloproliferative neoplasia. *Leukemia* (2015) **29**(12):2366–74. doi:10.1038/leu.2015.156
126. Vukovic M, Guitart AV, Sepulveda C, Villacreces A, O'Duibhir E, Panagopoulou TI, et al. Hif-1α and Hif-2α synergize to suppress AML development but are dispensable for disease maintenance. *J Exp Med* (2015) **212**(13):2223–34. doi:10.1084/jem.20150452
127. Di Giacomo V, Rapino M, Miscia S, Di Giulio C, Cataldi A. Dual role of HIF-1alpha in delivering a survival or death signal in hypoxia exposed human K562 erythroleukemia cells. *Cell Biol Int* (2009) **33**(1):49–56. doi:10.1016/j.cellbi.2008.10.014
128. Silveira VS, Freire BMR, Borges KS, Andrade AF, Cruzeiro GAV, Sabino JPJ, et al. Hypoxia-related gene expression profile in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Leuk Lymphoma* (2014) **55**(8):1751–7. doi:10.3109/10428194.2013.858812
129. Acker T, Diez-Juan A, Aragones J, Tjwa M, Brusselmans K, Moons L, et al. Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2α. *Cancer Cell* (2005) **8**:131–41. doi:10.1016/j.ccr.2005.07.003
130. Lidgren A, Herdberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J, Ljungberg B. The expression of hypoxia-inducible factor 1α is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* (2005) **11**(3):1129–35.
131. Mazumdar J, Hickey MM, Pant DK, Durham AC, Sweet-Cordero A, Vachani A, et al. HIF-2alpha deletion promotes Kras-driven lung tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**(32):14182–7. doi:10.1073/pnas.1001296107
132. Hu J, Handisides DR, Van Valckenborgh E, De Raeve H, Menu E, Vande Broek I, et al. Targeting the multiple myeloma hypoxic niche with TH-302, a hypoxia-activated prodrug. *Blood* (2010) **116**(9):1524–7. doi:10.1182/blood-2010-02-269126
133. Portwood S, Lal D, Hsu YC, Vargas R, Johnson MK, Wetzler M, et al. Activity of the hypoxia-activated prodrug, TH-302, in preclinical human acute myeloid leukemia models. *Clin Cancer Res* (2013) **19**(23):6506–19. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0674
134. Benito J, Shi Y, Szymanska B, Carol H, Boehm I, Lu H, et al. Pronounced hypoxia in models of murine and human leukemia: high efficacy of hypoxia-activated prodrug PR-104. *PLoS One* (2011) **6**(8):e23108. doi:10.1371/journal.pone.0023108
135. Patterson AV, Ferry DM, Edmunds SJ, Gu Y, Singleton RS, Patel K, et al. Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104. *Clin Cancer Res* (2007) **13**(13):3922–32. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0478
136. Konopleva M, Thall PF, Yi CA, Borthakur G, Coveler A, Bueso-Ramos C, et al. Phase I/II study of the hypoxia-activated prodrug PR104 in refractory/relapsed acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* (2015) **100**(7):927–34. doi:10.3324/haematol.2014.118455

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Deynoux, Sunter, Hérault and Mazurier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 2 : Liste des communications orales et affichées

1. Communications orales

- Deynoux M, Ducrocq E, Dakik H, Domenech J, Hérault O, Mazurier F. *Métabolisme, hypoxie et chimiorésistance dans un modèle de niche leucémique.* Colloque du réseau Molécules Marines, Métabolisme et Cancer du Cancéropôle Grand-Ouest, Mansigné, 23 et 24 mai 2019

2. Communications affichées

- Deynoux M, Ducrocq E, Salem K-I, Dakik H, Domenech J, Herault O, Aurrand-Lions M, Mazurier F. *Three AML populations, identified by their adhesion capacity in coculture with human MSCs, show differences in proliferation, metabolism and chemoresistance.* 26e congrès du Club Hématopoïèse et Oncogenèse, Presqu'île de Giens, 9 au 12 octobre 2019

- Deynoux M, Ducrocq E, Dakik H, Domenech J, Hérault O, Mazurier F. *Metabolism, hypoxia and chemoresistance in leukemic niche model.* 13èmes Journées du Cancéropôle Grand Ouest, Tours, 1 et 2 juillet 2019

- Deynoux M, Ducrocq E, Hamard S, Domenech J, Hérault O, Mazurier F. *Characterisation of different leukemic populations in the model of coculture on mesenchymal cells.* Journée de la recherche biomédicale, Angers, 30 novembre 2018
  Prix du meilleur poster, décerné par « La ligue contre le cancer »

- Deynoux M, Ducrocq E, Hamard S, Domenech J, Herault O, Mazurier F. *Characterisation of different leukemic populations in the model of coculture on mesenchymal cells.* 22e Journées Jeunes Chercheurs en Cancérologie de l'ARC, Paris, 28 et 29 novembre 2018

- Deynoux M, Ducrocq E, Hamard S, Domenech J, Herault O, Mazurier F. *Characterisation of different leukemic populations in the model of coculture on mesenchymal cells.* 25e congrès du Club Hématopoïèse et Oncogenèse, Presqu'île de Giens, 10 au 13 octobre 2018

- Deynoux M**,** Domenech J, Hérault O, Mazurier F. *Development of an* in vitro *leukemic niche model.* Journée de la recherche Tours/Angers/Orléans/Mans, Tours, 30 novembre 2017

- Deynoux M**,** Domenech J, Hérault O, Mazurier F. *Development of an* in vitro *leukemic niche model.* 30e colloque Biotechnocentre, Seillac, 12 et 13 octobre 2017

Three AML populations, identified by their adhesion capacity in coculture with human MSCs, show differences in proliferation, metabolism and chemoresistance

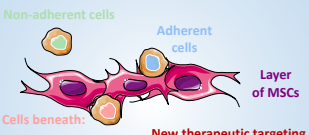
Margaux Deynoux[1], Elfi Ducrocq[1], Kaoutar-Insaf Salem[2], Hassan Dakik[1], Jorge Domenech[1,3], Olivier Hérault[1,3], Michel-Aurrand-Lions[2], Frédéric Mazurier[1]

[1] Université de Tours, ERL CNRS 7001 LNOx "Niche Leucémique et Métabolisme Oxydatif", EA 7501 GICC, Tours, France
[2] Aix-Marseille Université, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France
[3] CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, Tours, France

Introduction

More than 50 % of patients with acute myeloid leukemia (AML) relapse. Leukemic cells interact with the bone marrow (BM) microenvironment that could contribute to their protection against chemotherapy. The oxidative stress, relayed by reactive oxygen species (ROS), seems a key factor in the pathology. High levels of ROS promote blast proliferation, whereas low levels are associated to stem cell self-renewal. Hypoxia in the BM may modulate this stress and favors chemoresistance through hypoxia-inducible factors (HIFs) activation. To mimic the leukemic niche, we used an *in vitro* model based on the coculture of AML cells (MV4-11 cell line) with BM mesenchymal stromal cells (MSCs). We aimed to identify AML subpopulations based on their capacity to adhere to MSCs in coculture, and to link hypoxia, metabolism and chemoresistance in these cells.

Abstract



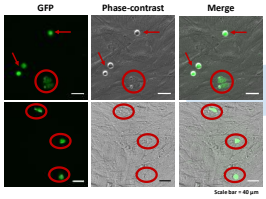
Objectives

There is a need for an *in vitro* model of the hypoxic niche to better understand mechanisms leading to chemoresistance and improve AML therapy. This model may help to study different leukemic populations in the same microenvironment.

1. Establishment of a coculture system: MSCs and AML cells
2. Identification and characterisation of different AML cell populations by their:
   i. Level of hypoxia
   ii. Proliferation, cell cycle and cell capacities
   iii. Oxidative metabolism
   iv. Chemoresistance to Ara-C
3. Targeting of chemoresistant cells with an inhibitor of hypoxia-inducible factors (HIF).

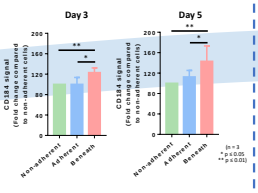
Different leukemic populations

MV4-11-GFP cells were cultured on MSCs layer and observed by fluorescent microscopy after 72h.



In the coculture, we distinguished 3 populations based on their adherence ability: **non-adherent cells** (not visible after 1st washing), **adherent cells** (arrows) **and cells beneath** (circles).

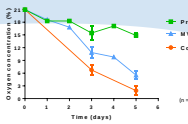
The 3 AML populations were stained with **anti-CXCR4 antibody** coupled to APC.



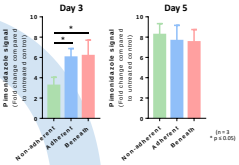
Cells beneath have increased expression of CXCR4 compared to other populations.

Hypoxia profile

Phosphorescence of extracellular beads, which depends of the rate of oxygen, was measured in the medium with a specific detector (OPAL Ibidi) on a fluorescence microscope.



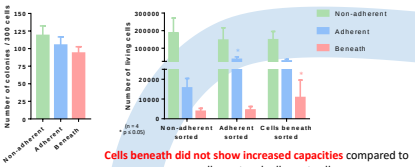
Pimonidazole, which forms adducts under hypoxia, was added for 2 h to the coculture. The 3 AML populations were fixed, permeabilized, and stained with an antibody that recognizes the adducts. The analysis was performed by flow cytometry.



Natural hypoxia appears in coculture and is followed by increased hypoxia staining in the AML cells, particularly in the adherent cells and beneath the MSCs.

Cell capacities

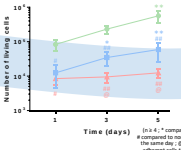
Quiescence often characterize stem cell. To determine whether cells beneath are more immature than the others, we performed **clonogenic assay, repopulating assay,** and **xenografts** after cell sorting (day 3).



Cells beneath did not show increased capacities compared to non-adherent and adherent cells.

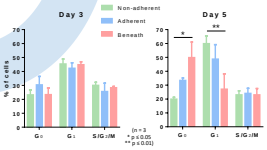
Quiescence

Since **hypoxia can modulate cell proliferation** the 3 populations were counted over the time.



Cells beneath remain constant over time.

To explain differences in cellular growth, cell cycle was examined by flow cytometry after **7-AAD/Ki-67 staining.**

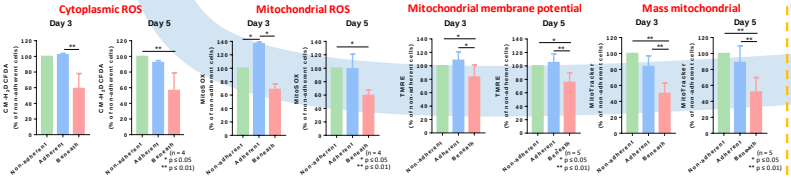


Cells beneath the MSCs had a strong increase in the G_0 phase after 5 days.

Oxidative metabolism

To determine whether quiescent cells have modified oxidative metabolism, the 3 populations were stained with 2 fluorescent probes, **CM-H_2DCFDA and MitoSOX, that detect cytoplasmic and mitochondrial ROS, respectively.** The fluorescence was measured by flow cytometry.

Since mitochondrial ROS had decreased, we measured mitochondrial activity and mass, by **TMRE and MitoTracker,** respectively.

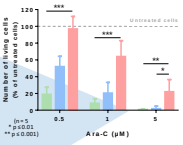


AML cells beneath the MSCs had decreased both cytoplasmic and mitochondrial ROS levels. The contact with MSCs does not seem to be sufficient to reduce ROS.

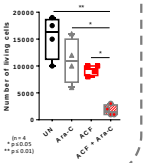
The mitochondrial activity is explained by a strong decrease in the mitochondrial mass as determined by MitoTracker Deep Red staining.

Chemoresistance

At day 3, coculture was treated with **Ara-C at 0.5, 1 or 5 µM.** The AML populations were enumerated after 3 additional days.



Leukemic cells beneath MSCs are more chemoresistant to Ara-C than the others showing that supernatant and contact is not sufficient to induce resistance.



At day 3, the coculture was **pre-incubated 1 h with 0.5 µM of acriflavine (ACF, a non-specific inhibitor of HIFs)** before adding **Ara-C at 1 µM.** Cells beneath were enumerated 3 days later.

The treatment restores chemosensitivity to Ara-C.

Conclusions & perspectives

- To *in vitro* mimic the leukemic niche, we used a coculture system of AML cells on human BM MSCs and identified three populations of AML cells on their capacity to adhere to the MSCs. The cells that migrate beneath the MSC layer acquire hypoxic status, quiescence, but no specific repopulate and xenograft capacities. They also have a low oxidative metabolism and a strong chemoresistance. This demonstrates that supernatant or MSC contact are not sufficient to induce chemoresistance.
- The treatment of cells by Ara-C in combination with a HIF inhibitor restored chemosensitivity of cells beneath. We wish to determine the involvement of each HIF using shRNA against *HIF1A* and *HIF2A*. We further aim to link hypoxia and oxidative metabolism to the chemoresistance.
- This work should contribute to a better understanding of the mechanisms by which the hypoxia in the microenvironment may affect the chemoresistance.

Metabolism, hypoxia and chemoresistance in leukemic niche model

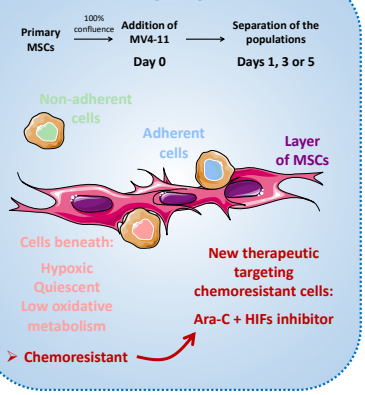
Margaux Deynoux[1], Elfi Ducrocq[1], Hassan Dakik[1], Jorge Domenech[1,2], Olivier Hérault[1,2], Frédéric Mazurier[1]

[1] Université de Tours, ERL CNRS 7001 LNOx "Niche Leucémique et Métabolisme Oxydatif", EA 7501 GICC, Tours, France
[2] CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, Tours, France

Introduction

More than 50 % of patients with acute myeloid leukemia (AML) relapse. Leukemic cells interact with the bone marrow (BM) microenvironment that contributes to their protection against chemotherapy. The oxidative stress, relayed by reactive oxygen species (ROS), seems a key factor in the pathology. A high level of ROS promotes blast proliferation while a low level is associated to stem cell self-renewal. The BM, impoverished of oxygen, can modulate this stress and favors chemoresistance. To mimic the leukemic niche, we developed an *in vitro* model based on coculture of AML cells (MV4-11 cell line) with BM mesenchymal stromal cells (MSCs). We characterized three populations of leukemic cells: non-adherent cells, adherent cells and cells beneath the MSC layer. Then, we intend to highlight a link between hypoxia, oxidative metabolism and chemoresistance.

Abstract



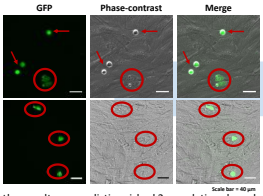
Objectives

To better understand mechanisms leading to chemoresistance and improve AML therapy, there is a need for an *in vitro* model of the niche. This model may help to study different leukemic populations in the same microenvironment.

1. Establishment of a coculture system: MSCs and AML cells
2. Identification and characterisation of different AML cell populations by their:
   i. Level of hypoxia
   ii. Proliferation and cell cycle
   iii. Oxidative metabolism
   iv. Chemoresistance to Ara-C
3. Targeting of chemoresistant cells with inhibitor of hypoxia-inducible factors (HIF).

Different leukemic populations

MV4-11-GFP cells were cultured on MSCs layer and observed by fluorescent microscopy after 72 h.

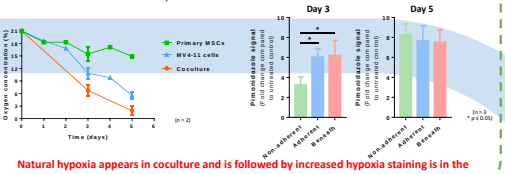


In the coculture, we distinguished 3 populations based on their adherence ability: **non-adherent cells** (not visible after washing), **adherent cells** (arrows) **and cells beneath** (circles).

Hypoxia profile

Phosphorescence of extracellular beads, which depends of the rate of oxygen, was measured in the medium with a specific detector (OPAL Ibidi) on a fluorescence microscope.

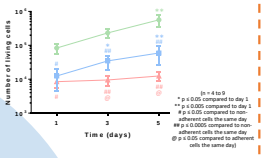
Pimonidazole, which forms adducts under hypoxia, was added for 2 h to the coculture. The 3 AML populations were fixed, permeabilized, and stained with an antibody that recognizes the adducts. The analysis was performed by flow cytometry.



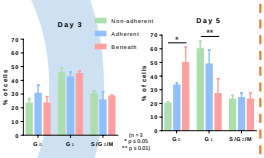
Natural hypoxia appears in coculture and is followed by increased hypoxia staining is in the AML cells, particularly in the cells adherent and beneath the MSCs.

Quiescence

Since **hypoxia can modulate cell proliferation** the 3 AML populations was counted at days 1, 3 and 5.



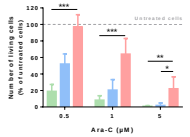
In order to explain why cells beneath the MSCs have lower proliferation, AML cells were stained with **7-AAD/Ki67 to analyse cell cycle** by flow cytometry.



Cells beneath the MSCs had increased quiescent, as evidenced by the increased proportion of cells in G_0 phase.

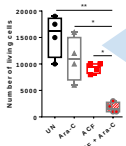
Chemoresistance

At day 3, the coculture was treated with **Ara-C at 0.5, 1 or 5 µM** (control was DMSO-treated cells). The 3 AML populations were then enumerated after 3 additional days.



Leukemic cells beneath the MSCs are more chemoresistant to Ara-C than the others showing that contact is not sufficient by itself to induce resistance.

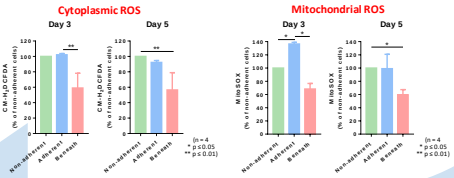
At day 3, the coculture was **pre-incubated 1 h with 0.5 µM of acriflavine (ACF, a non-specific inhibitor of HIFs)** before adding **Ara-C at 1 µM.** The cells beneath were then enumerated after 3 additional days of culture.



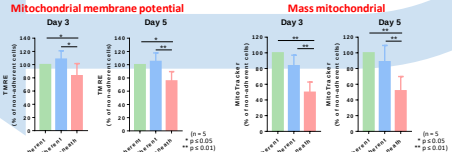
The double treatment restores chemosensitivity to Ara-C of cells beneath.

Oxidative metabolism

To observe whether quiescent cells have low oxidative metabolism, the 3 AML populations was stained with 2 different probes, **CM-H_2DCFDA and MitoSOX, for cytoplasmic and mitochondrial ROS detection, respectively.** The fluorescence of the probes was followed by flow cytometry.



AML cells beneath the MSCs have decreased cytoplasmic and mitochondrial ROS levels. However, the contact with MSCs is not sufficient to reduce ROS.



Since mitochondrial ROS were decreased, we also measured mitochondrial activity by **TMRE that detects their membrane potential.**

The mitochondrial activity decreased in cells beneath the MSCs, and is possibly explained with the decrease of the mitochondrial mass as determined by MitoTracker Deep Red staining.

Conclusions & perspectives

- To *in vitro* mimic the leukemic niche, we used a coculture system of AML cells on BM MSCs and identified three populations of AML cells on their capacity to adhere to the MSCs. The cells that migrate beneath the MSC layer acquire hypoxic status, quiescence, a low oxidative metabolism and a strong chemoresistance. This demonstrates that supernatant or MSC contact are not sufficient to induce chemoresistance.
- The treatment of cells by Ara-C in combination with a HIF inhibitor restored chemosensitivity of cells beneath. We wish to determine the involvement of each HIF using shRNA against *HIF1A* and *HIF2A.* We further aim to determine the phenotype of each population and their clonogenic and engraftment capacities, and to link hypoxia and oxidative metabolism to the chemoresistance.
- This work should contribute to a better understanding of the mechanisms by which the hypoxia in the microenvironment may affect the chemoresistance.

Characterisation of different leukemic populations in the model of coculture on mesenchymal cells

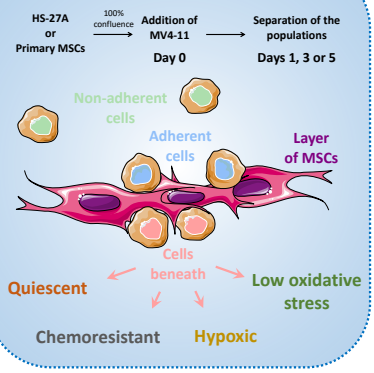
Margaux Deynoux[1], Elfi Ducrocq[1], Sohie Hamard[1], Jorge Domenech[1,2], Olivier Hérault[1,2], Frédéric Mazurier[1]

[1] Université de Tours, ERL CNRS 7001 LNOx "Niche Leucémique et Métabolisme Oxydatif", EA 7501 GICC, Tours, France
[2] CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, Tours, France

Introduction

More than 50% of patients with acute myeloid leukemia (AML) relapse. Leukemic cells interact with the bone marrow (BM) microenvironment that contributes to their protection against chemotherapy. The oxidative stress, relayed by reactive oxygen species (ROS), seems a key factor in the pathology. A high level of ROS promotes blast proliferation while a low level is associated to stem cell self-renewal and leukemia aggressiveness. To mimic the leukemic niche, we developed an *in vitro* model based on coculture of AML cells (MV4-11 cell line) with BM mesenchymal stromal cells (MSCs). We characterized three populations of leukemic cells: non-adherent cells, adherent cells and cells beneath the MSC layer. Then, we intend to highlight a link between hypoxia, oxidative metabolism and chemoresistance.

Abstract



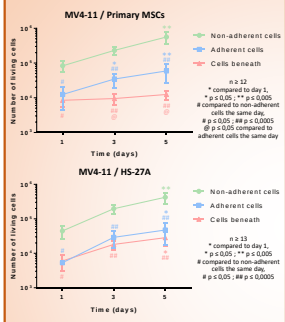
Objectives

In order to understand chemoresistance mechanism and improve AML therapy, there is a requirement for an *in vitro* niche model allowing the study of different leukemic populations in the same microenvironment.

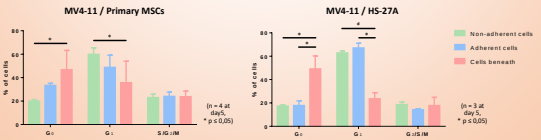
1. **Establishment of a coculture system using MSCs and AML cells**
2. **Characterisation of the AML cell populations in terms of:**
   i. **Proliferation and cell cycle**
   ii. **Chemoresistance to Ara-C**
   iii. **Level of hypoxia**
   iv. **Oxidative metabolism**

Proliferation

At day 1, 3 and 5, **non-adherent cells were harvested by removing the medium, adherent cells by several PBS soft washes and cells beneath by trypsinization with the layer of MSCs.**
The 3 AML populations was then counted by Trypan blue exclusion assay.



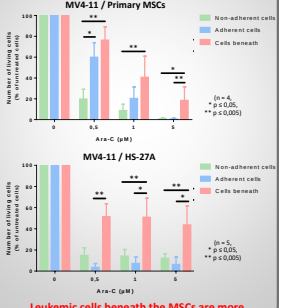
In order to determine why cells beneath the MSCs have low proliferation, the 3 AML populations were stained with **7-AAD/Ki67 to analyse the cell cycle** by flow cytometry.



In the coculture, we can distinguish 3 cell populations: **non-adherent cells, adherent cells and cells beneath**, with different proliferation capacities.
Cells beneath are more quiescent, with an increase in the proportion of cells in G_0 phase of cell cycle.

Chemoresistance

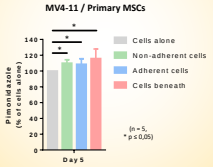
At day 3, the coculture was treated with **Ara-C at 0.5, 1 or 5 µM** (DMSO-treated cells were used as control). The 3 AML populations were then enumerated after 3 additional days.



Leukemic cells beneath the MSCs are more chemoresistant to Ara-C. Contact is not sufficient to induce resistance.

Hypoxia

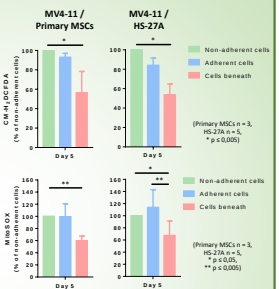
Pimonidazole, which forms detectable adducts under hypoxia, was added for 2h to the coculture. The 3 AML populations were fixed, permeabilized, and stained with an antibody that recognizes the adducts. The analysis was then performed by flow cytometry.



The coculture with MSCs tends to increase hypoxia staining in the AML cells.
Interestingly, the cells beneath seem to have the most hypoxic profile.

Oxidative metabolism

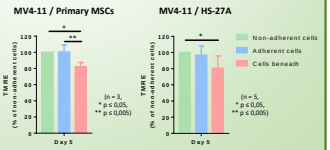
The 3 populations are stained with 2 different probes (15 min at 37°C in the dark), **CM-H_2DCFDA and MitoSOX, for cytoplasmic and mitochondrial ROS detection, respectively.**
The fluorescence of the probes are followed by flow cytometry.



The **AML cells beneath the MSCs have decreased both cytoplasmic and mitochondrial ROS levels.**
Contact with MSCs is not sufficient to reduce ROS.

Since mitochondrial ROS were decreased, we measured mitochondrial activity by **TMRE that detects their membrane potential**.

After 15 min of incubation in the dark at 37°C, the fluorescence of the probe was detected by flow cytometry in the 3 AML populations.



The mitochondrial activity decreased in cells beneath the MSCs.

Conclusions & perspectives

*** To *in vitro* mimic the leukemic niche, we used a coculture system of AML cells on BM MSCs and identified 3 populations of AML cells. The cells that migrate beneath the MSC layer are quiescent and have a strong chemoresistance. This demonstrates that supernatant or MSC contact are not sufficient to induce by themselves chemoresistance. We also observed that these cells have a low oxidative metabolism and acquire an hypoxic status.**
*** We further aim to determine the phenotype of each population and their clonogenic and engraftment capacities, and to link hypoxia and oxidative metabolism to the chemoresistance. We also wish to determine the involvement of hypoxia-inducible factors (HIF) and thus we will use pharmacological inhibitors known to block HIFs as well as shRNA.**
*** This work should contribute to a better understanding of the mechanisms by which the hypoxia in the microenvironment may affect the chemoresistance.**

Development of an *in vitro* leukemic niche model

Margaux Deynoux[1], Jorge Domenech[1,2], Olivier Hérault[1,2], Frédéric Mazurier[1]

[1] Université François-Rabelais de Tours, CNRS, GICC UMR 7292, Tours, France
[2] CHRU de Tours, Service d'Hématologie Biologique, Tours, France

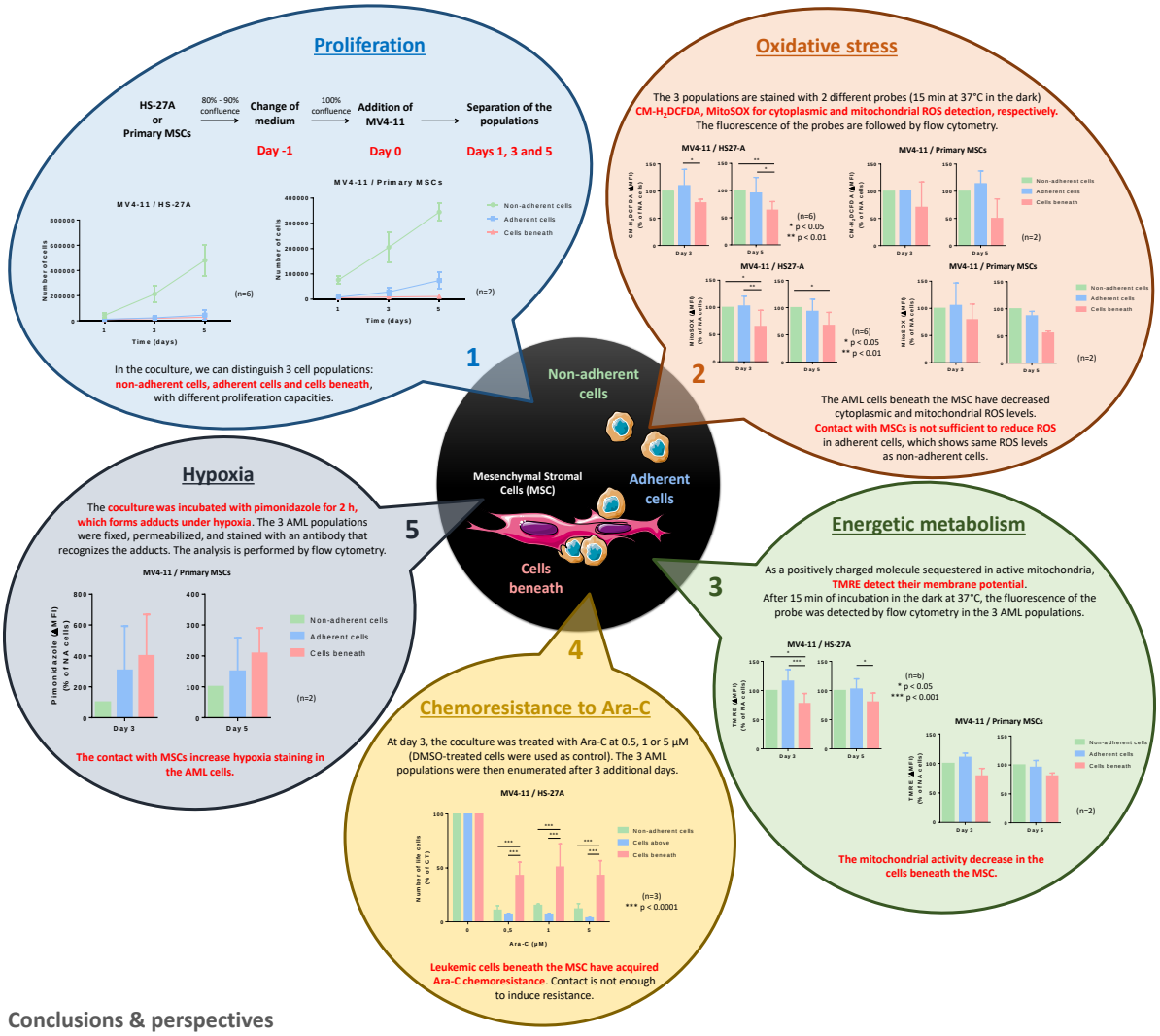
Introduction

The medullary microenvironment constitutes a niche protecting and favouring the development of leukemic cells. The normal and leukemic bone marrow (BM) is weakly oxygenated (hypoxia). Furthermore, hypoxia influences proliferation, differentiation and chemoresistance of cancer cells. We aim to understand whether hypoxia is a key factor of acute myeloid leukemias (AML) microenvironment. To mimic the leukemic niche, we developed an *in vitro* model based on coculture of AML cells with BM mesenchymal stromal cells (MSC). We highlighted three populations of leukemic cells: non-adherents cells, adherents cells and cells beneath the layer of MSC. We are now intend to reveal hypoxia in the coculture and to highlight a link between hypoxia, oxidative metabolism and chemoresistance.

Objectives

In order to understand chemoresistance mechanism and improve AML therapy, there is a requirement for an *in vitro* niche model allowing the study of different leukemic populations in the same microenvironment.

1. **Establishment of a coculture system using MSC and AML cells**
2. **Characterisation of the AML cell populations in terms of proliferation, oxidative metabolism, hypoxia and chemoresistance.**



Conclusions & perspectives

*** To *in vitro* mimic the leukemic niche, we established a coculture system of AML cells with MSC, which identified 3 cell populations of AML cells. The cells that migrates beneath the MSC layer have a weak proliferation and a strong chemoresistance. This demonstrates that supernatant or MSC contact is not sufficient to induce chemoresistance. We also observed that these cells have a low oxidative metabolism and acquire an hypoxic status.**

*** Now, we aim to highlight the link between hypoxia and oxidative metabolism, and consequently with the chemoresistance. In order to address this issue, we will use *i)* pharmacological inhibitors known to block the hypoxia-inducible factors (HIF), and *ii)* shRNA that target HIF.**

*** This work should contribute to a better understanding of the mechanisms by which microenvironment and hypoxia may affect the chemoresistance.**

Margaux DEYNOUX

Incidence de l'hypoxie sur le métabolisme oxydatif des leucémies aiguës myéloïdes

Établissement et caractérisation d'un modèle *in vitro* de niche leucémique

Résumé

Dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), un taux élevé d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est connu pour favoriser la prolifération de blastes, alors qu'un niveau faible promeut la quiescence des cellules souches leucémiques. La faible oxygénation, ou hypoxie, de la niche médullaire pourrait contribuer à la chimiorésistance des LAM en diminuant le stress oxydatif. Les facteurs induits par l'hypoxie (HIF) sont impliqués dans le contrôle du métabolisme et des enzymes antioxydantes. Leur inhibition conduit à un stress et à la mort des cellules de LAM. Mon objectif était d'étudier un lien entre l'hypoxie, le métabolisme oxydatif et la chimiorésistance dans un modèle *in vitro* de culture de cellules de LAM. L'acquisition d'un profil hypoxique par les cellules souches hématopoïétiques (CSH), cultivées avec des cellules stromales mésenchymateuses (CSM) médullaires, a été montré. Nous avons postulé que les cellules leucémiques pouvaient également l'acquérir en coculture avec des CSM humaines. Pour le démontrer, nous avons cultivé des cellules de LAM primaires ou de la lignée MV4-11 sur des CSM humaines primaires ou de la lignée HS-27a. A l'instar des CSH, nous avons identifié trois populations leucémiques en fonction de leur capacité d'adhérence sur les CSM : en suspension, adhérentes aux CSM et nichées dans les CSM. Les cellules nichées, les plus adhérentes, ont une plus forte expression du CXCR4 que les autres. Elles sont aussi plus résistantes de 2 à 7 fois à la cytarabine. Cependant, aucune modification du phénotype souche et des capacités clonogéniques, de repopulation ou de xénogreffe, n'a pu être associée aux cellules nichées comparées aux deux autres populations. En revanche, les cellules nichées présentent un profil hypoxique, une plus faible prolifération avec une augmentation de la phase G_0, et de plus faibles niveaux de ROS en lien avec une masse mitochondriale diminuée. Ceci suggère donc un lien entre la chimiorésistance et l'hypoxie ou le métabolisme, plutôt qu'avec une capacité souche. Nous avons aussi montré que l'acriflavine, un inhibiteur non spécifique des HIF, pouvait avoir un effet synergique avec la cytarabine sur les cellules nichées chimiorésistantes. Nos résultats montrent que le surnageant ou le simple contact avec les CSM ne suffisent pas à induire le changement métabolique et la résistance à la cytarabine. Nous pensons que l'hypoxie dans la niche peut moduler le métabolisme oxydatif et donc la chimiorésistance par des mécanismes directs et/ou indirects via l'expression de CXCR4, montré récemment comme impliqué dans la régulation du stress oxydatif des CSH.

Mots clés : Chimiorésistance, Hypoxie, Leucémie aiguë myéloïde, Métabolisme oxydatif, Microenvironnement

Abstract

In acute myeloid leukemia, a high level of ROS is known to favor blasts proliferation, whereas a low level promotes stem cells quiescence. The low oxygenation, or hypoxia, of the bone marrow niche could contribute to chemoresistance of AML cells by reducing the oxidative stress. Hypoxia-inducible factors (HIF) are involved in the control of the cell metabolism and antioxidant enzymes. HIFs inhibition leads to AML cells stress and death. The purpose of this work was to study a link between hypoxia, oxidative metabolism and chemoresistance in an *in vitro* model of leukemic cell culture. The acquisition of a hypoxic profile by hematopoietic stem cells (HSC) cultured with medullary mesenchymal stromal cells (MSC), has been shown. We hypothesized that AML cells may also acquire such profile in a coculture with human MSCs. To demonstrate that, we cultivated primary AML cells or the MV4-11 cell line on primary human MSCs or the HS-27a cell line. Like HSCs, we identified three leukemic populations according to their adhesion capacity to MSCs: in suspension, adherent to MSCs and embedded in MSCs. Embedded cells, the most adherent, have stronger CXCR4 expression compared to the others. They are also 2- to 7-fold more resistance to cytarabine. However, no change in the stem cell phenotype profile and in the clonogenic, repopulation or xenograft capacities, could be associated with the embedded cells compared to other populations. In contrast, embedded cells present a hypoxic profile, a weak proliferation with increased G_0 phase, and lower ROS level that may rely on lower mitochondrial mass. This suggests that chemoresistance mainly relies on hypoxia or cell metabolism rather than a higher stem cell capacity. Furthermore, we have shown that acriflavine, a non-specific HIF inhibitor, could synergize with the cytarabine to eliminate embedded chemoresistant cells. Our results show that the MSC supernatant or a simple contact are not sufficient to induce metabolic change and resistance to cytarabine. We assume that hypoxia in the niche may modulate the oxidative metabolism and the chemoresistance by direct mechanisms and/or indirect ones through CXCR4 expression, a chemokine receptor shown to be involved in the regulation of the oxidative stress in HSC.

Keywords: Chemoresistance, Hypoxia, Acute myeloid leukemia, Oxidative metabolism, Microenvironment