

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

**ECOLE DOCTORALE : ENVIRONNEMENTS – SANTE**

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

présentée et soutenue publiquement le 31 Janvier 2017

par

**Laetitia SAINT-PAUL**

**Rôle de la protéine phosphatase CD45 et des radeaux  
lipidiques dans le maintien des leucémies aiguës  
myéloblastiques et développement d'un nouveau  
traitement thérapeutique**

**Centre de Recherche Inserm U866 de Dijon**

**Jury**

Monsieur Philippe Saas	Président
Monsieur Philippe Katner	Rapporteur
Madame Estelle Duprez	Rapporteur
Madame Nathalie Droin	Examineur
Monsieur Ronan Quéré	Examineur
Monsieur Jean-Noël Bastie	Directeur

## Remerciements

*Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du jury :*

*Monsieur **Philippe Saas** d'avoir accepté la présidence du jury de ma thèse.*

*Madame **Estelle Duprez** et Monsieur **Philippe Kastner** d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.*

*Madame **Nathalie Droin** d'avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*Monsieur **Laurent Delva** pour tes conseils et ta disponibilité ainsi que les corrections des rapports. Et bien sur, pour ton humour légendaire.*

*Monsieur **Jean-Noël Bastie** pour ta gentillesse et tes conseils*

*Monsieur **Ronan Quéré** de m' avoir encadré, supporté et soutenu depuis le Master 2. Merci de m' avoir apporté tant de connaissances et d' avoir non seulement dirigé mais aussi participé activement à ce projet de thèse.*

*Je remercie vivement tous les membres de l'équipe RGHL :*

*Les anciens : **Laurence** pour tes conseils avisés, **Anne, Romain, Jean, Valérie et Marie**, pour votre accueil chaleureux dans l'équipe.*

*Ceux qui nous ont rejoins : **Anne**, pour ta bonne humeur à toute épreuve. Bon courage à toi et **Baptiste** pour la suite de votre thèse. **Magalie**, je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière et **François**, bienvenue dans l' équipe.*

*Et un merci particulier à **Jennifer**. Ma « binôme de fac », ça fait déjà plusieurs années que l' on travaille ensemble, merci pour ton soutien, aussi bien professionnel que personnel.*

*Un grand merci aux « copains de promos » : **Victor, Etienne, Alex, Pierre et Shirley, Jen et Kevin**, et à tous ceux qui ont rejoins notre petit groupe : **Thibault et Doudoune, Marion et Vincent, Seb, Aymeric, Julien, Guillaume, Olivier et Cindy**. Merci pour votre amitié et tous ces bons moments partagés.*

*Merci également à ma famille, qui m' a toujours soutenu.*

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>1. L'hématopoïèse et la leucémogénèse</b> .....	2
<b>1.1. L'hématopoïèse</b> .....	2
1.1.1. Généralités .....	2
1.1.2. Les cellules souches hématopoïétiques .....	2
1.1.3. La hiérarchie hématopoïétique .....	5
1.1.4. La différenciation hématopoïétique et sa régulation .....	9
1.1.4.1 <i>Facteurs de transcription</i> .....	9
1.1.4.2 <i>Facteurs de croissance</i> .....	9
<b>1.2. La leucémogénèse</b> .....	13
1.2.1. Généralités .....	13
1.2.2. Les leucémies myéloblastiques aiguës .....	14
1.2.2.1. <i>Epidémiologie</i> .....	14
1.2.2.2. <i>Diagnostic</i> .....	14
1.2.2.2.1. <i>Classification</i> .....	15
1.2.2.3. <i>Altérations génétiques à l'origine des leucémies myéloblastiques aiguës</i> .....	15
1.2.2.4. <i>Modèles murins</i> .....	17
<b>1.3 Traitement actuel</b> .....	19
<b>2. La voie de signalisation GM-CSF/Lyn/CD45</b> .....	21
<b>2.1 GM-CSF</b> .....	21
2.2. 1 Historique .....	21
2.1.2 Fonctions biologiques .....	21
<b>2.2 Le récepteur au GM-CSF</b> .....	23
2.2.1 Historique et généralités .....	23

2.2.2	Structure du récepteur au GM-CSF .....	23
2.2.3	Activation du récepteur .....	24
<b>2.3</b>	<b>Lyn .....</b>	<b>25</b>
2.3.1	Fonction .....	25
2.3.2	Historique .....	25
2.3.3	Structure .....	26
2.3.4	Structure secondaire de Lyn .....	28
2.3.4.1	<i>Conformation inactive</i> .....	28
2.3.4.1.1	<i>Interaction SH3/Segment de liaison</i> .....	28
2.3.4.1.2	<i>Intercation SH2/Y507</i> .....	30
2.3.4.2	<i>Conformation active</i> .....	31
2.3.5	Régulation de l'activité de Lyn .....	31
2.3.5.1	<i>Les kinases</i> .....	32
2.3.5.2	<i>Les phosphatases</i> .....	33
<b>2.4</b>	<b>Le CD45 .....</b>	<b>35</b>
2.4.1	Introduction .....	35
2.4.2	Structure .....	35
2.4.3	Régulation du CD45 .....	37
2.4.3.1	<i>Ligands du CD45</i> .....	37
2.4.3.2	<i>Dimérisation du CD45</i> .....	38
2.4.3.3	<i>Isoformes du CD45</i> .....	40
2.4.3.4	<i>Interaction du CD45 avec d'autres protéines</i> .....	40
2.4.3.5	<i>La localisation du CD45</i> .....	41
<b>3</b>	<b>Les radeaux lipidiques .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Historique .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>Composition de la membrane plasmique .....</b>	<b>42</b>
3.2.1	Les glycérophospholipides .....	44
3.2.2	Les sphingolipides .....	44
3.2.3	Les stérols .....	44

3.2.4 Asymétrie de la membrane plasmique .....	44
3.2.5 Les protéines .....	46
<b>3.3 La compartimentation membranaire .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4 Les radeaux lipidiques .....</b>	<b>47</b>
3.4.1 Historique .....	47
3.4.2 Dynamique des radeaux lipidiques .....	48
3.4.3 Formation des radeaux lipidiques.....	48
3.4.4 Protéines associées aux radeaux lipidiques .....	49
3.4.5 Rôle des radeaux lipidiques .....	50
3.4.6 Isolement des radeaux lipidiques .....	50
<b>4. Impact des radeaux lipidiques et de la voie du GM-CSF/CD45 dans la leucémogénèse .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Le récepteur au GM-CSF est surexprimé à la surface des blastes .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3 Les blastes produisent du GM-CSF .....</b>	<b>51</b>
<b>4.4 Activation constitutive de la voie du GM-CSF dans les blastes .....</b>	<b>51</b>
4.4.1 Suractivation de Lyn .....	51
4.4.2 Dérégulation du CD45 .....	52
4.4.3 Suractivation de Stat3 .....	52
<b>4.5 Les inhibiteurs de la voie du GM-CSF .....</b>	<b>52</b>
<b>5. Chimiothèque .....</b>	<b>53</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>56</b>
<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>57</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>73</b>

## **Abréviations :**

**ATRA** : *all-trans retinoic acid* ou acide rétinoïque tout-trans

**AML1** : *acute myeloid leukemia 1*

**bZip** : *basic region/leucine zipper*

**C-terminal** : carboxy-terminal

**CD34** : *cluster of differentiation 34*

**C/EBP** : CCAAT/enhancer binding protein

**CFU** : *colony forming unit*

**CHK** : *CSK-homologous kinase*

**CLP** : *common lymphoid progenitors*

**CMP** : *common myeloid progenitors*

**CSF** : *colony stimulating factor*

**CSH** : cellules souches hématopoïétiques

**CSK** : *C-terminal SRC kinase*

**CTB** : *Cholera Toxin Subunit B*

**DFF40** : facteur de fragmentation de l'ADN 40

**EGF** : *epidermal growth factor*

**EGFR** : *epidermal growth factor receptor*

**ETO** : *eight twenty one*

**ETS** : *E-twenty six*

**FAB** : *French-American-British Cooperative Group*

**FCεRI** : récepteur à haute affinité de l'immunoglobuline E

**FLT3** : *fms-related tyrosine kinase 3*

**FRET** : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

**GATA1** : GATA binding protein 1

**G-CSF** : *granulocyte stimulating factor*

**Glu** : acide glutamique

**Gln** : glutamine

**GM-CSF** : *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*

**GM-CSFR** : *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor receptor*

**GMP** : *granulocyte-macrophage progenitors*

**GPI** : *glycosylphosphatidylinositol*

**HLA- DR** : *human leukocyte antigen-DR*

**IC50** : Concentration inhibitrice médiane

**IL** : interleukine

**IRF8** : *interferon regulatory factor 8*

**KLF4** : *krüppel-like factor 4*

**LAL-T** : leucémies aiguës lymphoblastiques T

**LAM** : leucémies aiguës myéloblastiques

**LCA** : *leukocyte common antigen*

**LMPP** : progéniteur lymphoïde multipotent intermédiaire

**LPAP** : *lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein*

**LSK** : lin-Sca-1- c-kit +

**LT-HSC** : *long-term HSC*

**MAFB** : *musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*

**MGG** : May-Grünwald Giemsa

**M-CSF** : *macrophage stimulating factor*

**MEP** : *megakaryocyte-erythroid progenitors*

**MPP** : *multipotent progenitors*

**MyRPs** : *myeloid-restricted progenitors with long-term repopulating activity*

**NUP98** : *nucleoporin 98*

**N-terminal** : amino-terminal

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PDGFR** : *platelet derived growth factor receptor*

**PML** : *promyelocytic leukemia protein*

**PP1** : pyrazolopyrimidine 1

**PPII** : *polyproline type-II helical structures*

**PTP** : protéine tyrosine phosphatase

**RAR $\alpha$**  : *retinoic acid receptor alpha*

**r-GM-CSF** : GM-CSF recombinant

**RTK** : récepteurs tyrosine kinases

**SCF** : *stem cell factor*

**SFK** : *Src-family tyrosine kinases*

**SH2** : *Src homology 2*

**SH3** : *Src homology 3*

**Shp1** : *Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1*

**Shp2** : *Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-2*

**SPI-1/PU.1** : *spleen focus forming virus proviral integration site 1/ purine rich box.1*

**ST-HSC** : *short term-HSC*

**TCR** : *T-cell receptor*

**TPO** : thrombopoïétine

**VD** : vitamine D

**Wt** : *wild-type*

**Y** : tyrosine

**Y 396** : tyrosine activatrice, en position 396 de Lyn

**Y 507** : tyrosine inhibitrice, en position 507 de Lyn

**µm** : micromètre

**nm** : nanomètre

## Liste des figures

**Figure 1** : Expression des marqueurs de surface des cellules souches hématopoïétiques.

**Figure 2** : Modèles de hiérarchie hématopoïétique

**Figure 3** : Principaux facteurs de transcription impliqués dans la hiérarchie hématopoïétique

**Figure 4** : Principaux facteurs de croissance impliqués dans la hiérarchie hématopoïétique

**Figure 5** : Modèle murin d'étude des LAM

**Figure 6** : Le récepteur au GM-CSF

**Figure 7** : Structure de Lyn

**Figure 8** : Conformation et régulation de Lyn

**Figure 9** : Régulation de Lyn par le CD45

**Figure 10** : Structure de CD45

**Figure 11** : Régulation du CD45 par dimérisation dépendante des isoformes

**Figure 12** : (A) Structure générale d'un glycérophospholipide

(B) Les différents glycérophospholipides

(C) Structure générale d'un sphingolipide

**Figure 13** : Structure générale du cholestérol

**Figure 14** : Le cholestérol dans la membrane plasmique

**Figure 15** : La membrane plasmique

**Figure 16** : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* délocalise le CD45 en dehors des radeaux lipidiques et inhibe la voie du GM-CSF suractivée dans les blastes leucémiques.

**Figure 17** : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* induit l'apoptose et la différenciation des cellules LAM

**Figure 18** : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* n'induit pas la différenciation des cellules de LAM en macrophages fonctionnels

**Figure 19** : La voie du GM-CSF induit la prolifération cellulaire et est suractivée dans les cellules leucémiques

**Figure 20** : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* agit uniquement sur l'activité de Stat3 dans la voie du GM-CSF

**Figure 21** : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* n'est pas un inhibiteur de kinases ou de l'activité phosphatase du CD45

**Figure 22** : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* délocalise le GM-CSFR en dehors des radeaux lipidiques

**Figure 23** : Les cellules HOXA9-MEIS1 expriment une majorité de CD45RB

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Mon travail de thèse a consisté à caractériser la cible moléculaire d'un composé chimique appartenant à la famille des *Pyrido[4,3b]quinoxaline (PyQ)*, toxique pour les cellules de leucémie myéloblastique aiguë mais pas pour les cellules saines.

L'hématopoïèse est un processus actif, ordonné et hautement régulé faisant intervenir des étapes de prolifération, de différenciation et d'apoptose, et permettant la production de toutes les cellules sanguines matures à partir d'un nombre restreint de cellules souches hématopoïétiques. La dérégulation des mécanismes intervenant dans l'hématopoïèse induit le développement d'hémopathies, notamment de leucémies. Ainsi, la première partie de l'introduction traitera de l'hématopoïèse et de la leucémogénèse.

Dans la seconde partie de l'introduction, la voie de signalisation du GM-CSF/Lyn et sa régulation par le CD45 sera détaillée.

Le GM-CSF est un facteur de croissance induisant la prolifération cellulaire. Nous verrons que cette voie est suractivée dans les blastes leucémiques ce qui leur donne un avantage concurrentiel par rapport aux cellules saines. Cette voie de signalisation passe par l'activation de la kinase Lyn qui possède deux tyrosines, l'une activatrice (Y396), l'une inhibitrice (Y507). L'une des protéines régulatrice de Lyn, et donc de la voie du GM-CSF est la protéine phosphatase CD45, déphosphorylant la tyrosine inhibitrice de Lyn (Y507).

La dernière partie de l'introduction abordera la composition de la membrane plasmique, et plus particulièrement des régions particulières de celle-ci, les radeaux lipidiques. Nous verrons que ces micro-domaines servent de plateforme de signalisation. Ainsi, la localisation du CD45 est primordiale pour son activité. Situé au niveau des radeaux lipidiques, il agit efficacement en déphosphorylant la tyrosine inactivatrice de Lyn, alors que son activité est moindre lorsqu'il est situé en dehors des radeaux lipidiques.

## **1. L'hématopoïèse et la leucémogénèse**

### **1.1. L'hématopoïèse**

#### **1.1.1. Généralités**

L'hématopoïèse (du grec αίματος [*aímatos*] : « le sang » et ποιεῖν [*poiésis*] : « fabriquer ») comprend l'ensemble des phénomènes qui assurent la production et le renouvellement continu des cellules du sang. Les cellules sanguines matures (lymphocytes, granulocytes [polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles], monocytes, hématies et plaquettes) constituent les éléments terminaux et fonctionnels des deux lignées hématopoïétiques principales, la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde, et sont produites à partir d'un nombre très restreint de cellules primitives.

La durée de vie de ces cellules est courte puisqu'elle est de quelques heures pour les polynucléaires, de 7 à 10 jours pour les plaquettes et d'environ 120 jours pour les hématies. Leur quantité dans le sang devant être constante, un équilibre s'établit entre leur production et leur disparition. Chez l'homme (*Homo sapiens*) adulte, le nombre de cellules sanguines matures étant très important, l'hématopoïèse doit générer de façon permanente 250 milliards d'hématies, 150 milliards de plaquettes et 100 milliards de polynucléaires neutrophiles par jour.

L'hématopoïèse débute dès la période embryonnaire dans le sac vitellin, puis dans la rate et le foie. Chez l'homme adulte, l'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse des os courts, des os plats, et dans l'épiphyse des os longs.

#### **1.1.2. Les cellules souches hématopoïétiques**

La production de toutes les cellules sanguines matures est assurée par une petite population de cellules médullaires primitives, les cellules souches hématopoïétiques (CSH). La découverte de ces cellules a été permise par les travaux qui ont suivi les bombardements nucléaires de Hiroshima et Nagasaki. En effet, dans les années 50, il a été prouvé qu'une injection intraveineuse de moelle osseuse permettait de sauver des souris (*Mus musculus*) d'une irradiation létale (Lorenz et al. 1951). Une dizaine d'année plus tard, Till et McCulloch ont mis en

évidence que ces transplantations permettent la reconstitution d'une hématopoïèse normale chez les souris greffées et entraînent la formation de colonies appelées CFU-S (*colony forming unit in the spleen*) dans leur rate. Ces colonies sont proportionnelles au nombre de cellules médullaires injectées, sont formées de progéniteurs hématopoïétiques de différents lignages et proviennent d'une même cellule souche. De plus, l'injection d'une CFU-S à un animal receveur secondaire permet de reconstituer l'hématopoïèse de cette souris. Ainsi, Till et McCulloch ont démontré que la moelle osseuse contient une population de cellules pluripotentes ayant la capacité de générer l'ensemble des lignages hématopoïétiques et de s'auto-renouveler (Till and McCulloch 1961).

La plupart des CSH sont quiescentes, en phase G0 du cycle cellulaire (Bowie et al. 2006) Concernant les CSH actives, elles vont établir un équilibre entre l'auto-renouvellement pour entretenir le *pool* de CSH et la différenciation afin de maintenir l'homéostasie hématopoïétique. En effet, les CSH sont capables de se diviser de manière asymétrique, en donnant naissance à deux cellules filles dont l'une conserve le caractère primitif, par maintien du contact à la niche, alors que la seconde s'engage dans une voie de différenciation (Knoblich 2008; Inaba and Yamashita 2012). Lors d'une situation de stress suite à l'agression de l'organisme, il est possible d'observer un mécanisme de division symétrique par lequel une CSH donnera naissance à deux CSH filles afin d'amplifier leur nombre (Spradling, Drummond-Barbosa, and Kai 2001). Les CSH résident dans la moelle osseuse au sein de petits espaces appelés les niches, nécessaires au maintien de leur quiescence. Ces niches forment un microenvironnement local où les CSH sont en contact avec le stroma, assurant le soutien physique de l'hématopoïèse ainsi que sa régulation par la sécrétion de différents facteurs (Becerra et al. 2010). Les cellules stromales sont de différents types (ostéoblastes, fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages médullaires, cellules périvasculaires, adipocytes) et sont directement responsables du comportement des CSH tel que la quiescence, l'auto-renouvellement, la survie, la prolifération et l'entrée en différenciation (Yu and Scadden). Il existe deux types de niches de CSH : la niche endostéale où les CSH sont en contact avec les ostéoblastes de l'os trabéculaire et la niche périvasculaire où les cellules sont proches de l'endothélium vasculaire dans les sinus de la moelle (Renström et al. 2010). Il est difficile d'isoler les CSH car elles sont rares et ont peu de

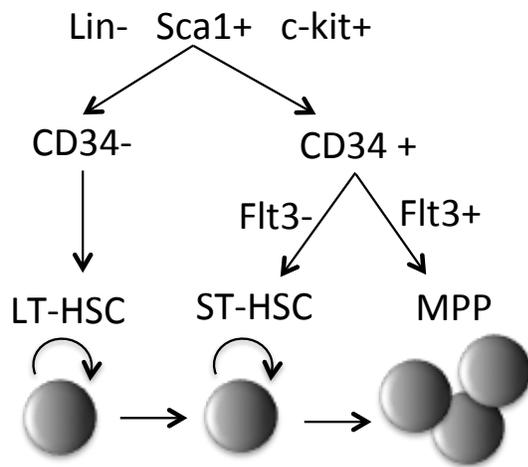


Figure 1 : Expression des marqueurs de surface des cellules souches hématopoïétiques. D'après (Adolfsson et al. 2001 )

caractéristiques morphologiques spécifiques. Dans les années 1980-90, des expériences de tri cellulaire et de transplantation chez la souris ont permis de démontrer que les CSH se trouvent dans la population ne présentant pas de marqueur spécifique de lignage ( $\text{lin}^-$ ) et exprimant c-kit ( $\text{c-kit}^+$ ) (S. Okada et al. 1991) et le *stem cell-associated antigen 1* ( $\text{Sca-1}^+$ ) (Spangrude, Heimfeld, and Weissman 1988). La combinaison des marqueurs  $\text{lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$  (LSK) est donc utilisée pour isoler une population de CSH ; cependant il est vite apparu que la population LSK est très hétérogène (Bryder, Rossi, and Weissman 2006).

Les LSK n'exprimant pas le marqueur de surface CD34 (*cluster of differentiation 34*) correspondent aux *long-term HSC* (LT-HSC) pouvant reconstituer l'hématopoïèse tout au long de la vie de l'individu. La fraction de LSK exprimant le CD34 contient les progéniteurs multipotents (MPP) et les *short term-HSC* (ST-HSC) qui ne peuvent reconstituer l'hématopoïèse que pendant huit semaines (Spangrude, Heimfeld, and Weissman 1988). Un anticorps ciblant le *fms-related tyrosine kinase 3* (FLT3) permet alors de discriminer les ST-HSC ( $\text{LSKCD34}^+ \text{Flt3}^-$ ) des MPP ( $\text{LSKCD34}^+ \text{Flt3}^+$ ) (Figure 1) (Adolfsson et al. 2001). Afin d'affiner la purification des CSH, une étude du profil d'expression des gènes a également montré que les récepteurs de surface de la famille SLAM sont fortement exprimés chez les LSK comparés aux progéniteurs. Ainsi, à l'heure actuelle, la population de CSH murine est définie par l'expression des marqueurs c-Kit, Sca-1 et CD150 et par l'absence des marqueurs Flt3 et CD48 (Kiel et al. 2005).

Chez l'homme, l'établissement d'un protocole de purification des CSH est plus difficile. Les marqueurs de surface des CSH humaines et murines sont différents. Par exemple, le CD34 est exposé au niveau des cellules primitives humaines alors que les CSH murines l'expriment faiblement. De plus, Sca-1 n'existe pas chez l'homme (Larochelle et al. 2011). Cependant, les CSH humaines peuvent être caractérisées par leur capacité à exclure la rhodamine et par le marquage d'une population  $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  à partir du sang placentaire (McKenzie et al. 2007).

### **1.1.3. La hiérarchie hématopoïétique**

Les CSH engagées dans le processus de différenciation vont progressivement perdre leur potentiel d'auto-renouvellement et devenir de plus en plus restreintes dans leur capacité de

différenciation, jusqu'à devenir des cellules matures et fonctionnelles libérées dans le sang. Ainsi, la différenciation hématopoïétique a été décrite comme un système organisé de façon hiérarchisé faisant intervenir des étapes successives correspondant à une restriction progressive des potentialités cellulaires. Sont distingués alors 4 compartiments majeurs : les CSH multipotentes (décrites précédemment), les progéniteurs hématopoïétiques, les précurseurs et les cellules matures.

Le compartiment des progéniteurs hématopoïétiques regroupe une population hétérogène de cellules issues de la différenciation des CSH et ayant perdu leur capacité d'auto-renouvellement. Les progéniteurs immatures multipotents et capables d'une prolifération importante se distinguent des progéniteurs plus matures, proliférant moins et déterminés vers un lignage distinct. Ils n'ont pas de caractéristiques morphologiques spécifiques mais ils acquièrent des marqueurs de maturité comme le CD71, le CD38 ou HLA-DR (*human leukocyte antigen-DR*) et des marqueurs spécifiques à chaque lignée. Une culture sur milieu semi-solide (méthylcellulose) permet également de les identifier, chaque progéniteur formant une colonie (*colony forming unit* : CFU) identifiable morphologiquement.

Le compartiment des précurseurs hématopoïétiques comprend des cellules plus engagées dans la différenciation vers une lignée cellulaire et capables d'engendrer les cellules matures. Ils sont morphologiquement reconnaissables et portent des marqueurs spécifiques de chacune des lignées. Chaque précurseur engendre entre 8 et 32 cellules matures, assurant ainsi la multiplication et la maturation cellulaire.

Les cellules terminales, matures (granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles, hématies, plaquettes, monocytes, lymphocytes) sont fonctionnelles et ne se divisent plus. Elles migrent de la moelle osseuse vers le sang afin d'assurer leur fonction, à l'exception des lymphocytes B et T qui vont poursuivre leur maturation respectivement dans la moelle osseuse et dans le thymus. Les cellules matures sont identifiables morphologiquement par frottis cellulaire sur lame.

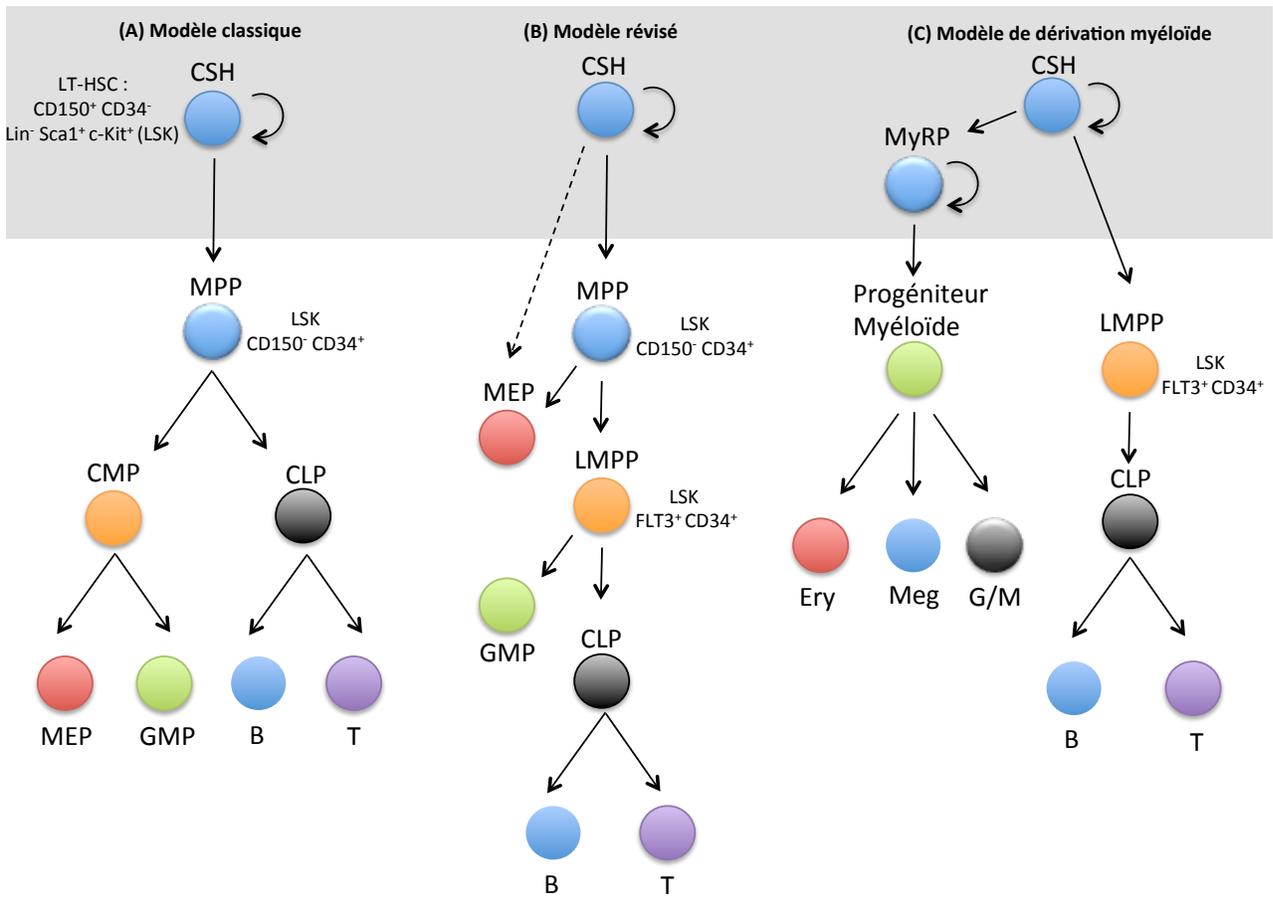


Figure 2 : Modèles de hiérarchie hématopoïétique D'après (Nimmo et al., 2015)

Selon le modèle de hiérarchie hématopoïétique le plus communément admis (Figure 2A), les CSH multipotentes produisent des progéniteurs multipotents (MPP : *multipotent progenitors*). Les MPP se différencient en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP : *common lymphoid progenitors*) ou en progéniteurs myéloïdes communs (CMP : *common myeloid progenitors*). Les CMP engendrent d'autres progéniteurs, plus différenciés : les progéniteurs granulo-monocytaires (GMP : *granulocyte-macrophage progenitors*) et érythro-mégacaryocytaires (MEP : *megakaryocyte-erythroid progenitors*). Les GMP vont ensuite générer les progéniteurs monocytaires et granulocytaires donnant respectivement les précurseurs des monocytes/macrophages et des polynucléaires. Les MEP forment les progéniteurs mégacaryocytaires et érythroïdes produisant respectivement les précurseurs des plaquettes et des hématies (Akashi et al. 2000). Ce modèle classique propose donc une stricte séparation entre les branches myéloïde et lymphoïde et est déterminé par des décisions binaires au niveau des cellules qui réduisent leur multipotentialité au cours des différenciations successives (Figure 2A) (Reya et al. 2001).

Cependant, deux autres modèles sont proposés afin d'expliquer la hiérarchie de l'hématopoïèse. Le « modèle révisé » suggère que les progéniteurs multipotents (MPP) engendrent directement les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP). Ce modèle identifie un progéniteur lymphoïde multipotent intermédiaire (LMPP) qui donnerait naissance aux progéniteurs granulo-monocytaires et aux progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) (Figure 2B). Des études portant sur le suivi de transplantation monocellulaire dans des souris ont suggéré le « modèle de dérivation myéloïde ». Ce modèle propose l'existence de progéniteurs myéloïdes capables de reconstituer les lignées myéloïdes à long terme (MyRPs : *myeloid-restricted progenitors with long-term repopulating activity*). Ainsi, les CSH peuvent donner naissance à des CSH filles par division symétrique, ou bien se différencier en MyRPs capable de s'auto-renouveler ou de se différencier en progéniteurs myéloïdes (Figure 2C) (Yamamoto et al. 2013; Nimmo, May, and Enver 2015).

Néanmoins ces modèles sont moins représentatifs que le modèle classique (Woolthuis and Park 2016).

#### 1.1.4. La différenciation hématopoïétique et sa régulation

L'hématopoïèse doit être parfaitement contrôlée afin de produire les cellules sanguines matures en quantité nécessaire à l'organisme. Divers signaux externes, tels que les facteurs de croissance, et internes, tels que les facteurs de transcriptions permettent la régulation de l'hématopoïèse.

##### 1.1.4.1 Facteurs de transcription

L'autorenouvellement et la spécification des CSH en précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes puis leur différenciation en cellules matures est finement régulée par l'expression de nombreux facteurs de transcription, coordonnée dans le temps.

Par exemple, BMI1, MLL, C-MYC, C-MYB et GATA3 sont essentiels à l'autorenouvellement et à la survie des CSH adultes (Ku et al. 2012; Arranz et al. 2012; Jude et al. 2007).

Parmi les principaux facteurs de transcription intervenant dans la régulation du lignage myéloïde, SPI-1 (*spleen focus forming virus proviral integration site 1*)/PU.1 (*purine rich box.1*) appartenant à la famille des ETS (*E-twenty six*), est nécessaire à la différenciation monocyto-macrophagique (Klemsz et al. 2008; Chen et al. 1995). SPI-1/PU.1 induit l'expression de KLF4 (*krüppel-like factor 4*), un facteur de transcription dont l'expression augmente au cours de la différenciation monocyto-macrophagique et stimulant cette dernière au dépend de la différenciation granulocytaire (Alder et al. 2008). D'autres facteurs de transcription sont nécessaires à la différenciation en macrophage tel que MAFB (*musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*), ou c-MAF, appartenant à la famille bZip (*basic region/leucine zipper*). Ces deux facteurs de transcription inhibent la différenciation érythroïde en réprimant l'activité transcriptionnelle de ETS1, un facteur de transcription nécessaire à la différenciation érythroïde (Sieweke et al. 1996; Hegde et al. 1999). GATA1 (GATA binding protein 1) est également un facteur essentiel à la production des érythrocytes (Dore et al. 2008). Le facteur de transcription AML1 (acute myeloid leukemia 1) ou RUNX1 agit sur la différenciation mégacaryocytaire (BenAmi et al. 2009). Quand à IRF8 (interferon regulatory factor 8), il induit les progéniteurs à se différencier en macrophages au dépend des granulocytes (Li et al. 2011).

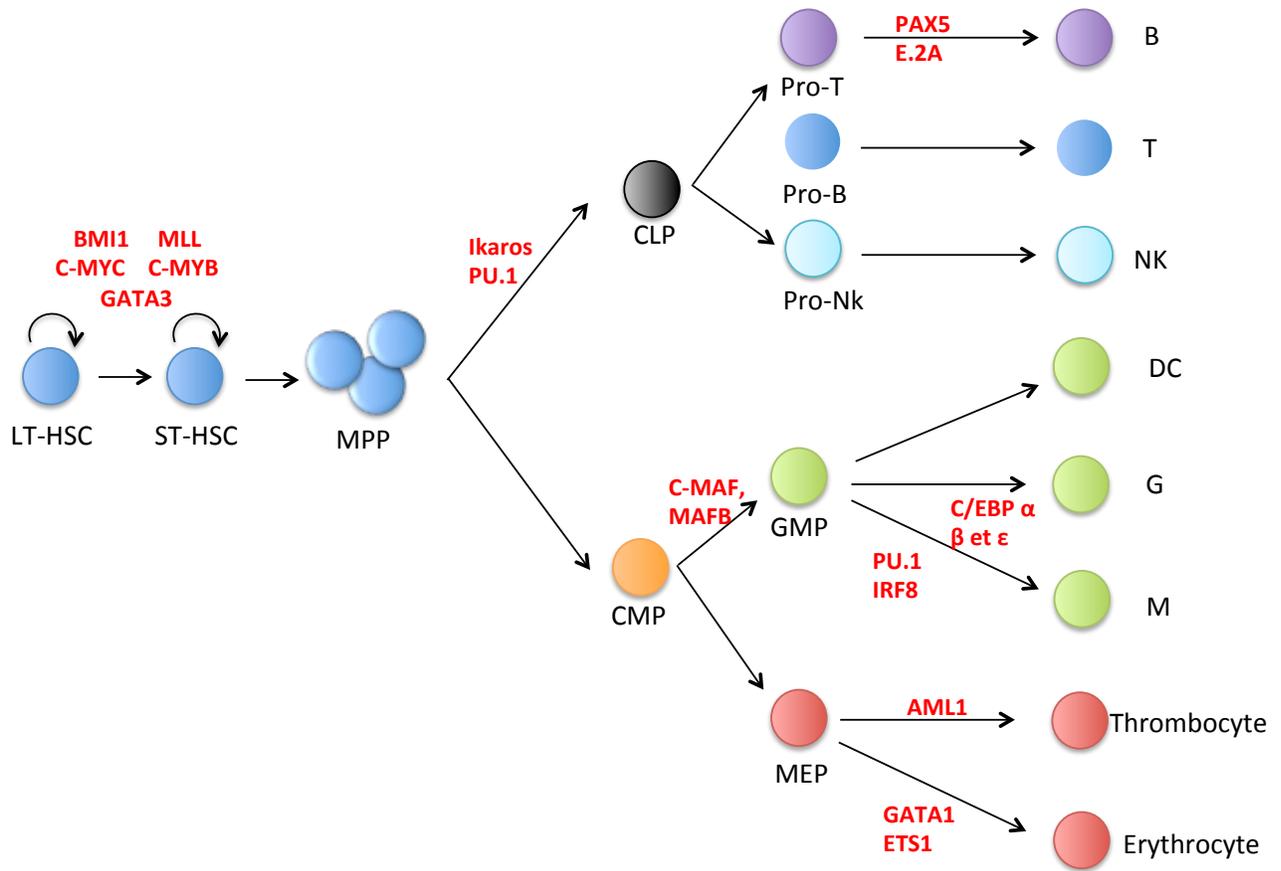


Figure 3 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans la hiérarchie hématopoïétique

Les facteurs de transcription de la famille C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) jouent également un rôle important dans la régulation de la différenciation hématopoïétique. Ils possèdent un domaine hautement conservé, bZip au niveau de leur partie C-terminale qui intervient dans la dimérisation et la liaison à l'ADN de ces facteurs. Il existe six membres de cette famille, C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$ . Quatre de ces membres (C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ) sont exprimés dans les cellules myéloïdes. L'expression de C/EBP $\alpha$  est élevée dans les lignées cellulaires myéloblastiques humaines KG1a, HL-60, U-937 et PLB985 et diminue au cours de la différenciation granulocytaire de la lignée de progéniteurs murins 32D C13. Les expressions de C/EBP $\delta$  et  $\epsilon$  suivent un profil opposé à C/EBP $\alpha$  (Scott et al. 1992; Yamanaka et al. 1997). L'expression de C/EBP $\beta$  augmente à la fois au cours des différenciations granulocytaire et monocyto-macrophagique des lignées cellulaires leucémiques myéloïdes murines et humaines. Les expressions de C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\epsilon$  sont nécessaires à la formation et à la fonction des neutrophiles, mais également à celle des macrophages (Scott et al. 1992).

Concernant les principaux facteurs de transcriptions intervenant dans la régulation du lignage lymphoïde, Ikaros est particulièrement important pour la différenciation lymphocytaire. Il agit également en tant que suppresseur de tumeur. Il a été montré que des modifications post-traductionnelles telles que la sumoylation peut moduler son activité. Ainsi, des cellules de patients atteints de leucémies lymphoblastiques aiguës humaines présentent un niveau élevé d'Ikaros sumoylé (Apostolov et al. 2016). PU.1 est également nécessaire à la génération de progéniteurs lymphoïdes (Staal et al. 2001). Puis E2A et PAX5 permettent une différenciation en lymphocytes B (Nutt and Kee 2007) (Figure 3).

Une dérégulation des facteurs de transcription peut conduire au développement de leucémies. Les anomalies les plus fréquentes sont des inversions intrachromosomiques ou des translocations résultant en un échange réciproque de matériel génétique entre deux chromosomes, à l'origine de protéines de fusion (Rosenbauer and Tenen 2007; Look 1997).

#### *1.1.4.2 Facteurs de croissance*

La régulation de l'hématopoïèse est également exercée par des facteurs de croissance appartenant à la famille des cytokines. Les divers facteurs de croissance sont des glycoprotéines produites par les cellules du stroma médullaire, les lymphocytes ou les monocytes, à l'exception de l'érythropoïétine (EPO) sécrétée principalement par les cellules péritubulaires rénales. Le

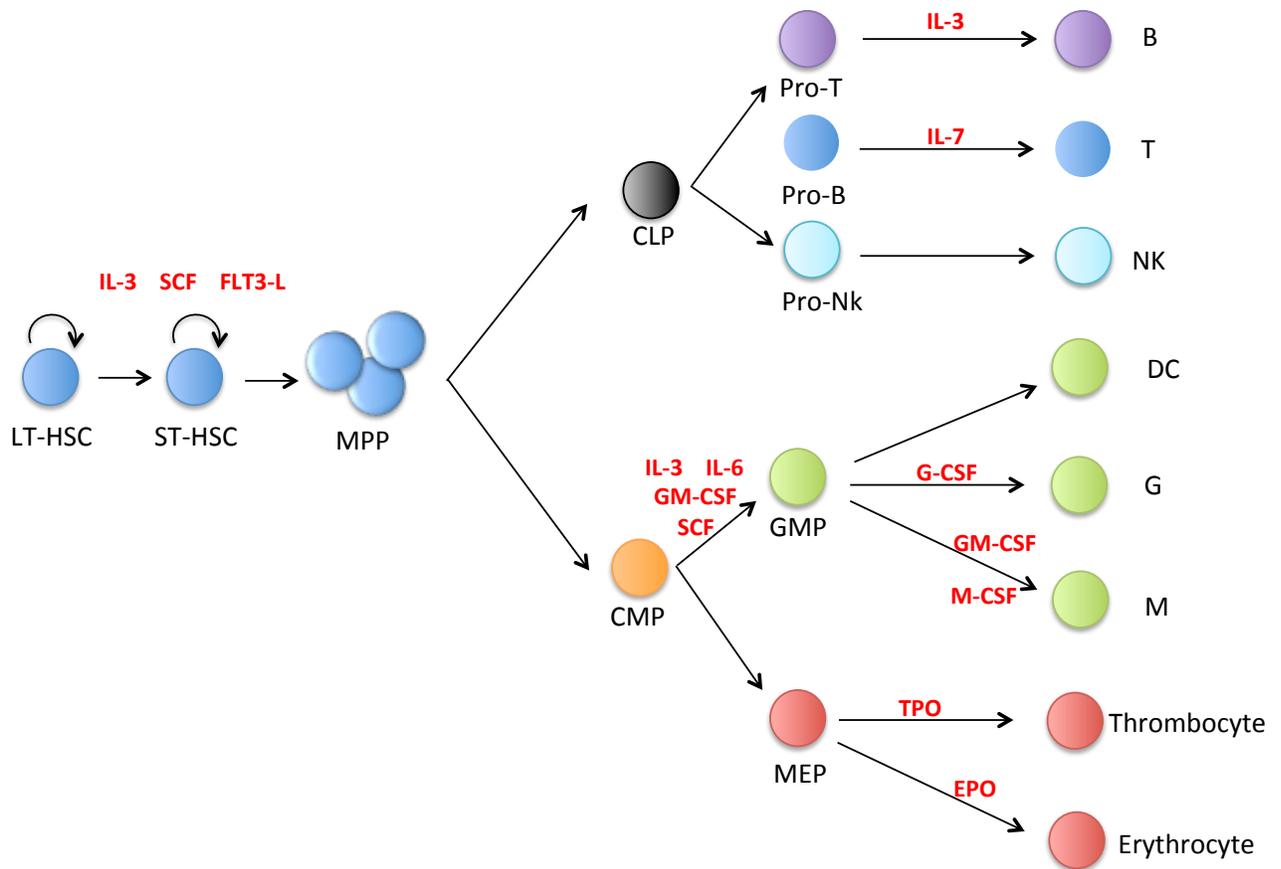


Figure 4 : Principaux facteurs de croissance impliqués dans la hiérarchie hématopoïétique.  
D'après (Metcalf 2008)

signal est activé par fixation spécifique d'un facteur de croissance sur son récepteur présent à la surface membranaire de la cellule cible. Le complexe cytokine-récepteur est rapidement internalisé et dégradé. Les voies de transduction du signal vont alors activer des facteurs de transcription et induire l'expression de gènes cibles.

L'action des cytokines a généralement pour effet d'activer des signaux de survie et de prolifération (Metcalf 2008). Certains agissent de façon peu spécifique, influençant de multiples lignages, tel que le SCF (*stem cell factor*) régulant les CSH et les progéniteurs, d'autres sont plus spécifiques à un lignage, tels que l'IL-7 agissant sur le lignage lymphoïde, ou le GM-CSF (*granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*), l'IL-6 et l'IL-3 sur le lignage myéloïde. D'autres ont une action plus restreinte, comme le G-CSF (*granulocyte-CSF*) qui permet la différenciation granulocytaire, le M-CSF (*macrophage-CSF*) ou CSF-1 agissant sur la différenciation des monocytes, l'EPO sur le lignage érythroïde et la thrombopoïétine (TPO) sur le lignage mégacaryocytaire (Figure 4). Une dérégulation dans l'une de ces voies de signalisation peut conduire à des hémopathies myéloprolifératives.

## **1.2. La leucémogénèse**

### **1.2.1. Généralités**

Les leucémies (du grec *leukos*, blanc, et *haima*, sang) sont caractérisées par une accumulation, dans la moelle osseuse, d'une population de cellules immatures et monoclonales, les blastes leucémiques. Ceci inhibe l'hématopoïèse normale ce qui conduit à une insuffisance médullaire parfois létale. Il existe différents types de leucémies, différenciables au niveau physiopathologique et moléculaire.

On distingue les leucémies aiguës et chroniques. Le caractère aigu de la leucémie désigne l'évolution rapide des signes biologiques de la maladie et le caractère rapidement létal des troubles métaboliques engendrés. La survie, en absence d'un traitement efficace est d'environ un mois. Elles touchent une population de tout âge et sont définies par une prolifération rapide et clonale d'une cellule hématopoïétique immature, bloquée à un stade de différenciation, anormale cytologiquement et non fonctionnelle.

Lors d'une leucémie chronique, il n'y a pas de blocage de la maturation cellulaire. La prolifération clonale d'une cellule hématopoïétique immature anormale conduit à une

production en excès de cellules matures. L'évolution de la maladie peut alors s'étendre sur plusieurs années.

Que l'évolution de la maladie soit rapide (aiguë) ou plus lente (chronique), les leucémies peuvent affecter les lignages lymphoïde ou myéloïde. On parle alors de leucémie lymphoblastique ou myéloblastique.

Au cours de ce projet, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux leucémies aiguës myéloblastiques (LAM).

## **1.2.2. Les leucémies aiguës myéloblastiques**

### *1.2.2.1. Epidémiologie*

L'incidence globale des LAM est de l'ordre de 4 pour 100 000 habitants par an en France. Elles touchent essentiellement les adultes de plus de 60 ans mais sont également présentes chez les enfants. Les deux sexes sont atteints de manière sensiblement égale.

### *1.2.2.2. Diagnostic*

Les signes cliniques de la maladie sont les conséquences de l'insuffisance médullaire et du syndrome tumoral et un myélogramme est réalisé afin de les confirmer. L'insuffisance médullaire entraîne une anémie (patient pâle, asthénique), une neutropénie (signes infectieux) et une thrombopénie (syndromes hémorragiques observés). La prolifération des blastes peut se manifester par des douleurs osseuses, une hypertrophie des organes hématopoïétiques et gingivale et par des infiltrats cutanés sous forme de leucémides.

Un myélogramme permet ensuite d'affirmer le diagnostic en mettant en évidence une diminution des lignées cellulaires normales et un infiltrat blastique pouvant aller de 30% à plus de 90%. Il permet également de caractériser la leucémie par des études complémentaires :

- Une étude cytochimique permet de confirmer la nature myéloblastique de la leucémie par la détection d'activités enzymatiques spécifiques tel que la myéloperoxydase.
- Un immunophénotypage des blastes par cytométrie en flux permet de rechercher l'expression d'antigène membranaire spécifique d'une lignée et d'un stade de différenciation.
- La détection d'anomalies cytogénétiques, détectées dans 60% des cas présente un intérêt pronostique et oriente dans le choix de la stratégie thérapeutique.

- L'étude morphologique des frottis cellulaires renseigne également sur le type de leucémies.

#### *1.2.2.1. Classification*

En 2008, la classification Franco-Américano-Britannique (FAB) a permis de distinguer différentes LAM selon le type cytologique du blaste leucémique. En 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis à jour cette classification en y ajoutant de nouveaux critères morphologiques, immunophénotypiques et génétiques. La LAM6 (érythroblastique) disparaît alors de la classification (Arber et al. 2016).

Les LAM sont donc réparties en 8 catégories :

- M0 : différenciation minime, avec des blastes de grande taille sans granulation.
- M1 : myéloblastique sans maturation (15% des cas). Il n'y a pas de maturation et peu de granulations.
- M2 : myéloblastique avec maturation myéloïde partielle (20% des cas). Maturation jusqu'au promyélocyte.
- M3 : promyélocytaire.
- M4 : myélo-monoblastique.
- M5 : monoblastique. Avec présence uniquement de monoblastes. Il existe 2 sous-types: une forme peu différenciée (M5a) et une forme différenciée (M5b).
- M7 : mégacaryoblastique

#### *1.2.2.3. Altérations génétiques à l'origine des leucémies aiguës myéloblastiques*

Dans les années 1970, l'émergence des techniques de bandes chromosomiques a permis d'identifier précisément le caryotype humain et de caractériser des remaniements chromosomiques présents dans 65% des leucémies. Ainsi, le blocage de la différenciation des blastes leucémiques est principalement lié à une dérégulation des facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse normale. Ces anomalies sont retrouvées dans toutes les cellules blastiques d'un même patient ce qui atteste de leur clonalité (Rosenbauer and Tenen 2007; Look 1997).

Les altérations les plus fréquemment observées sont des inversions intrachromosomiques ou des translocations chromosomiques réciproques résultant d'un échange de matériel génétique entre deux chromosomes. Il en résulte la création d'un gène chimérique codant pour une protéine de fusion n'existant pas dans les cellules saines et dotées de nouvelles propriétés pouvant avoir des effets dominants négatifs sur la fonction normale de ces protéines. De plus, la translocation chromosomique génère des ARN circulaires apportant un avantage prolifératif à la cellule et pouvant engendrer une certaine résistance aux traitements (Guarnerio et al. 2016).

Certains gènes remaniés sont récurrents, ou même systématiquement associé à un certain type de leucémie, ce qui suggère qu'ils pourraient être la cause de la transformation leucémogénique. Ces découvertes conduisirent à rechercher automatiquement des altérations chromosomiques dans les hémopathies malignes humaines. Par exemple, les leucémies aiguës promyélocytaires (LAM3) sont caractérisées par une translocation du récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque *RARα* (*retinoic acid receptor alpha*) quel que soit le partenaire de translocation avec lequel il est associé.

Certains gènes peuvent être transloqués dans différents types de leucémies suivant le partenaire avec lequel ils sont fusionnés. Par exemple, le gène *MLL* (*mixed-lineage leukemia*), modulant l'expression de gènes homéotiques, est impliqué dans plus de 40 translocations différentes. Quand aux gènes du CBF (*core binding factor*), formé de deux sous-unités *CBFA2* (ou *AML1/RUNX1*) et *CBFβ*, ils peuvent être altérés par 20 réarrangements possibles. Les translocations chromosomiques les plus couramment associées à des LAM incluent principalement les translocations *t(15;17) PML (promyelocytic leukemia protein)/RARα*, *t(8;21) AML1/ETO (eight twenty one)*, *t(12;21) TEL/AML1*, *t(9;11) MLL-AF9*, ou encore *t(7;11)* fusionnant la nucléoporeine *NUP98 (nucleoporin 98)* avec *HOXA9* (Scandura et al. 2002; Rabbitts 2001).

Certains gènes peuvent subir des remaniements de nature différent, tels que *EVI1*, surexprimé dans certaines LAM à la suite de la translocation *t(3;3)(q21;q26)* ou de l'inversion intrachromosomique *inv(3)(q21;q26)* (Levy et al. 1994). Des mutations ponctuelles peuvent

également altérer les gènes codant des facteurs de transcription tels que les gènes codant Spi-1/PU.1, GATA-1, C/EBP $\alpha$  ou AML1/RUNX1 (Rosenbauer and Tenen 2007).

Cependant, bien que ces réarrangements chromosomiques favorisent le blocage de la différenciation hématopoïétique, ils ne semblent pas suffisant à entraîner la transformation leucémique sans la survenue d'un événement additionnel (Mori et al. 2002).

Dans les leucémies humaines, les anomalies de gènes codant des facteurs de transcription sont souvent accompagnées d'autres mutations de gènes codant des protéines impliquées dans la transduction de signaux de prolifération ou de survie. Les protéines résultantes sont alors activées de façon constitutive ce qui altère la prolifération cellulaire. Ainsi, des mutations ponctuelles activant des protéines de voies de signalisation comme N-RAS (*neuroblastoma-Ras*) ou K-RAS (*Kirsten-Ras*), ou bien des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que FLT3 ou c-Kit, ont été décrites (Scheijen and Griffin James D 2002).

Les altérations géniques conduisant à la transformation leucémique aiguë peuvent être expliquée par l'hypothèse « des mutations secondaires » ou « *second hits* ». Ce concept stipule que la transformation leucémique nécessite l'association de deux classes de mutations. D'une part, les mutations de classe I affectant les protéines impliquées dans les voies de transduction, essentiellement les tyrosine kinases, permettent à la cellule d'acquérir un avantage prolifératif. D'autre part, les mutations de classe II touchant les protéines impliquées dans la transcription induisent le blocage de la différenciation. Le fait que deux mutations de même classe ne soient que rarement retrouvées dans les leucémies aiguës alors qu'une coopération entre les deux types est fréquente soutient cette hypothèse. De plus, dans les leucémies chroniques, seules les mutations de classe I sont présentes, ce qui est en accord avec la prolifération de cellules matures et l'absence de blocage de maturation (Gilliland 2001).

#### 1.2.2.4. Modèles murins

La découverte des altérations génétiques à l'origine des leucémies aiguës a permis de mettre au point des modèles de souris pour l'étude des LAM.

Par exemple, les gènes de la famille *HOXA* jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'hématopoïèse, en particulier en ce qui concerne l'auto-renouvellement des CSH

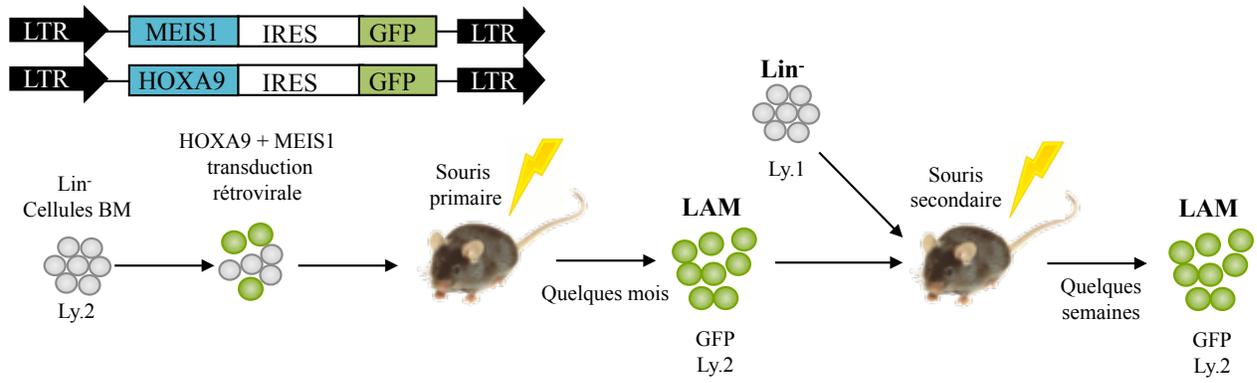


Figure 5 : Modèle murin d'étude des LAM

(Abramovich and Humphries 2005). Le gène *HOXA9* est fréquemment surexprimé dans un grand nombre de LAM humaines (Golub et al. 1999). Chez la souris, la surexpression d'*HOXA9* et du cofacteur *MEIS1* conduit au développement de LAM, 2 à 5 mois après la transplantation (Kroon et al. 1998). Il est ainsi possible d'induire des leucémies chez des souris receveuses. Des CSH prélevées dans la moelle osseuse, surexprimant *HOXA9* et le cofacteur *MEIS1* après transduction de rétrovirus sont transplantées, par injection dans le sang périphérique de souris préalablement irradiées. Après quelques mois, les souris transplantées développent des LAM et les cellules leucémiques peuvent être récupérées dans la moelle osseuse par broyat des os postérieurs (Figure 5) (Saint-Paul et al. 2016).

D'autres modèles murins, utilisant des oncogènes, ou des protéines de fusion sont utilisés, tels que *AML1-ETO* inhibant la différenciation myéloïde et assurant la conservation d'un nombre élevé de progéniteurs hématopoïétiques. Cependant, si la translocation *t(8;21)* induisant l'expression d'*AML1-ETO* semble être un élément initiateur de la leucémie, des mutations secondaires sont requises afin que les souris puissent développer la maladie (Yuan et al. 2001).

Le gène *MLL*, impliqué dans une quarantaine de translocations différentes est également largement utilisé pour créer des modèles murins. La translocation chromosomique de *MLL* la plus courante dans les LAM implique le gène *AF9* (Rabbitts 2001).

### 1.3 Traitements actuels

Le choix du traitement dépend de l'âge du patient et du type de LAM. Le schéma général utilisé est une polychimiothérapie longue et intensive, en plusieurs temps.

Tout d'abord, un traitement d'induction comportant une ou deux cures de polychimiothérapie et ayant pour objectif la rémission complète, c'est-à-dire une masse tumorale indétectable mais non nulle. Le traitement est essentiellement le même pour tous les sous-types de LAM et est composé généralement de la cytarabine et d'une anthracycline (idarubicine, daunorubicine, doxorubicine...). Seule la LAM3 promyélocytaire bénéficie d'un traitement spécifique, l'acide tout-*trans*-rétinoïque (ATRA), en plus de la chimiothérapie administrée classiquement aux autres types de LAM. Ce traitement d'induction entraîne une

réduction des cellules tumorales et une restauration de l'hématopoïèse normale. A son issue, une rémission complète est observée dans plus de 75% des cas.

Il est suivi d'un traitement de consolidation, nécessaire afin de prévenir les rechutes. Il comporte également une ou plusieurs cures de polychimiothérapie. Dans certains cas, une greffe de cellules souches hématopoïétiques peut être proposée à cette étape.

Un traitement d'entretien est ensuite réalisé et suivi d'une surveillance sur plusieurs années du patient afin de détecter une éventuelle rechute.

Cependant, les traitements actuels ne permettent pas de guérir l'ensemble des personnes atteintes de LAM. Ainsi, une rémission complète est obtenue dans 70 à 80% des cas de LAM chez les sujets jeunes, et seulement 50% chez les sujets de plus de 60 ans, constituant la grande majorité des patients.

La survie à 5 ans est estimée entre 25 et 50% après une chimiothérapie ou une autogreffe et entre 50 et 70% après une greffe allogénique. Au-delà de 60 ans, l'estimation de la survie après 5 ans est diminuée à 15-20% lors d'une chimiothérapie d'entretien seule. Le décès survient surtout lors des rechutes et de leur traitement, mais rarement avant tout traitement. Le taux de rechute est compris entre 50 et 70% après une chimiothérapie ou une autogreffe et entre 15 et 20% après une greffe allogénique. La rémission après une rechute est de plus courte durée et souvent suivie d'une autre rechute généralement fatale. La rémission complète est plus difficile à obtenir lors de rechutes car elles sont souvent réfractaires au premier traitement utilisé.

L'allogreffe est actuellement pratiquée chez moins de 10% des patients atteints de LAM et n'est réalisable que chez les adultes de moins de 50 ans en fonction des résultats génétiques et à partir d'un donneur HLA identique. De plus, les greffes peuvent apporter des complications sérieuses telles que la maladie du greffon contre l'hôte dans le cas de l'allogreffe, ou des risques de contamination du greffon par la maladie dans les cas de l'autogreffe.

De plus, la chimiothérapie pratiquée a un effet délétère sur l'hématopoïèse saine et en particulier sur la population des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui est nécessaire pour reformer l'hématopoïèse après ce type de traitement thérapeutique, induisant une aplasie prolongée.

Les LAM sont des urgences thérapeutiques pour lesquelles il y a eu peu d'avancée ces 20 dernières années. Sans traitement, la survie est de 4 mois seulement. Les traitements actuels ne permettent d'obtenir qu'une survie à 5 ans de 25% seulement et 60% des patients traités rechutent. En Europe et aux Etats-Unis, la LAM représente environ 1,2% de la mortalité due aux cancers (incidence de 3 à 5 pour 100 000). Il existe donc un réel besoin de nouveaux traitements plus efficaces et évitant les rechutes afin de diminuer la mortalité des personnes atteintes de LAM.

## **2. La voie de signalisation du GM-CSF dans l'hématopoïèse**

### **2.1 GM-CSF**

#### **2.1.1 Historique**

C'est en 1977 que l'équipe de Metcalf a démontré que du milieu conditionné de cellules de poumons murins contient une forte quantité de *colony stimulating factor* (CSF), stimulant la formation de diverses colonies granulo-macrophagiques. Le CSF purifié de ce milieu conditionné reçut le nom de *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF). Lorsque la quantité de CSF est diluée, seules des colonies macrophagiques apparaissent (Burgess, Camakaris, and Metcalf 1977).

#### **2.1.2 Fonctions biologiques**

Le GM-CSF est produit et sécrété par différents types cellulaires incluant les lymphocytes T activés, les lymphocytes B, les macrophages, les mastocytes, les cellules de l'endothélium vasculaire, les fibroblastes ainsi que par plusieurs types de cellules cancéreuses (Shi et al. 2006).

Le GM-CSF a été identifié comme un facteur de croissance ayant une gamme d'effets assez large. Tout comme le M-CSF, l'IL-3 et l'IL-6, il régule la production et l'activation fonctionnelle des cellules hématopoïétiques. Le GM-CSF agit sur la survie, l'activation, la différenciation et la mobilisation des cellules myéloïdes et touche plus particulièrement les monocytes/macrophages et l'ensemble des granulocytes (Metcalf 2008; Hong 2016a). Le GM-CSF a également un rôle dans l'immunité innée et acquise en agissant sur les fonctions des

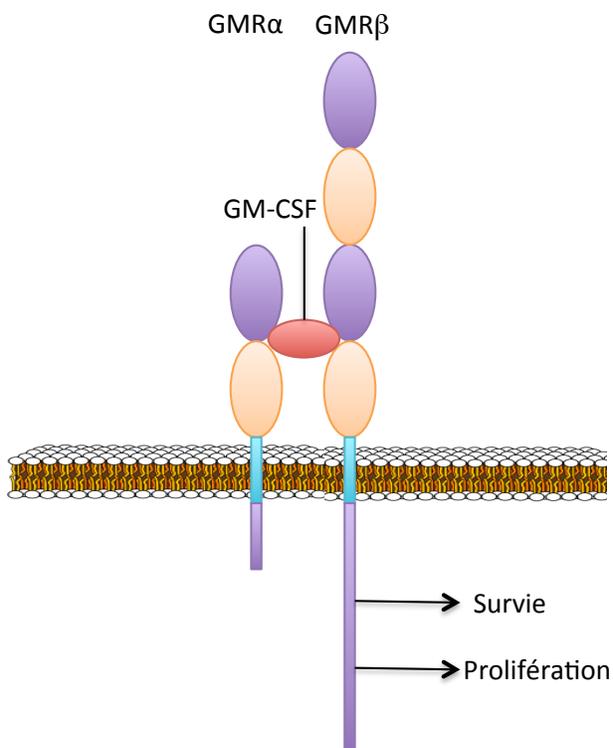


Figure 6 : Le récepteur au GM-CSF. D'après (Ian P. Wicks et Andrew W. Roberts)

cellules dendritiques et des lymphocytes T (Plzak et al. 1955).

Le GM-CSF exerce toutes ses activités biologiques en se liant et en activant son récepteur apparenté.

## **2.2 Le récepteur au GM-CSF**

### **2.2.1 Historique et généralités**

L'existence du récepteur au GM-CSF (GM-CSFR), aussi connu sous le nom de CD116, a été mise en évidence au cours des années 1980 par des expériences de liaison de GM-CSF marqué ( $^{125}\text{I}$ -GM-CSF) (Park et al. 1986; Walker and Burgess 1985). Il s'agit d'un hétérodimère formé d'une sous-unité  $\alpha$  (GMR $\alpha$ ), contenant le site d'interaction avec le ligand et d'une sous-unité  $\beta$  (GMR $\beta$ ), permettant d'activer la voie de signalisation (Figure 6) (Hayashida et al. 1990). La sous-unité  $\beta$  du GM-CSFR est commune aux récepteurs à l'IL-6 et à l'IL-3. Ainsi, bien qu'elle soit nécessaire à l'induction de la voie de signalisation, la spécificité du signal est due aux différentes chaînes de la sous-unité  $\alpha$ .

Le GM-CSFR est exprimé à la surface de tous les leukocytes, la sous-unité  $\beta$  en plus grand nombre que la sous-unité  $\alpha$ . Le GM-CSFR a une composition analogue aux récepteurs à l'IL-6, IL-4 et à l'IL-2, chacun partageant une sous-unité, ce qui suggère un arrangement structural et fonctionnel conservé par lequel une seule chaîne de polypeptide peut reconnaître plus d'un ligand. Comme la plupart des autres récepteurs à cytokine, le GM-CSFR peut activer une multitude de fonctions cellulaires telles que l'apoptose, l'entrée en cycle cellulaire, la différenciation et la maturation de progéniteurs ainsi que l'activation et la mobilité des cellules matures.

### **2.2.2 Structure du récepteur au GM-CSF**

La structure cristallographique révèle qu'il s'agit d'un complexe hexamérique formé de deux molécules de GM-CSF, deux chaînes GMR $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$ . Les deux chaînes  $\beta$  sont entrelacées (Carr et al. 2001). Les domaines cytoplasmiques des deux chaînes  $\beta$  restent éloignés de plus de 100 Å, afin d'éviter une transphosphorylation excessive des molécules Jak2 qui leur sont associées et ainsi, l'activation aberrante du récepteur.

Le complexe hexamérique révèle 3 sites d'interaction, qui suivent les règles générales des récepteurs aux facteurs de croissance (de Vos, Ultsch, and Kossiakoff 1992). Le site 1 est le site d'interaction entre le ligand GM-CSF et le GMR $\alpha$ . L'hélice D du ligand se lie au coude formé par les domaines 1 et 2 du GMR $\alpha$  (Wells and de Vos 1996). Le site 2 est le site d'interaction entre le GM-CSF et le GMR $\beta$ . Un glutamate conservé de l'hélice A de la cytokine se lie aux boucles A-B et E-F du domaine 1 de la première chaîne  $\beta$  et aux boucles B-C et F-G du domaine 4 de la seconde chaîne  $\beta$ . Le glutamate du GM-CSF est analogue au glutamate retrouvé sur l'IL-3 ainsi qu'à celui retrouvé sur l'IL-5, tous reconnus des chaînes  $\beta$ . Le site 2 est donc une cible intéressante pour développer des agents bloquant simultanément l'action des 2 cytokines, comme par exemples BION-1 (Sun et al. 1999). Le site 3 est le site d'interaction entre le domaine 2 du GMR $\alpha$  et le domaine 4 du GMR $\beta$ , créé par une interface principalement hydrophobe et entourée de résidus chargés. Il s'agit d'une interaction forte présente également en absence de GM-CSF.

### **2.2.3 Activation du récepteur**

L'activation du GM-CSFR suit les règles généralement observées pour les autres récepteurs aux cytokines de classe 1 qui incluent la dimérisation du récepteur et la transphosphorylation de ses domaines cytoplasmiques. Le GM-CSFR ne possède aucun domaine catalytique et n'a donc pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Les domaines cytoplasmiques des chaînes  $\beta$  sont associés à la tyrosine kinase Jak2, requis pour la transphosphorylation  $\beta\text{c}$  entraînant l'initiation de la voie de signalisation et l'activité biologique. Les deux domaines cytoplasmiques GMR $\alpha$  et GMR $\beta$  sont essentiels pour l'activation du récepteur mais seule la chaîne  $\beta$  est associée à Jak2.

La liaison du ligand induit la dimérisation et l'activation du récepteur et provoque la transduction du signal suivi par des réponses cellulaires variées incluant la prolifération, la différenciation, la survie et l'activation fonctionnelle (Hercus et al. 2009). La dérégulation du signal du GM-CSF peut entraîner une leucémie ou d'autres troubles dans le développement d'autres cellules sanguines.

Le GM-CSF produit une rapide activation de Lyn, une tyrosine kinase de la famille Src (SFKs = *Src-family tyrosine kinases*), directement couplée à la partie intracytoplasmique de la chaîne  $\beta$

du GM-CSFR, activant la survie cellulaire (Wei et al. 1996). Lyn agit ensuite en phosphorylant la protéine STAT3 (Chaturvedi, Sharma, and Reddy 1997) essentielle à l'induction de la prolifération et de la survie cellulaire (Coffer, Koenderman, and de Groot 2000).

## **2.3 Lyn**

### **2.3.1 Fonction**

Lyn est exprimée par toutes les cellules sanguines à l'exception des lymphocytes T. Elle agit en modifiant à la fois positivement et négativement la voie de signalisation du GM-CSF, mettant en évidence son rôle pivot dans la modulation du signal (Scapini et al. 2009). Ainsi, de nombreuses études ont impliqué Lyn dans l'amplification de l'activation du GM-CSFR alors que d'autres indiquent que Lyn participe à la régulation négative du signal. En effet, l'utilisation d'oligonucléotides antisens ont suggéré que Lyn est un régulateur positif de la survie et a une importance dans la transmission du signal anti-apoptotique induit par le GM-CSF (Yousefi et al. 1996; Wei et al. 1996; Daigle et al. 2002). A contrario, des études menées sur des souris déficientes pour Lyn ont montré qu'elles possédaient considérablement plus de progéniteurs sensibles aux GM-CSF et ayant un avantage prolifératif (Scapini et al. 2009). De plus, les souris déficientes pour Lyn développent une hyperplasie de leur compartiment myéloïde avec l'âge. Ceci suggère que Lyn est un régulateur négatif de la survie et de la prolifération dans les cellules myéloïdes (Hibbs and Harder 2006).

### **2.3.2 Historique**

En 1911, lors de ses recherches sur le processus de transformation d'un rétrovirus causant des sarcomes chez le poulet, Peyton Rous fait la découverte de *v-Src* (aussi appelé *pp60<sup>v-src</sup>*), premier membre de la famille Src à avoir été étudié. Isolé à partir d'un sarcome aviaire, *v-Src* a tout d'abord été défini comme un oncogène viral (Rous 1911). Cette hypothèse a ensuite été reconsidérée après la découverte, dans des fibroblastes de poulet sains, d'un gène *Src* normal, qui sera nommé *c-Src* (Bjorge, Jakymiw, and Fujita 2000). Ainsi, *c-Src* est un gène cellulaire normal et des mutations de ce gène donnent *v-Src*, un oncogène codant *v-Src*, une tyrosine kinase constitutivement activée (Hunter and Cooper 1985; Chong et al. 2005).

Suite à la découverte des gènes *c-Src*, de son homologue transformé *v-Src* et de leurs

produits respectifs, 8 autres membres de cette famille ont été décrits : Lyn, Hck, Lck, Blk, Fyn, Yes, Fgr et Yrk. Src, Fyn et Yes sont exprimés dans tous les types cellulaires, tandis que Blk, Fgr, Hck, Lck et Lyn sont majoritairement retrouvés dans les cellules hématopoïétiques. Tous partagent la même structure conservée associant des domaines SH3, SH2 et tyrosine kinase (Roskoski Jr. 2015).

### 2.3.3 Structure

Lyn, comme chaque protéine de type tyrosine kinase (SFK), possède un domaine amino-terminal (N-terminal) unique de 50 à 70 acides aminés, responsable de l'association à des partenaires spécifiques. Ce domaine N-terminal code des séquences de type signaux de palmitoylation et de myristoylation, une modification lipidique permettant l'ancrage de la protéine à la membrane.

A sa suite arrive un domaine Src homology 3 (SH3) de 60 acides aminés formé de cinq brins  $\beta$  antiparallèles et de deux boucles proéminentes. Entre ces deux boucles, se trouve des résidus aromatiques et hydrophobes composant le site de reconnaissance des séquences riches en proline formant le motif consensus PXXP, où X représente un acide aminé quelconque. Ces séquences riches en proline adoptent une structure secondaire en hélice (PPII : *polyproline type-II helical structure*). Ce domaine est impliqué dans des liaisons protéines-protéines et dans la régulation de l'activité de Lyn.

Il est suivi par le domaine Src homology 2 (SH2) de 96 acides aminés formé d'un feuillet central composé de 3 brins  $\beta$ , encadré d'une hélice de chaque côté formant chacune une poche de reconnaissance spécifique. La première poche reconnaît des séquences tyrosines phosphorylées apparentées au motif consensus YXXX. La deuxième poche contient un résidu arginine très conservé et interagit avec un résidu hydrophobe en position carboxy-terminale (C-terminale) de la phospho-tyrosine.

Un segment de liaison de 21 acides aminés relie le domaine SH2 à un domaine tyrosine kinase responsable de l'activité catalytique. Cette portion peut former une structure hélicoïdale capable d'interagir avec le domaine SH3.

Enfin arrive le domaine tyrosine kinase très conservé, de 253 acides aminés. Il possède

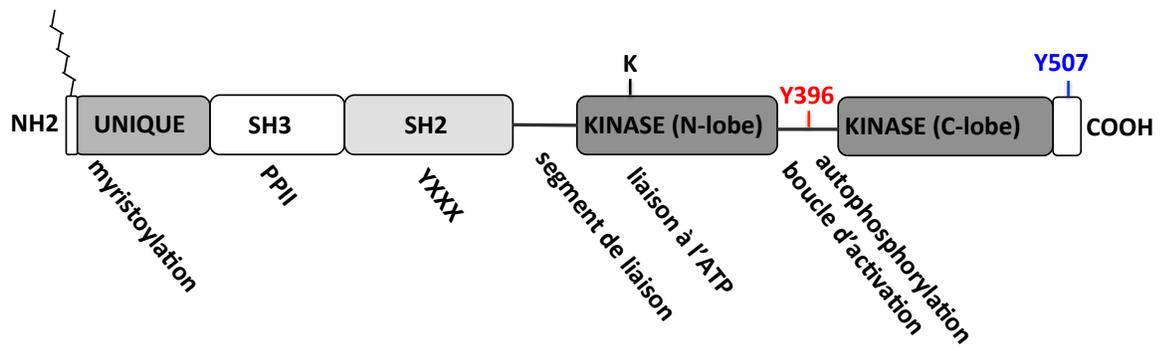


Figure 7 : Structure de Lyn. D'après (Hibbs and Harder 2006)

un domaine de liaison à l'ATP et catalyse le transfert du  $\gamma$ -phosphate de l'ATP à un résidu tyrosine de son substrat. Ce domaine catalytique possède un lobe N-terminal (N lobe) et un lobe C-terminal (C lobe) relié par un sillon. La superficie de ce sillon est délimité par une hélice  $\alpha$ , appelée  $\alpha$ C portée par la lobe NT et par une boucle d'activation portant la tyrosine activatrice 396 (Y396). La phosphorylation de cette tyrosine stimule l'activité de la kinase.

A l'extrémité carboxy-terminale de ce domaine, Lyn possède un résidu tyrosine inhibiteur (Y507). Dans des conditions basales, environ 90% des kinases Lyn sont phosphorylées sur la tyrosine 507 et voient ainsi leur activité inhibée. Cette tyrosine inhibitrice est sujette à la phosphorylation par la famille d'enzymes C-terminal SRC kinase (Csk) (Mayer 2001; Pawson 2004; Hibbs and Harder 2006; Moroco et al. 2014a; Boggon and Eck 2004) (Figure 7).

### **2.3.4 Structure secondaire de Lyn**

#### *2.3.4.1 Conformation inactive*

Les substrats de Lyn se lient aux domaines SH2 et SH3 afin d'activer le domaine catalytique. En état inactif, les domaines SH2 et SH3 se tournent vers l'intérieur et forment des interactions intramoléculaires. Lyn adopte alors une conformation compacte principalement due au déplacement de l'hélice  $\alpha$ C du N-lobe loin du site actif, empêchant la liaison d'un résidu glutamate conservé avec la Lysine 295, interaction critique à l'activité des SFK (Xu, Harrison, and Eck 1997; Xu et al. 1999). En conséquence, la boucle d'activation adopte une conformation  $\alpha$ -hélicoïdale qui éloigne les peptides de liaison au substrat et isole la tyrosine Y396 la rendant inaccessible à la phosphorylation (Williams, Wierenga, and Saraste 1998; Schindler et al. 1999; Boggon and Eck 2004). Cette conformation inactive empêche donc l'accès du substrat aux domaines SH2 et SH3 et diminue ainsi l'activité kinase. Elle résulte de deux types d'interaction moléculaires :

##### *2.3.4.1.1 Interaction SH3/Segment de liaison*

Le segment de liaison contient une séquence riche en proline capable de former une hélice hélicoïdale avec lequel le segment SH3 a une forte affinité (Hubbard and Till 2000). Lorsque le domaine SH3 se lie au segment de liaison, un changement de structure de la protéine est observé. La forme active de Lyn présente la boucle d'activation tournée vers l'extérieur du

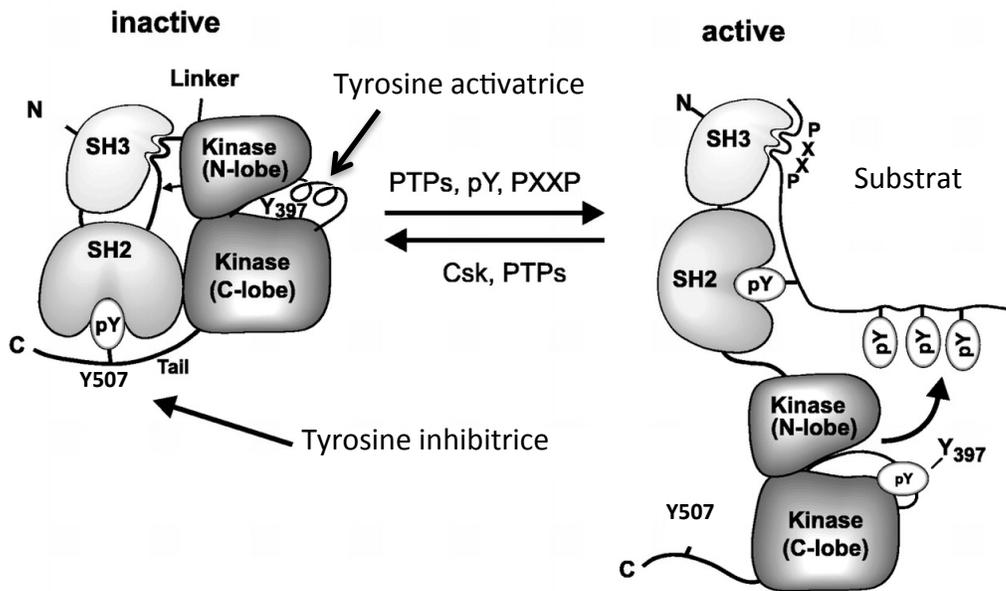


Figure 8 : Conformation et régulation de Lyn. D'après (Hibbs and Harder 2006)

domaine catalytique, ce qui expose la tyrosine 396 et permet l'accès du substrat et de l'ATP au site catalytique. A l'inverse, l'interaction de SH3 au segment de liaison provoque un réarrangement de la boucle d'activation en deux hélices  $\alpha$  plus serrées. Ceci entraîne un repli de la protéine qui est alors dans une forme compacte et rigide empêchant l'accès au substrat. Cependant, cette liaison est de faible affinité et est facilement dissoute par l'association d'un ligand ayant une plus forte affinité avec le domaine SH3 (Hubbard and Till 2000; Boggon and Eck 2004).

#### *2.3.4.1.2 Interaction SH2/Y507*

C-Src est phosphorylé sur sa tyrosine 527, un résidu absent de son homologue transformé, v-Src, alors que sa tyrosine activatrice 416 ne l'est pas, suggérant que la tyrosine 527 pourrait moduler l'activité de c-Src (Brown and Cooper 1996). Kmiecik et Shalloway ont construit des mutants où une phénylalanine remplace soit la tyrosine 527, soit la tyrosine 416, ou les deux. Ils ont alors démontré que l'activité kinase, mais aussi la capacité à changer de conformation sont significativement plus élevées chez les mutants ne possédant pas la tyrosine 527, confirmant que la phosphorylation de cette tyrosine supprime l'activité de c-Src (Kmiecik and Shalloway 1987). Ainsi, la phosphorylation de la tyrosine C-terminale peut inhiber l'activité de Lyn jusqu'à 98% quels que soient le substrat stimulateur et le degré de phosphorylation de la tyrosine 396 (Brown and Cooper 1996). En effet, lorsqu'elle est phosphorylée, la phosphotyrosine 507 interagit avec le domaine SH2, ce qui aboutit à une auto-inhibition enfermant Lyn dans une conformation inactive (Figure 8). Ce domaine régulateur est primordial pour la bonne activité de Lyn, sa délétion provoquant l'activation constitutive de la kinase. Ce type de mutations des SFKs peut mener à la formation de tumeurs. Par exemple, une délétion de six résidus à l'extrémité C-terminale de la kinase Src a été identifiée chez un groupe de patients atteints d'un carcinome du côlon à un stade avancé. Cette kinase Src mutée est incapable d'adopter une conformation inactive et présente une activité significativement plus élevée que la kinase Src normale. L'activation constitutive du Src mutant contribue alors au développement et à la progression du carcinome colorectal (Irby et al. 1999). Ceci souligne l'importance d'un strict contrôle de l'activité de Lyn pour maintenir l'homéostasie cellulaire et tissulaire (Brown and Cooper 1996).

Ainsi, Lyn révèle deux interactions intramoléculaires aboutissant à l'inhibition de l'activité

kinase. Une interaction implique le domaine SH3 et le segment de liaison tandis que l'autre inclut le segment SH2 et la phosphotyrosine Y507. Lorsque les deux interactions sont présentes, les domaines SH2 et SH3 sont placés contre le domaine kinase pour stabiliser la conformation inactive (Moroco et al. 2014b).

#### *2.3.4.1 Conformation active*

En conditions physiologiques, environ 90% des kinases de la famille Src sont maintenues dans une conformation inactive par des interactions intramoléculaires de leurs domaines SH2 et SH3. L'insertion d'un ligand dans le domaine SH3 provoque le déplacement du domaine SH3 à l'écart du segment de liaison et le déplacement de l'extrémité C-terminale du domaine SH2 (Xu et al. 1999). La conversion de Lyn en conformation active implique le changement d'orientation de l'hélice  $\alpha$ C du C-lobe. Le segment d'activation forme alors une boucle de telle sorte qu'elle ne soit pas en contact avec le substrat lié, libérant ainsi la tyrosine activatrice 396 qui devient accessible. La structure de la boucle d'activation de Lyn activée est alors stabilisée par une interaction électrostatique entre le groupe phosphate de Y396 et deux arginines (Schindler et al. 1999). Suite à la déphosphorylation de Y507, Y396 s'autophosphoryle, ce qui est corrélé avec son activation. Le remplacement de Y396 par une phénylalanine démontre que le résidu tyrosine phosphorylé n'est pas nécessaire à la conformation active de la protéine. Cependant l'activité kinase de ces protéines mutantes est 2 à 5 fois plus faible que les protéines sauvages, montrant que lorsque la tyrosine Y396 est phosphorylé, l'activité de Lyn est maximale (Figure 8).

#### **2.3.5 Régulation de l'activité de Lyn**

Ainsi, Lyn contient deux tyrosines conservées, importantes pour la régulation de l'activité kinase et possédant deux rôles opposés. La phosphorylation de la tyrosine 396, localisée sur le segment reliant les lobes N-terminal et C-terminal du domaine catalytique, stabilise la conformation active du domaine kinase. A l'inverse, la phosphorylation de la tyrosine 507 à l'extrémité C-terminale inhibe l'activité tyrosine kinase de Lyn (Moroco et al. 2014b). L'activation de Lyn est donc dépendante de l'autophosphorylation de la tyrosine 396, de la déphosphorylation de la tyrosine 507 et de la perturbation des interactions intramoléculaires

inhibitrices. La phosphorylation de ces sites est régit par les actions contradictoires des kinases et des phosphatases (Chong et al. 2005).

#### *2.3.5.1 Les kinases*

Afin de prévenir une activation aberrante, les SFK, dans les cellules normales, sont dans un état inactif soumis à de nombreux inhibiteurs endogènes. En effet, la tyrosine inhibitrice Y507 n'est pas un site d'autophosphorylation mais doit être phosphorylée par d'autres protéines. Les kinases inhibitrices des SFK sont C-terminal Src kinase (CSK) et CSK-homologous kinase (CHK). Ces deux protéines inactivent Lyn en phosphorylant spécifiquement la tyrosine 507 de la kinase (M. Okada et al. 1991). Des clones de lymphocytes B, dépourvus de CSKs, présentent un défaut de phosphorylation de la tyrosine 507 de Lyn. Lyn se trouve alors suractivée et autophosphorylée sur la Tyrosine 396, suggérant que CSK est un régulateur majeur de Lyn (Hata et al. 1994).

Les CSK et CHK ont une structure analogue aux SFK, avec un domaine SH3 et un domaine SH2. Cependant, elles sont dépourvues de modifications lipidiques N-terminales les empêchant de s'ancrer à la membrane, mais également de site d'autophosphorylation dans leur domaine kinase et de tyrosines inhibitrices en position C-terminale, ce qui indique une conformation différente des SFK (Chong, Mulhern, and Cheng 2005).

Les CSK et CHK résident donc principalement dans le cytosol alors que Lyn est ancrée à la membrane. Pour inhiber Lyn, CSK et CHK ont alors besoin d'être transloquées à la membrane. Le recrutement de CHK et CSK à la membrane plasmique dépend de l'interaction de leur SH2, SH3 et/ou de leur domaine kinase aux protéines SFK, à des protéines transmembranaires spécifiques, à des protéines G ou à des protéines adaptatrices localisées à proximité de la membrane plasmique.

La phosphorylation efficace et spécifique de la tyrosine inhibitrice des SFK par CSK requiert ensuite plusieurs interactions. D'une part, une interaction de courte portée qui lie le site actif de CSK à un acide glutamique (glu) et à une glutamine (gln) conservés proches de l'extrémité C-terminale des SFKs. D'autre part, deux interactions de longue portée qui lie CSK aux SFK. L'une

par l'interférence entre le domaine SH2 de CSK et la tyrosine activatrice autophosphorylée des SFK, l'autre par l'interaction entre l'hélice  $\alpha$ D de CSK et un motif non identifié des SFK.

De la même manière que CSK, CHK requiert aussi à la fois une interaction de longue portée et à la fois une interaction de courte portée pour une phosphorylation spécifique et efficace de Y507 (Chong et al. 2004).

CHK peut également inhiber les SFK via un mécanisme non catalytique. Dans un premier temps, CHK lie directement la kinase activée pour former un complexe CHK-SFK stable. La liaison est non catalytique, elle se déroule en absence d'ATP et cela, même si la tyrosine inhibitrice est remplacée par une phénylalanine. Plus important, cette liaison non catalytique seule est suffisante pour inhiber complètement les SFK. Dans un deuxième temps, CHK lié à une SFK phosphoryle la tyrosine inhibitrice. SFK se place alors dans une conformation inactive. Contrairement à l'habileté de CHK à lier fortement une SFK pour former un complexe protéique stable, la liaison de CSK aux SFK est de nature transitoire (Bougeret et al. 2001).

#### 2.3.5.2 Les phosphatases

Les phosphatases ayant démontré une compétence pour déphosphoryler la tyrosine inhibitrice de Lyn incluent les protéines cytoplasmiques PTP1B, Shp1 (*Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1*) et Shp2, ainsi que les enzymes transmembranaires CD45, PTP $\alpha$ , PTP $\epsilon$  et PTP $\lambda$  (Roskoski Jr. 2015). Dans les cellules hématopoïétiques, le CD45 est la phosphatase responsable de la déphosphorylation de Y507 (Hermiston, Xu, and Weiss 2003).

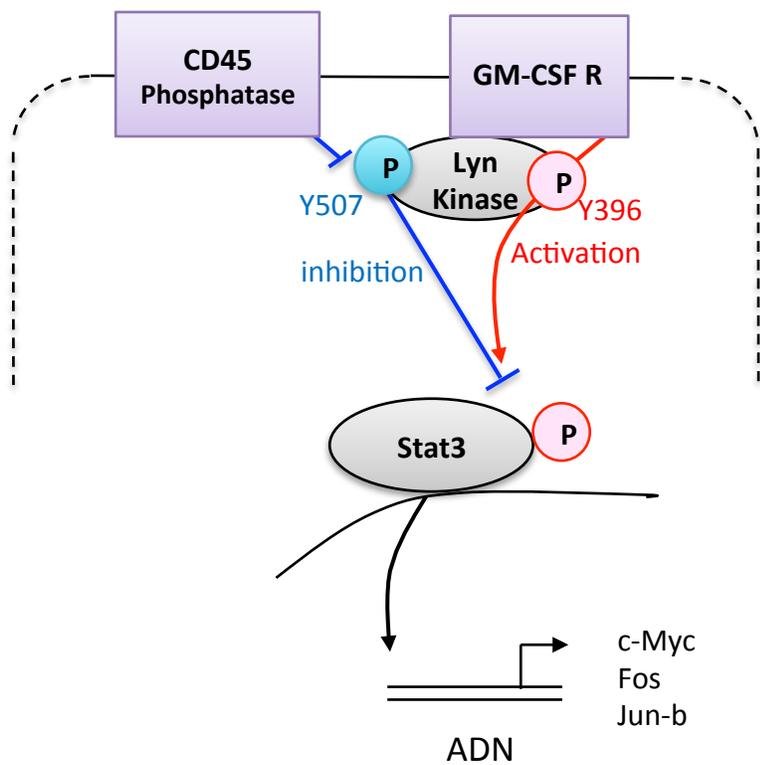


Figure 9 : Régulation de Lyn par le CD45. D'après (Hibbs and Harder 2006)

## 2.4 Le CD45

### 2.4.1 Introduction

Le CD45, aussi appelé l'antigène commun des leucocytes (LCA : *leukocyte common antigen*) est une glycoprotéine de haut poids moléculaire exprimée à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques, à l'exception des érythrocytes et des thrombocytes, et appartenant à la famille des protéines tyrosine phosphatases (PTP) (Thomas 1989; Tonks et al. 1988).

Le CD45 est l'une des glycoprotéines les plus abondantes présentes chez les leucocytes, représentant jusqu'à 10% des molécules de surfaces (Trowbridge and Thomas 1994a).

Le CD45 déphosphoryle les kinases Src impliquées dans la régulation de plusieurs récepteurs cytokiniques clefs. Dans les cellules myéloïdes, le CD45 agit sur le site inhibiteur de Lyn (Y507), la phosphorylation de ce site étant corrélée avec une inhibition de la signalisation du récepteur au GM-CSF (Hibbs and Harder 2006; Scapini et al. 2009; Wei et al. 1996) (Figure 9).

### 2.4.2 Structure

L'étude de l'organisation génomique de CD45 murin rapporte qu'il se compose de 34 exons s'étendant sur plus de 120 kilobases (kb). La taille et l'organisation des introns est similaire chez l'espèce humaine, ce qui suggère une importance fonctionnelle (Hermiston, Xu, and Weiss 2003).

Le produit du gène correspond à une protéine transmembranaire de type 1 constituée d'un domaine extracellulaire, d'un seul domaine transmembranaire et d'une grande queue cytoplasmique. La région cytoplasmique est hautement conservée, avec 95% d'homologie entre toutes les espèces de Mammifères. Elle contient deux domaines protéiques de type tyrosine phosphatase, D1 et D2 composés de 240 acides aminés chacun et séparés par une région de 56 acides aminés (Trowbridge and Thomas 1994a). Seul le domaine D1 a une activité enzymatique, bien que les deux domaines soient nécessaires à cette activité. Le domaine D2 contribuerait à la stabilité et à l'activité optimale du CD45 via une interaction intramoléculaire avec le domaine D1 ou avec la zone d'espacement entre D1 et D2 (Hayami-Noumi et al. 2000). Il faciliterait également l'accès des substrats au domaine D1, en se liant à des protéines du cytosquelette (Desai et al. 1994).

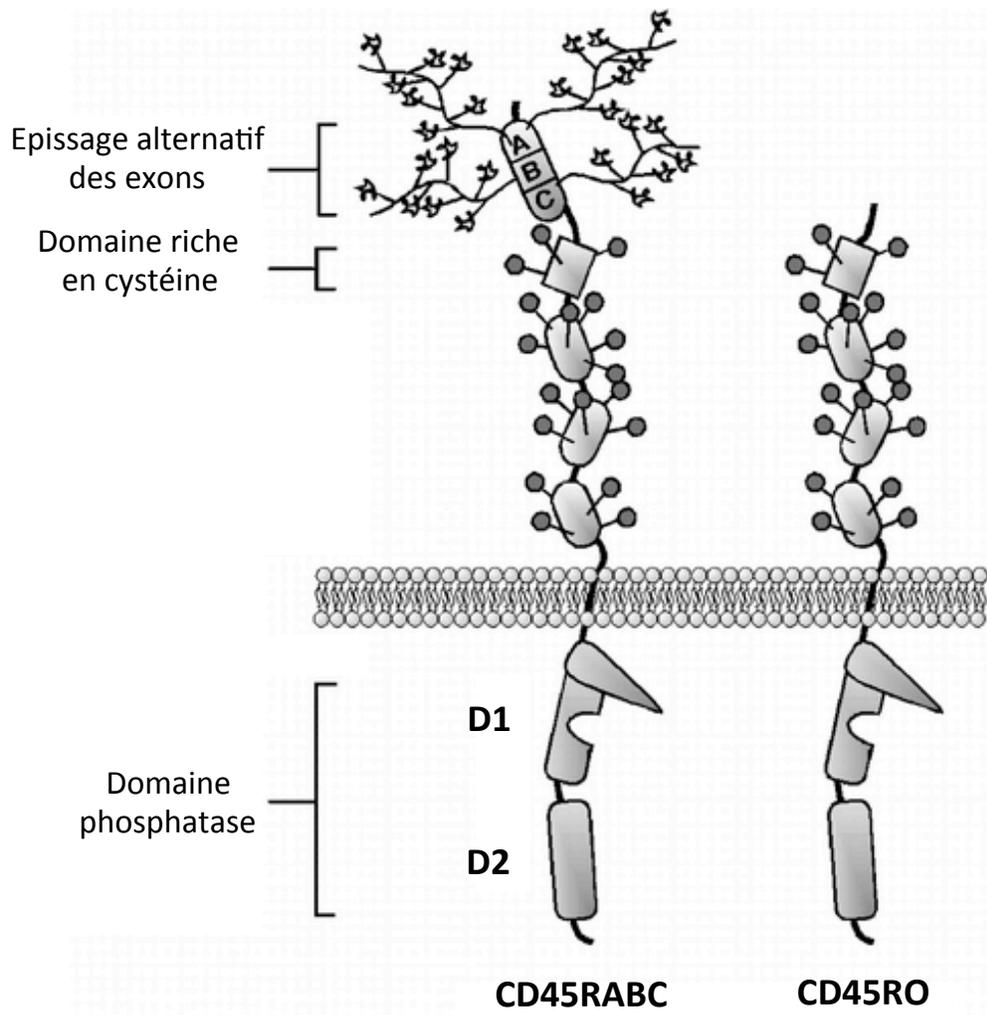


Figure 10 : Structure de CD45. D'après (Hermiston et al. 2003)

A l'inverse, le domaine extracellulaire montre seulement 35% d'homologie selon les différentes espèces. Néanmoins, l'analyse de CD45 à partir d'espèces divergentes indique une organisation globale conservée du domaine extracellulaire (Fukuhara et al. 2002).

Le domaine extracellulaire est exprimé sous différentes isoformes, selon le type cellulaire, le stade de développement et l'état d'activation de la cellule (Trowbridge and Thomas 1994a; Fukuhara et al. 2002). Ces différents modèles d'isoformes sont hautement conservés entre les espèces, suggérant une importance fonctionnelle *in vivo*. L'épissage alternatif des exons 4, 5 et 6, aussi appelés A, B et C, peuvent générer au moins huit isoformes différentes, dont cinq d'entre elles ont pu être détectées par protéomique chez l'Homme (Trowbridge and Thomas 1994a; Thomas 1989) (Figure 10). Des études au niveau de l'ARNm ont également fourni des preuves de l'épissage alternatif des exons 7, 8 et 10 dans plusieurs lignées cellulaires (Virts, Barritt, and Raschke 1998). Le poids moléculaire des différentes isoformes varie de 180 à 240 kDa, la plus lourde étant l'isoforme RA incluant les trois exons et la plus petite, l'isoforme RO excluant les trois exons. Le poids moléculaire des différentes isoformes varie en fonction du nombre d'exons exprimés mais également selon la glycosylation du domaine extracellulaire. En effet, le CD45 peut être fortement glycosylé par la N-glycosylation tout au long du domaine extracellulaire et par la O-glycosylation des différents exons A, B et C. Les N-glycoconjugués de CD45 sont principalement des chaînes de sucres complexes contenant des groupes poly-N-acétyl-lactosamine (Sato et al. 1993), tandis que les O-glycoconjugués contiennent essentiellement des oligosaccharides (Furukawa et al. 1998). La glycosylation de CD45 dépend non seulement de l'expression des différents exons, mais aussi du type cellulaire, du stade de développement, et de l'état d'activation de la cellule, ce qui suggère son importance fonctionnelle (Powell et al. 1993).

### **2.4.3 Régulation de CD45**

#### **2.4.3.1 Ligands de CD45**

La recherche de l'existence d'un ligand de CD45 se justifie par le fait que les caractéristiques globales de son domaine extracellulaire sont conservées durant l'Evolution et sont similaires à celles des récepteurs tyrosine kinases (RTK), tels que l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) et le PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*). En particulier, un motif

riche en cystéine dans la partie extracellulaire de CD45 est analogue à celui observé dans le EGFR, où il est important pour la liaison du ligand à l'EGFR. Les cystéines dans ce motif restent conservées entre les espèces, malgré l'homologie de 35% de la totalité du domaine extracellulaire (Trowbridge and Thomas 1994a). Cependant, de nombreuses tentatives ont échoué à identifier un ligand pour le CD45. Le CD22 et la galectine-1 ont été proposés comme ligands potentiels de CD45 dans les lymphocytes T, malgré l'absence de preuves directes que ces lectines modulent l'activité phosphatase de CD45 (Stamenkovic et al. 1991; Walzel et al. 1999).

#### 2.4.3.2 Dimérisation de CD45

La dimérisation de CD45 a été proposée comme un mécanisme permettant de réguler sa fonction, suite à des études menées sur une molécule chimère, EGFR-CD45, comprenant les domaines extracellulaires et transmembranaires de l'EGFR fusionnés avec le domaine cytoplasmique du CD45. EGFR-CD45 restaure la signalisation du TCR dans une lignée de lymphocytes déficients en CD45. Or, cette activité est supprimée par un traitement à l'EGF (*epidermal growth factor*), induisant la dimérisation de l'EGFR-CD45 chimère (Desai et al. 1993). De même, certains anticorps entraînant la dimérisation du CD45 inhibent sa fonction (Trowbridge and Thomas 1994a).

L'inhibition induite par la dimérisation, peut être expliquée par la structure cristallographique du domaine phosphatase proche de la membrane des RPTP. Ce fragment de protéine forme un dimère dans lequel le site catalytique est bloqué par des contacts spécifiques avec son partenaire. La comparaison des séquences indique que les résidus d'acides aminés de ce fragment sont conservés parmi les RPTP, ce qui suggère que le CD45 peut se replier en une structure similaire (Bilwes et al. 1996). Cette hypothèse a été confirmée grâce à une mutation d'un résidu de ce fragment protéique de l'EGFR-CD45 abolissant l'effet inhibiteur de l'EGF (Majeti et al. 1998).

Les dimères de CD45 ont été détectés par plusieurs méthodes différentes. Une petite population de CD45 apparaît en *western blotting* sous forme de dimères après un *cross-linking* chimique d'une lignée de lymphocytes T murins (Takeda, Wu, and Maizel 1992). Une protéine recombinante formée de la région proximale de la membrane et le domaine D1 du CD45 existe

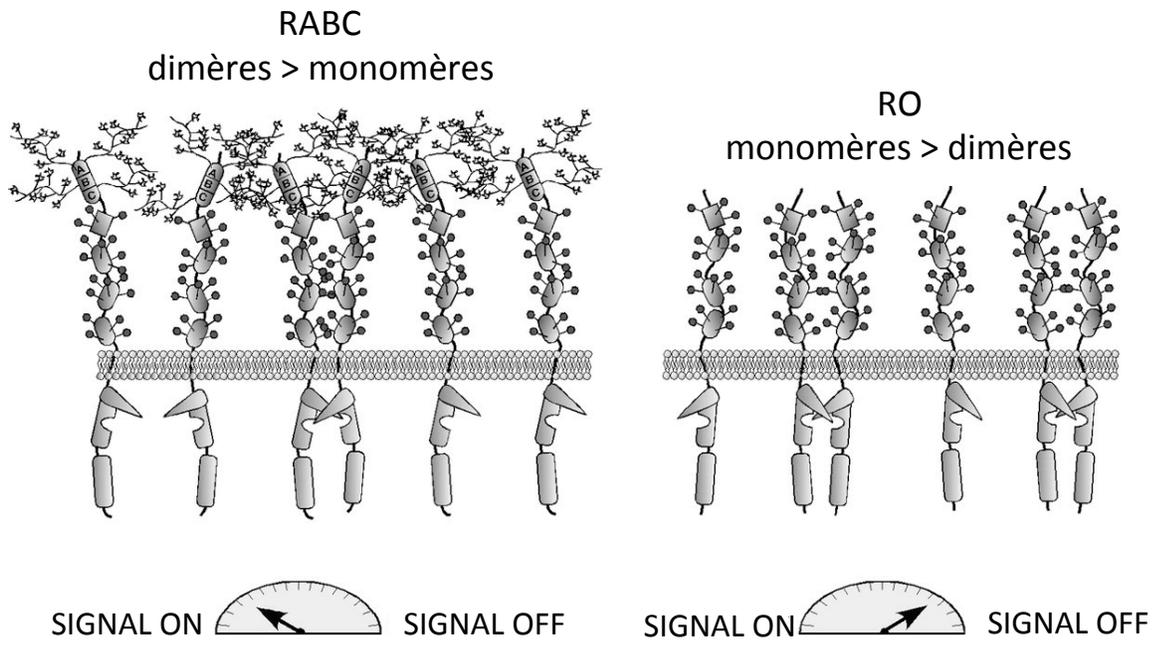


Figure 11 : Régulation du CD45 par dimérisation dépendante des isoformes. D'après (Hermiston et al. 2003)

principalement sous forme de dimères (Felberg and Johnson 1998). Les protéines recombinantes constituées de fragments du domaine extracellulaire de CD45 se trouvent à la fois sous forme de monomères ou de dimères (Symons, Willis, and Barclay 1999). Des homodimères de l'isoforme RO du CD45 ont été détectés par transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), dans une lignée de lymphocytes T déficients en CD45 reconstituée avec diverses isoformes (Dornan et al. 2002). Il a également été démontré que l'isoforme RA de CD45 peut former spontanément des homodimères en absence de protéines ajoutées de manière exogène (Majeti et al. 2000).

#### 2.4.3.3 Isoformes du CD45

La dimérisation de CD45 inhibe donc son activité. La dimérisation spontanée ou dépendante des isoformes pourrait être un mécanisme de modulation de CD45, comme le suggère l'abondance de CD45 à la surface cellulaire, la détection d'homodimères et l'épissage alternatif conservé et réglementé. Effectivement, la plus petite isoforme du CD45 (RO) dimérise plus efficacement et plus rapidement que les isoformes de plus grande taille. Des études ont déterminé que la dimérisation est entravée par la O-glycosylation des exons à épissage alternatif. Ainsi, les isoformes RABC, comportant les trois exons, existent principalement sous forme de monomères actifs. La plus petite taille du domaine extracellulaire RO, ne comportant aucun exon, facilite la dimérisation. Ainsi, la régulation de CD45 pourrait être régie par un équilibre entre les monomères et les dimères (Figure 11) (Farber, Acuto, and Bottomly 1997; Hall et al. 1999).

#### 2.4.3.4 Interaction de CD45 avec d'autres protéines

L'interaction avec d'autres protéines pourrait également moduler le CD45, en modifiant l'accès au substrat ou son activité phosphatase. Selon le type cellulaire, le CD45 a été retrouvé associé à différentes molécules de surface telles que Thy-1, le TCR et le Cd2, bien qu'il reste possible que ces molécules soient réticulées à CD45 de façon aléatoire (Trowbridge and Thomas 1994b). Dans les lymphocytes, une interaction entre le domaine transmembranaire de CD45, particulièrement les monomères, et la protéine *lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein* (LPAP) est plus clairement définie (Felberg and Johnson 1998; Takeda, Wu, and

Maizel 1992). L'adhérence des lymphocytes T implique une association entre le CD45 et le CD100. Seules les isoformes ne contenant pas plus de deux exons variables peuvent interagir avec CD100 (Bourguignon et al. 1985).

Le domaine cytoplasmique de CD45 est capable de lier la fodrine, ce qui lui assure un lien avec le réseau de microfilaments intracellulaires. Le domaine D1 de Cd45 interagit avec la protéine adaptatrice SKAP55 qui pourrait jouer un rôle dans la liaison du CD45 aux SFK (Wu, Fu, and Shen 2002).

#### 2.4.3.5 La localisation du CD45

La localisation cellulaire et l'accès au substrat peuvent moduler l'effet du CD45 sur la signalisation. La redistribution d'un *pool* intracellulaire de CD45 a été observée lors de l'activation de granulocytes neutrophiles ou de lymphocytes T, bien que sa conséquence fonctionnelle soit inconnue.

La localisation du CD45 par rapport aux radeaux lipidiques semble particulièrement déterminante. Il a été démontré que le CD45 est absent des radeaux lipidiques des membranes des lymphocytes T de la lignée Jurkat non stimulées. L'activation du récepteur des lymphocytes T (TCR) favorise l'agrégation de radeaux lipidiques facilitant la colocalisation de protéines associées aux radeaux lipidiques, telles que Lck et TCR, mais qui exclut le CD45 (Rodgers and Rose 1996; Xavier et al. 1998). Un phénomène similaire a été observé dans les lymphocytes B (Pierce 2002).

La localisation du CD45 en dehors ou en dedans des radeaux lipidiques est cruciale pour la déphosphorylation des kinases Src. Alors que cette régulation a été étudiée dans la maturation des lymphocytes normaux et dans l'activation de la réponse immunitaire, très peu d'études ont été réalisées sur les cellules myéloïdes et encore moins dans le contexte de la leucémogénèse (Hermiston, Xu, and Weiss 2003; Simons and Gruenberg 2000).

### 3. Les radeaux lipidiques

#### 3.1 Historique

L'intégrité de la cellule est préservée grâce à la présence d'une enveloppe externe appelée membrane plasmique. Ce concept est apparu en 1855, permettant à Von Nägeli et

Cramer d'expliquer l'existence de flux osmotique. En 1890, Overton émet l'hypothèse que la membrane plasmique est composée de lipides. En 1935, Davson et Danielli définissent la membrane plasmique comme un double feuillet de phospholipides, de lipides neutres et de glycolipides auxquels seraient associés des protéines (Danielli and Davson 1935). C'est en 1972 que Singer et Nicholson amènent une avancée majeure avec le modèle de la mosaïque fluide, considérant la membrane comme une structure hétérogène et dynamique. Ainsi, la membrane plasmique est présentée comme une bicouche de phospholipides dans lesquels sont intégrées des protéines membranaires pouvant se déplacer (Singer and Nicholson 1972). Par la suite, d'autres travaux ont montré que les lipides et les protéines membranaires ne sont pas distribués de manière aléatoire. Ces études ont mené à un nouveau concept, décrivant la membrane plasmique comme un milieu hétérogène, composé de régions fluides et de régions denses, organisées en macro- et micro-domaines membranaires dont certains interviennent dans des processus biologiques tels que les phénomènes de transport ou la transduction du signal (Lisanti and Rodriguez-Boulan 1990). Nous nous intéresserons plus particulièrement à un type de microdomaine membranaire, les radeaux lipidiques de forte densité et pouvant se déplacer sur les régions plus fluides (Pike 2004).

### **3.2 Composition de la membrane plasmique**

La membrane plasmique est un double feuillet de 7 nm d'épaisseur, constitué principalement de lipides et de protéines définissant des activités propres à la membrane. Les lipides sont des molécules amphiphiles, dont les têtes hydrophiles sont exposées vers le milieu extracellulaire ou le cytoplasme tandis que les chaînes hydrocarbonées, hydrophobes, se font face en raison de leur affinité réciproque. Grâce à cette propriété amphiphile, la bicouche lipidique va se former, dans laquelle des protéines vont ensuite s'intégrer, formant la membrane plasmique. Il existe une vaste variété de lipides constitutifs, qui varient en fonction du type de cellules et de leurs stades de croissance. Les trois grandes familles principalement retrouvées sont les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols (Simons and Gruenberg 2000; van Meer 1998).

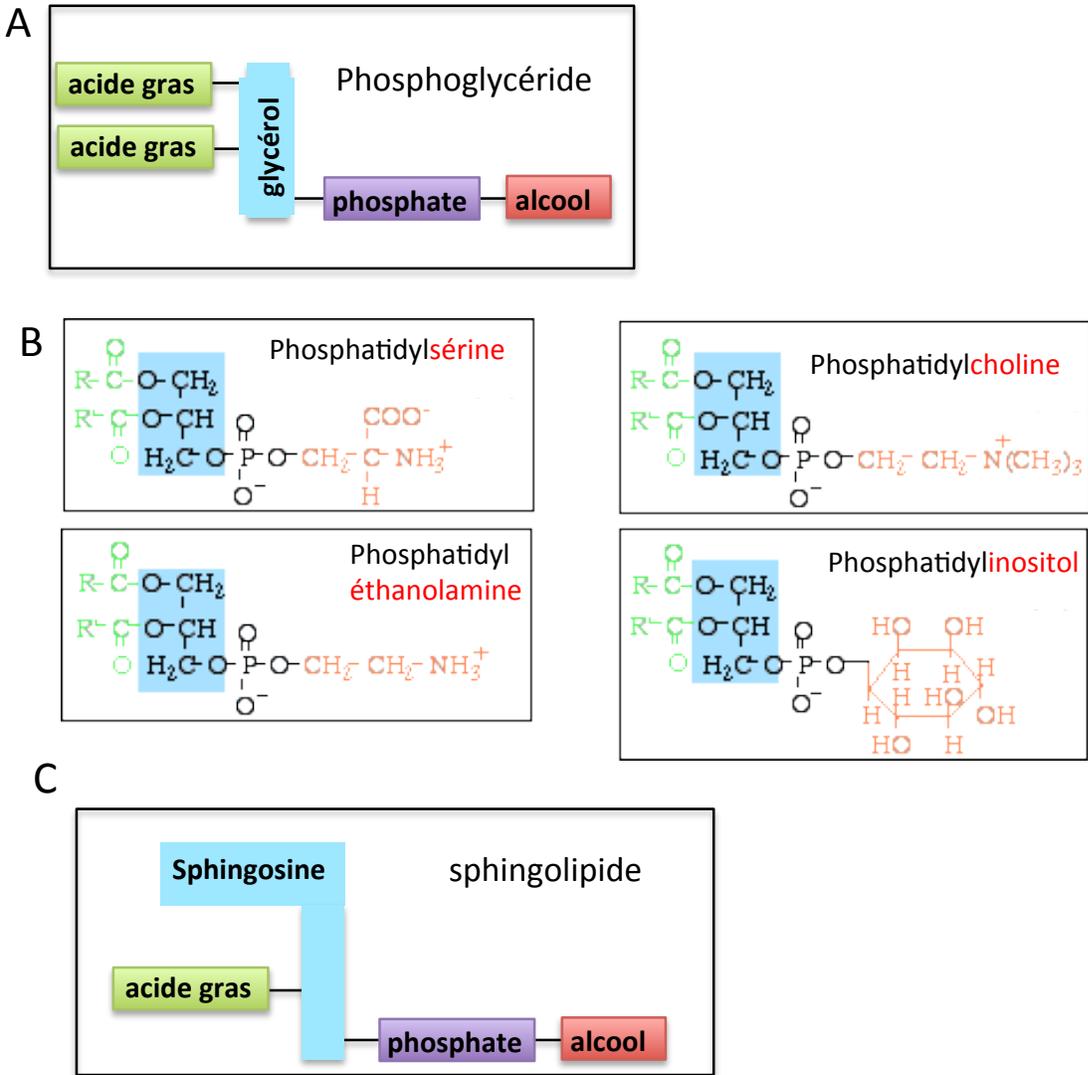


Figure 12 :

(A) Structure générale d'un glycérophospholipide

(B) Les différents glycérophospholipides

(C) Structure générale d'un sphingolipide. D'après (Purves et al. 2003)

### **3.2.1 Les glycérophospholipides**

Les glycérophospholipides sont les lipides majoritairement retrouvés dans les membranes et sont représentés par les phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine et myo-inositol. Leur structure est caractérisée par un squelette de glycérol sur lequel deux des fonctions alcool sont estérifiées par des acides gras de 16 à 22 atomes de carbone. La troisième fonction alcool est substituée par un groupement phosphate et constitue la tête, polaire, du phospholipide (Figure 12A). Le phosphate est suivi d'un groupement alcool permettant de classer le phospholipide : choline, représentant la moitié des lipides cellulaires, éthanolamine, sérine ou inositol (Figure 12B) (Purves et al., 2003).

### **3.2.2 Les sphingolipides**

Les sphingolipides sont caractérisés par la présence d'un squelette de sphingosine, un amino-alcool à longue chaîne hydrocarbonée. La fonction amine accueille un acide gras de 20 à 26 atomes de carbone, constituant la queue apolaire. Sur la fonction alcool se greffe le groupement polaire, de nature très diverse (Figure 12C). Ainsi, sont distingués les céramides, la sphingomyéline et enfin, les glycosphingolipides se divisant en cérébrosides ou gangliosides (Yechiel, Henis, and Barenholz 1986).

### **3.2.3 Les stérols**

La famille de stérols est représentée par le cholestérol et ses dérivés. La structure du cholestérol comprend un squelette de quatre cycles carbonés rigides et plans suivi d'une chaîne de 8 carbones asymétriques. Le cholestérol possède un groupe hydroxyle sur le troisième cycle carboné constituant la tête polaire de la molécule (Figure 13). Le cholestérol s'insère entre les phospholipides, ce qui permet de rigidifier la membrane et ainsi, de moduler les propriétés physiques, structurales et dynamiques des membranes (Figure 14) (Ohvo-Rekilä et al. 2002; Yeagle 1985).

### **3.2.4 Asymétrie de la membrane plasmique**

Les lipides ne sont pas répartis équitablement entre les deux feuilletts membranaires. En effet, les phosphatidylcholines et les sphingomyélines sont retrouvés majoritairement dans le

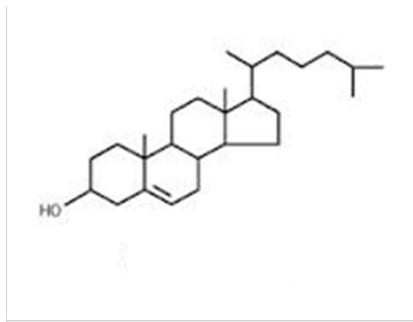


Figure 13 : Structure générale du cholestérol. D'après (Purves et al. 2003)

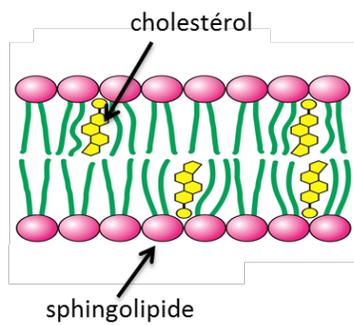


Figure 14 : Le cholestérol dans la membrane plasmique.

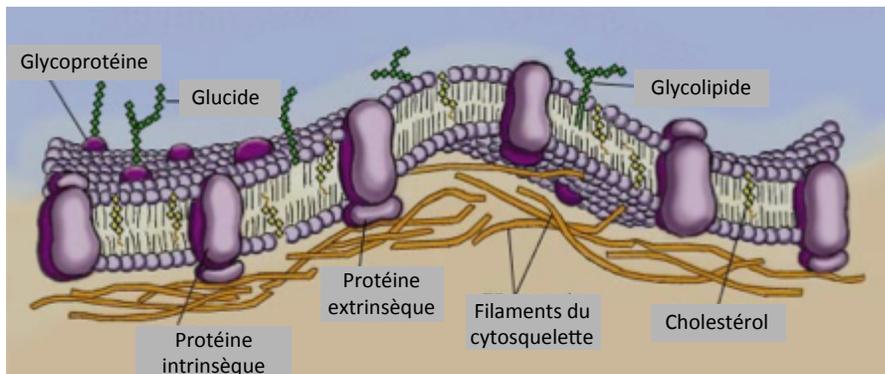


Figure 15 : La membrane plasmique.

D'après <http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/Biologie/Cellule/membrane-feuilles-etudiants-2.html>).

feuillet externe tandis que les phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines sont localisés de façon prédominante dans le feuillet externe (Bretscher 1973). Malgré tout, bien que cette inégalité de répartition semble être ubiquitaire à chaque cellule, la distribution transmembranaire des acides gras varie considérablement d'un type cellulaire à l'autre (Devaux and Morris 2004). La translocation du cholestérol s'effectue facilement d'une membrane à l'autre, et sa prépondérance dans l'un ou l'autre feuillet dépend du type cellulaire (McIntosh, Vidal, and Simon 2003). Par exemple, dans les érythrocytes il est présent préférentiellement au niveau du feuillet interne (Schroeder et al. 1991).

### **3.2.5 Les protéines**

Les lipides sont donc à la base de la formation de l'ensemble des membranes. Néanmoins, la présence de protéines est nécessaire afin d'assurer les fonctions biologiques spécifiques de la cellule. Des protéines membranaires fonctionnelles sont essentielles à l'activité physiologique de la cellule. Il existe deux types de protéines membranaires, classées selon la nature de leurs interactions avec la membrane.

Les protéines intrinsèques sont incluses dans la membrane plasmique par au moins l'un de leur segment protéique. Certaines protéines intrinsèques sont dotées d'une ou plusieurs parties hydrophobes directement localisées au cœur du double feuillet lipidique. Les autres sont reliées à la membrane interne ou externe de la bicouche par liaison covalente de leurs chaînes hydrocarbonées.

Les protéines extrinsèques n'ont pas d'interactions directes avec le cœur du feuillet lipidique. Elles sont reliées à la membrane par des interactions avec la tête hydrophile des lipides ou bien avec les protéines intrinsèques (Figure 15).

### **3.3 La compartimentation membranaire**

Les lipides et les protéines ne sont pas distribués de façon aléatoire dans la composition de la membrane ; de nombreuses études suggèrent l'existence de macro- et de micro-domaines latéraux et transverses au sein de la membrane. Ces domaines membranaires ont une importance dans les fonctions biologiques puisqu'ils joueraient le rôle de plateforme de signalisation permettant la compartimentation, l'organisation et la régulation de molécules

appartenant à une même voie de signalisation. Ainsi, ces domaines confinaient temporairement divers partenaires protéiques, ce qui favoriserait l'efficacité et la spécificité de la réponse cellulaire (Chidiac 1998). La surface des macrodomaines est comprise entre 10 et 50  $\mu\text{m}^2$  et couvre la surface de certaines cellules spécialisées, comme les spermatozoïdes ou les cellules épithéliales. La surface des microdomaines est de taille inférieure au micromètre (Tocanne et al. 1994). Il existe des microdomaines de compositions lipidiques différentes. Les microdomaines les plus étudiés sont les radeaux lipidiques dont la composition lipidique les distingue particulièrement.

### **3.4 Les radeaux lipidiques**

#### **3.4.1 Historique**

Au cours des années 1980, Simons et Van Meer observent que les différentes faces des cellules épithéliales n'ont pas la même composition en lipides. La face apicale est enrichie en sphingoglycolipides et en sphingomyéline tandis que la face basolatérale présente davantage de phosphatidylcholine (van Meer 1998). Afin d'expliquer cette différence de distribution lipidique, ils émettent l'hypothèse que des domaines enrichis en sphingoglycolipides et en sphingomyéline, qu'ils appelleront « *lipid rafts* », auraient un rôle de recrutement de certaines protéines.

Parallèlement, des travaux rapportent l'insolubilité des membranes cellulaires enrichies en sphingomyéline en présence de Triton X-100. Il a été démontré que l'association du cholestérol et des lipides à chaînes saturées entraîne une résistance aux détergents, propriété notable de ces ensembles (Davies et al. 1984; Haggmann and Fishman 1982; Hoessli and Rungger-Brändle 1983).

Ce n'est qu'une dizaine d'années plus tard que des corrélations ont été établies entre les propriétés physico-chimiques de membranes créées artificiellement et les membranes biologiques résistantes au Triton X-100 (Ahmed, Brown, and London 1997; Schroeder et al. 1991).

L'ensemble de ces observations ont amené Simons et Ikonen à définir un modèle de membrane cellulaire hétérogène contenant des microdomaines enrichis en cholestérol et sphingolipides insolubles dans du Triton X-100 (Simons and Ikonen 1997). Aujourd'hui, un

radeau lipidique est défini comme une entité hétérogène, de petite taille, dynamique, de faible densité, riche en cholestérol et en sphingolipides et résistante aux détergents. Les radeaux lipidiques permettent la compartimentation des processus cellulaires et peuvent parfois être stabilisés afin de former de plus grandes plateformes durant les interactions protéines/protéines ou lipides/protéines (Pike 2006).

### **3.4.2 Dynamique des radeaux lipidiques**

Les radeaux lipidiques sont considérés comme des microdomaines hétérogènes compris entre 30 et 100 nm de diamètre contenant plus d'une centaine de lipides et entre 5 et 10 protéines (Sengupta, Baird, and Holowka 2007). Cependant, les radeaux lipidiques sont dynamiques, leur taille et leur composition peuvent varier en fonction de l'état d'activation de la cellule. Ils sont capables de favoriser les interactions en augmentant les collisions entre protéines, puis de maintenir une interaction en la stabilisant dans une plateforme de signalisation (Hoessli et al. 2000). Ainsi, grâce à cette découverte des radeaux lipidiques, les lipides ne sont plus uniquement considérés comme un simple support des protéines membranaires. Par une organisation en domaines distincts, ils jouent le rôle de plateforme de recrutement de protéines impliquées dans des voies de signalisation (Simons and Ikonen 1997).

### **3.4.3 Formation des radeaux lipidiques**

Le principe de formation des radeaux lipidiques repose sur des interactions lipides/lipides. Les propriétés physico-chimiques entraînent une affinité plus forte entre les chaînes de sphingolipides qu'entre celles des glycérophospholipides. Ainsi, les sphingolipides ont tendance à se regrouper entre eux (Ramstedt and Slotte 2002). De plus, la structure des lipides encourage ce rapprochement. En effet, dans les sphingolipides, l'acide gras greffé sur la fonction amine est d'une longueur comprise entre 20 à 26 atomes de carbone, alors que les chaînes des glycérophospholipides sont plus courtes. Le nombre d'insaturation est également différent, avec davantage de double liaison pour les glycérophospholipides. Cette double liaison entraîne une structure coudée de la chaîne d'acide gras, ce qui affecte les interactions avec les autres composants de la membranes, comme les stérols ou les protéines (Ramstedt and Slotte 2002). Une autre particularité des radeaux lipidiques est leur composition élevée en cholestérol. L'affinité du cholestérol pour les lipides varie également en fonction de la longueur et du degré

d'insaturation des chaînes acyles des lipides. Ainsi, les interactions du cholestérol avec les sphingolipides à longues chaînes saturées sont favorisées par rapport aux phospholipides à chaînes insaturées plus courtes (Smaby et al. 1996). En s'insérant entre les sphingolipides, le cholestérol permet de rigidifier les chaînes d'acides gras flexibles. Ainsi, les radeaux lipidiques présentent une rigidité plus importante que le reste de la membrane.

#### **3.4.4 Protéines associées aux radeaux lipidiques**

La plupart des protéines se répartissent dans la phase fluide de la membrane, mais de nombreuses protéines sont localisées préférentiellement dans les radeaux lipidiques. L'affinité des protéines pour les ceux-ci est déterminée essentiellement par des modifications post-traductionnelles telles que le niveau de glycosylation, les palmitoylations et myristoylations qui sont des signaux efficaces de ciblage des radeaux lipidiques (Brown 2006; Wang, Esselman, and Cole 2002).

Les premières protéines à avoir été localisées dans les radeaux lipidiques sont les protéines à ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI). La partie glycolipidique les reliant au feuillet exoplasmique explique leur affinité (Brown and Rose 1992; Chatterjee and Mayor 2001). Les flotillines sont particulièrement connues pour être localisées dans les radeaux lipidiques, de par leur fort taux de palmitoylation et myristoylation (Rajendran et al. 2003), 2003), ainsi que les protéines liant le cholestérol, telles que les cavéolines, ou encore les protéines kinases de la famille Src, ayant une double acétylation et ancrées dans le feuillet cytoplasmique (Simons and Toomre 2000). L'addition de chaînes hydrophobes saturées permet particulièrement à Lyn d'être constitutivement localisée dans les radeaux lipidiques (Liang et al. 2001).

La localisation des protéines a un impact important sur leur fonction, et une modification de la localisation peut avoir des effets indésirables importants. Par exemple, le CD45 n'est pas localisé dans les radeaux lipidiques des cellules murines non transformées et dans les cellules hématopoïétiques humaines mais se retrouve localisé dans les radeaux lipidiques lors de la transformation oncogénique (Saint-Paul et al. 2016).

### **3.4.5 Rôle des radeaux lipidiques**

Les radeaux lipidiques sont impliqués dans une grande variété de processus biologiques, tels que la transduction de signaux, le trafic membranaire et l'infection par certains pathogènes. En flottant dans l'environnement membranaire, ils recrutent un ensemble de protéines spécifiques et en excluent d'autres, permettant de contrôler des voies de signalisation particulières. Des études effectuées sur les cellules hématopoïétiques ont permis de démontrer de nombreux rôles des radeaux lipidiques, particulièrement en ce qui concerne la réponse immunitaire. En effet, la liaison de l'antigène à son récepteur provoquerait l'agrégation des récepteurs à leur niveau où ils activeraient les protéines kinases de la famille Src, naturellement présentes dans les radeaux lipidiques. Par exemple, le regroupement du récepteur à haute affinité de l'immunoglobuline E (FcεRI) conduit à l'activation de Lyn, initiant une cascade de signalisation provoquant la dégranulation (Field, Holowka, and Baird 1995; Simons and Toomre 2000).

### **3.4.6 Isolement des radeaux lipidiques**

La méthode traditionnelle d'isolement des radeaux lipidiques est basée sur le principe que seule une partie des composants membranaires est soluble dans des détergents non ioniques, les radeaux lipidiques étant définis comme résistants (London and Brown 2000). Cette méthode consiste à traiter les cellules ou des membranes isolées avec du détergent, le plus souvent du Triton X-100. Une centrifugation sur gradient de sucrose permet ensuite de séparer les membranes résistantes aux détergents du matériel soluble. Les radeaux lipidiques se retrouvent dans les fractions de basse densité tandis que le matériel soluble est localisé dans les fractions de haute densité (Macdonald and Pike 2005).

## **4. Impact des radeaux lipidiques et de la voie du GM-CSF/CD45 dans la leucémogénèse**

De nombreuses études indiquent que la voie du GM-CSF est fréquemment sur-activée dans de multiples cancers. Le GM-CSF stimule la progression de la tumeur en soutenant son microenvironnement et en stimulant la prolifération des cellules tumorales. L'activation du récepteur au GM-CSF et de sa voie de signalisation sont essentielles dans le développement des LAM (Hong 2016a).

## **4.2 Le récepteur au GM-CSF est surexprimé à la surface des blastes**

Les blastes leucémiques présentent à leur surface un fort taux du récepteur au GM-CSF. En effet, l'utilisation de GM-CSF recombinant (r-GM-CSF) radiomarqué a établi que des cellules leucémiques présentent en moyenne dix fois plus de récepteur au GM-CSF que des cellules souches hématopoïétiques saines (Budel et al. 1989; Park et al. 1986). Des analyses de cytométrie en flux ont permis de confirmer que le récepteur au GM-CSF est exprimé dans plus de 80% des cellules blastiques de patients atteints de LAM (Lanza et al. 1997).

## **4.3 Les blastes produisent du GM-CSF**

La plupart des cellules initiatrices de leucémies sont quiescentes. Lorsque ces cellules sont mises en culture dans du milieu exempt de sérum, ces cellules entrent en cycle cellulaire actif alors que les cellules souches hématopoïétiques normales restent au repos. Une production autocrine de GM-CSF des cellules leucémiques a été mise en évidence, expliquant l'avantage compétitif et l'activité proliférative anormale de ces cellules (Guan, Gerhard, and Hogge 2003).

## **4.4 Activation constitutive de la voie du GM-CSF dans les blastes**

Les blastes possèdent donc plus de GM-CSFR à leur surface et sont capables de produire eux-mêmes du GM-CSF. Ceci entraîne une hypersensibilité au GM-CSF et donc une amplification anormale de cette voie dans les blastes (Hercus et al. 2009).

### **4.4.1 Suractivation de Lyn**

Les protéines tyrosine kinases et leurs phosphatases correspondantes coopèrent afin de contrôler la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. La dérégulation de ces enzymes est liée au développement de cancers. Les protéines kinases de la famille Src ont un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Latour and Veillette 2001). La plupart des membres de cette famille sont impliqués dans la transmission de signaux conduisant à l'activation cellulaire. La perturbation de ces signaux a été associée à une transformation maligne (Brown et Cooper, 1996). Lyn agit en amplifiant le signal reçu par le GM-CSFR et de nombreux travaux ont montré que la sur-activation de Lyn est impliquée dans la leucémogénèse

(Hibbs and Harder 2006).

#### **4.4.2 Dérégulation de CD45**

Des perturbations dans la fonction de CD45 sont également impliquées dans des hémopathies malignes (Penninger et al. 2001). Divers travaux se sont intéressés au rôle de CD45 dans les myélomes. Il s'avère que les effets prolifératifs induits par l'IL-6 sont étroitement liés à l'expression de CD45 (Ishikawa et al. 2000; Mahmoud et al. 1998). Plus précisément, le contrôle de Lyn par le CD45 est essentiel à la réponse induite par l'IL-6 (Ishikawa et al. 2000). Il sera abordé ici l'importance du CD45 dans la régulation de la prolifération induite par la voie du GM-CSF dépendante de Lyn.

#### **4.4.3 Suractivation de Stat3**

Les SFK agissent via l'activation des protéines STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) : STAT1, STAT3 et STAT5. Seule STAT3 a été retrouvée co-immunoprécipitée avec v-Src (Chaturvedi, Sharma, and Reddy 1997). Des études *in vitro* ont démontré que les protéines STAT sont essentielles aux processus induits par les cytokines, tels que la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie (Coffer, Koenderman, and de Groot 2000). Les STATs sont également cruciales dans le développement de diverses affections malignes myéloïdes. Ainsi, l'activation constitutive de STAT3 accroît la transcription de gènes anti-apoptotiques, ce qui contribue à la pathogénèse de plusieurs leucémies (Coffer, Koenderman, and de Groot 2000).

#### **4.5 Les inhibiteurs de la voie du GM-CSF**

Le GM-CSF lié à son récepteur promeut la survie et la prolifération des cellules. Cette voie de signalisation représente un élément important dans la survenue de pathologies, en raison de son activation anormale conduisant à une prolifération accrue des blastes leucémiques. Ceci met en évidence le potentiel thérapeutique d'une inhibition de la voie de signalisation du GM-CSF (Hercus et al. 2009).

Ces dernières décennies, le récepteur au GM-CSF est en effet prisé en tant que cible thérapeutique. Afin de cibler spécifiquement les cellules leucémiques, surexprimant le récepteur au GM-CSF, plusieurs protéines de fusions ont été développées. Ainsi, le GM-CSF

fusionné avec l'exotoxine de *Pseudomonas* est cytotoxique pour les lignées cellulaires de LAM résistantes à la chimiothérapie et les cellules progénitrices du LAM, alors que leurs homologues normaux sont épargnés (Kreitman and Pastan 1997). Liée au GM-CSF, la protéine saporine, une molécule dérivée de la toxine végétale saporine, permet d'éliminer des cellules murines transfectées avec le récepteur humain au GM-CSF (Lappi et al. 1993). Le ligand fusionné avec la toxine diphtérique peut éliminer les lignées cellulaires de LAM résistantes à la chimiothérapie et les cellules de patients LAM par activation de la voie apoptotique (Perentesis et al. 1997; Hall et al. 1998). Néanmoins, ces protéines fusionnées à des toxines bactériennes ou végétales entraînent des réactions immunitaires et des hépatites chez les patients traités (Frankel et al. 2002). Pour contourner ce problème, le GM-CSF a été fusionné avec le facteur de fragmentation de l'ADN 40 (DFF40), aussi appelé DNase activée par caspase (CAD), une endonucléase conduisant à l'apoptose des blastes (Mathew, Zaineb, and Verma 2013). Une autre stratégie a consisté à substituer le résidu glutamate en position 21 du GM-CSF par une arginine. La molécule obtenue, nommée GM-CSF E21R est capable de se lier uniquement au site 1 du GM-CSFR, fonctionnant donc comme un antagoniste compétitif du GM-CSF et neutralisant ainsi ses effets biologiques (Jakupovic et al. 2004; Hercus et al. 2009). Des inhibiteurs de SFK peuvent également être utilisés comme traitement anticancéreux.

Le désagrément majeur de la plupart de ces inhibiteurs est leur manque de sélectivité. Par exemple, le pyrazolopyrimidine 1 (PP1) peut également inhiber le CSK, la caséine kinase I, ainsi que les protéines kinases activées par le stress (Bain et al. 2003).

## 5 Chimiothèque

La Chimiothèque Nationale de l'Institut Curie (UMR 176 CNRS, Institut Curie, Paris) a pour mission principale de regrouper les collections de produits de synthèse, de composés naturels et d'extraits naturels existant dans les laboratoires publics français et d'en promouvoir la valorisation scientifique et industrielle.

Dans ce projet de thèse, trois composés appartenant à la famille des *Pyrido[4,3-b]quinoxaline* ont démontré leur capacité à éliminer les blastes leucémiques sans affecter les cellules saines (Saint-Paul et al. 2016). Contrairement aux molécules de chimiothérapie classique, ces molécules ne sont pas des agents intercalants de l'ADN (Nguyen et al. 1995).

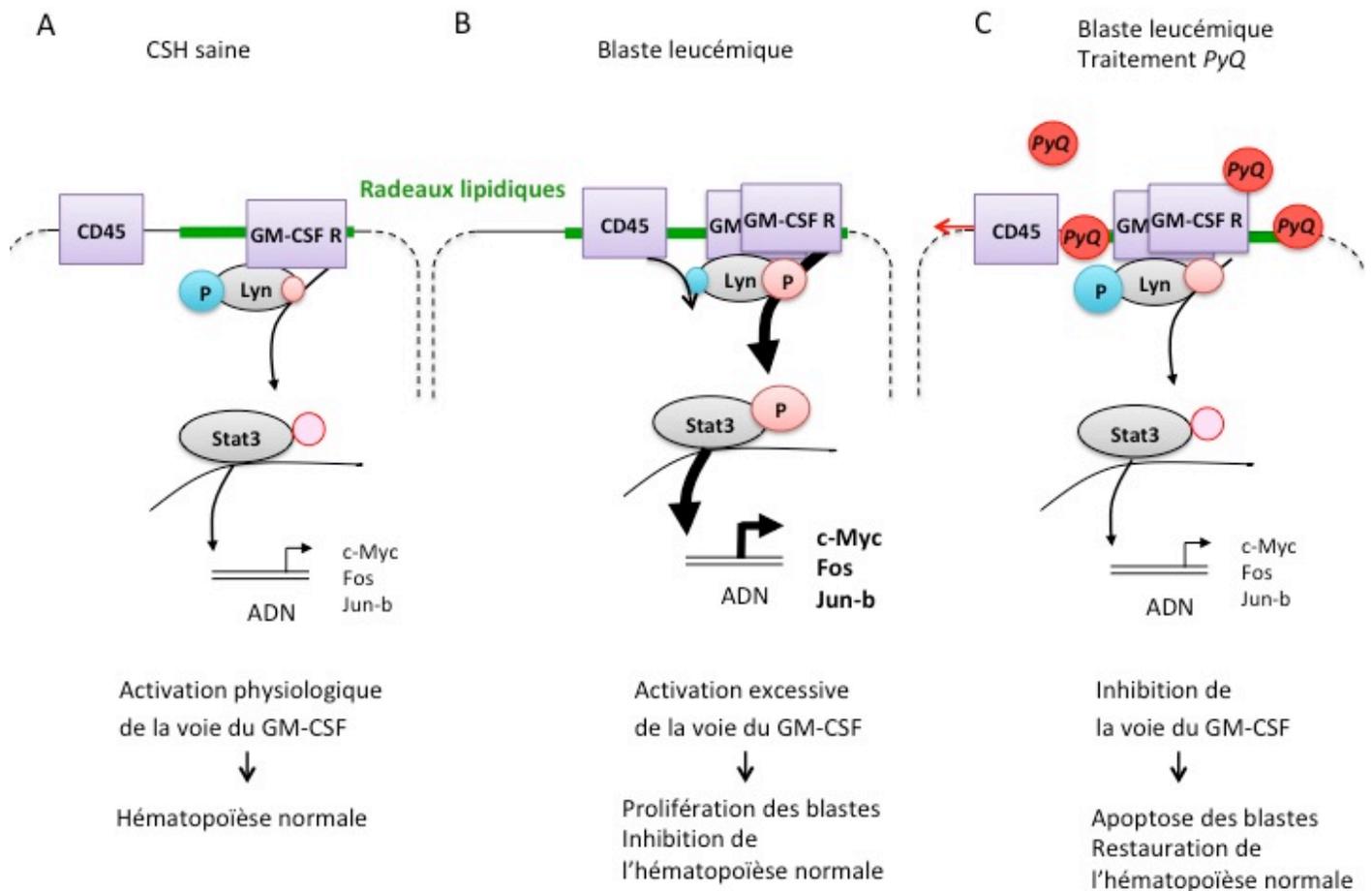


Figure 16 : Pyrido[4,3-b]quinoxaline délocalise le CD45 en dehors des radeaux lipidiques et inhibe la voie du GM-CSF suractivée dans les blasts leucémiques

Il sera indiqué par la suite que ce composé a une forte affinité pour les membranes plasmiques, perturbant les récepteurs membranaires. Plus particulièrement, ce composé provoque la délocalisation de la protéine CD45 phosphatase initialement localisée au niveau des radeaux lipidiques. L'activité du CD45 est par conséquent profondément affectée ; la kinase Lyn se trouve phosphorylée sur son site inhibiteur, conduisant à une altération de la voie du GM-CSF. Ainsi, ce composé bloque la prolifération dépendante de la voie du GM-CSF des cellules leucémiques (Saint-Paul et al. 2016) (Figure 16).

# Résultats

# **Discussion et perspectives**

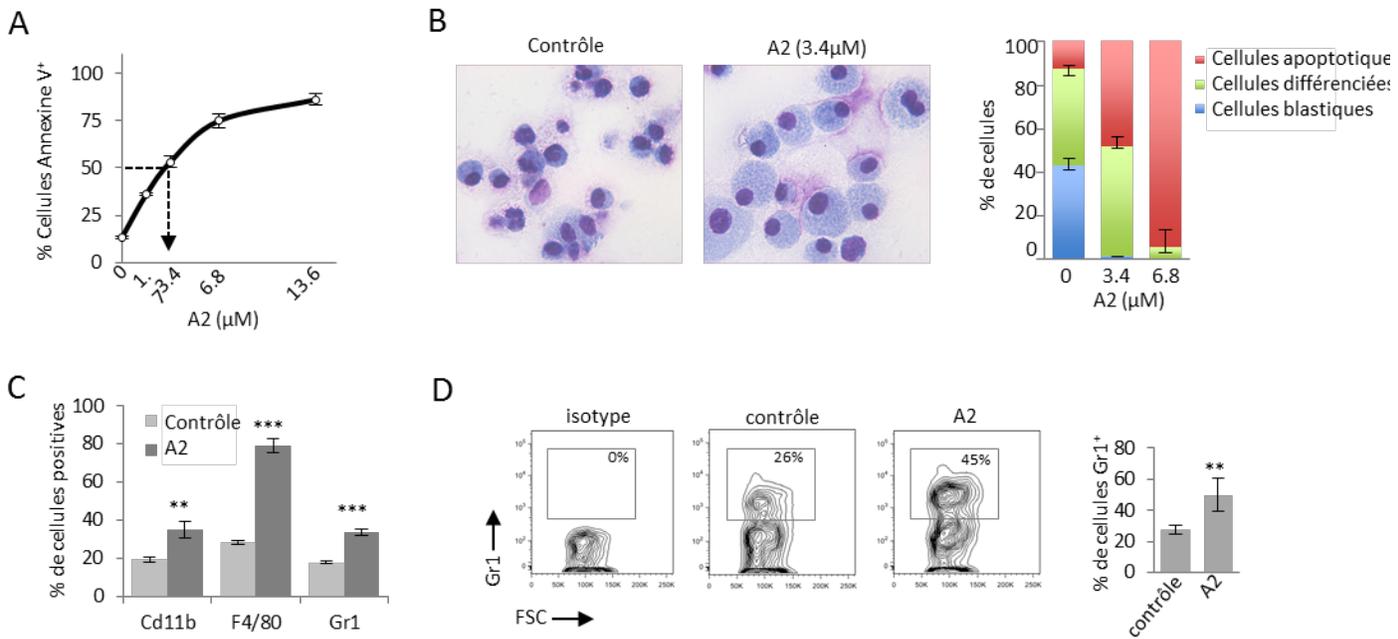
Un nouvel agent de la famille des *Pyrido[4,3-b]quinoxaline* (*PyQ*) ayant une forte affinité pour les membranes plasmiques a donc été caractérisé. Ce composé bloque la prolifération dépendante de la voie du GM-CSF des cellules leucémiques. Le CD45, initialement localisé dans les radeaux lipidiques au sein de la membrane plasmique, est rapidement délocalisé après traitement. L'activité du CD45 est donc affectée ; la kinase Lyn se trouve phosphorylée sur son site inhibiteur (Y507), conduisant à une altération de la voie du GM-CSF. De façon intéressante, le CD45 n'est pas localisé dans les radeaux lipidiques des cellules hématopoïétiques primitives normales et *PyQ* ne présente qu'une faible toxicité sur ces cellules.

Ce travail soulève néanmoins un certain nombre de questions, auxquelles les perspectives apportent un début de réponse.

### ***Pyrido[4,3-b]quinoxaline* induit une différenciation des blastes leucémiques murins**

Nous avons démontré que *PyQ* affecte la prolifération des cellules leucémiques sans impact notable sur l'hématopoïèse saine (Figure 1A de l'article). En effet, *PyQ* induit l'apoptose des cellules LAM HOXA9-MEIS1, à une concentration inhibitrice médiane (IC50) proche de 3,4  $\mu\text{M}$  (Figure 17A).

Ceci soulève la question du devenir des 50% de blastes restants, ne partant pas en apoptose. Une coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) montre que lorsque les blastes leucémiques sont traités à cette concentration pendant trois jours *in vitro*, ils se différencient en cellules ayant une morphologie de macrophages (Figure 17B), ce qui a été confirmé en cytométrie par l'expression accrue de marqueurs spécifiques exprimé par des cellules myéloïdes matures (Gr1 et CD11b) ou le F4/80 spécifiquement exprimés par les macrophages (Figure 17C). Nous avons donc décidé de traiter des souris HOXA9-MEIS1 par deux injections de *PyQ* afin d'évaluer son potentiel de différenciation cellulaire leucémique *in vivo*. Trois jours après le second traitement avec *PyQ*, nous avons confirmé une augmentation de l'expression de Gr1 sur les cellules leucémiques GFP<sup>+</sup> isolées à partir de moelle osseuse de souris traitées avec *PyQ* *in vivo*. Nous avons également observé une perte de cellules c-Kit<sup>+</sup>, ce qui témoigne également d'une différenciation des blastes leucémiques après un traitement *in vivo* (Figure 17D).



**Figure 17 : Pyrido[4,3-b]quinoxaline induit l'apoptose et la différenciation des cellules LAM. (A) et (D) par Ronan Quéré**

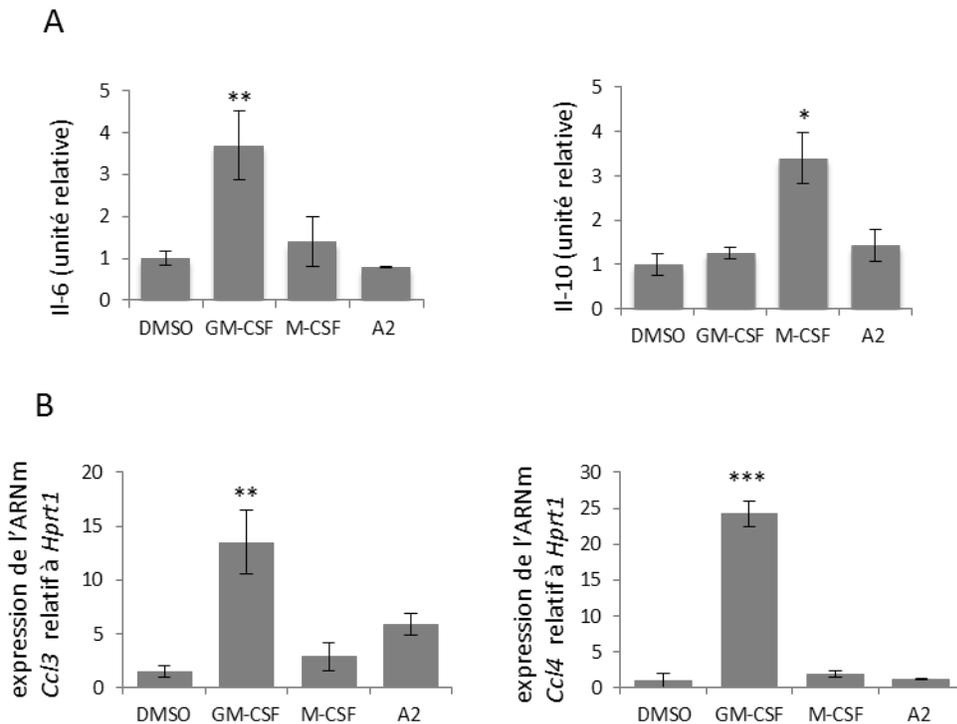
(A) Pourcentage de cellules positives à l'Annexine V, après traitement des cellules LAM HOXA9-MEIS1 avec des concentrations de PyQ variant de 0 à 13,6 μM, pendant 18h, n = 3. (B) coloration au May-Grünwald-Giemsa montrant la morphologie des cellules HOXA9-MEIS1 traitées avec 3,4 μM de PyQ pendant 4 jours, grossissement × 20. Les proportions moyennes de cellules apoptotiques, cellules différenciées et cellules blastiques, 4 jours après un traitement avec PyQ testé à différentes concentrations sont indiquées, n = 3. (C) Pourcentage de cellules Cd11b+, F4/80+ et Gr1+, analysées par cytométrie en flux après traitement des cellules leucémiques HOXA9-MEIS1 avec 3,4 μM de PyQ pendant 4 jours, n = 3 biologiques. (D) Les souris HOXA9-MEIS1 ont reçu deux injections intrapéritonéales de PyQ (3 mg / kg). Après le traitement, les souris ont été sacrifiées et l'expression de Gr1 et c-Kit a été mesurée par cytométrie en flux sur des cellules GFP + isolées de la moelle osseuse, n = 5 souris. Moyenne ± SEM. \*\*, P <0,001, \*\*\*, P <0,0001, mesuré par le test t de Student non apparié.

Il existe deux types de macrophages, les macrophages M1 produisant principalement des cytokines pro-inflammatoires et les macrophages M2 produisant des facteurs anti-inflammatoires. Le GM-CSF et le M-CSF modulent l'état de polarisation des macrophages, avec une orientation des macrophages vers le phénotype M1 par le GM-CSF et M2 par le M-CSF (Vogel et al. 2014). Nous avons traité les cellules HOXA9-MEIS1 avec PyQ à 3,4μM en comparaison au GM-CSF ou au M-CSF à 25ng/mL. Après trois jours de traitement, nous avons utilisé un kit ELISA afin de doser les différentes cytokines produites par nos cellules pour

caractériser le type de macrophage induit par la différenciation des cellules HOXA9-MEIS1 (Figure 18A). Nous avons également quantifié par PCR quantitative en temps réel, le taux de chimiokines produites (Figure 18B). Il est vite apparu que les cellules HOXA9-MEIS1 ne se différenciaient pas en macrophages fonctionnels et ne produisaient pas les cytokines essentielles caractérisant les macrophages.

De plus, l'analyse des lignées cellulaires et des échantillons de patients révèle qu'aucune différenciation ne se produit dans ces types cellulaires.

Nous avons donc conclu qu'un traitement par *PyQ* n'activait pas de voie spécifique à la différenciation des macrophages, mais bloquait la prolifération des blastes leucémiques. La différenciation observée chez les cellules HOXA9-MEIS1 ne serait qu'un effet secondaire à ce blocage de la différenciation.



**Figure 18 : *Pyrido[4,3-b]quinoxaline* n'induit pas la différenciation des cellules de LAM en macrophages fonctionnels**

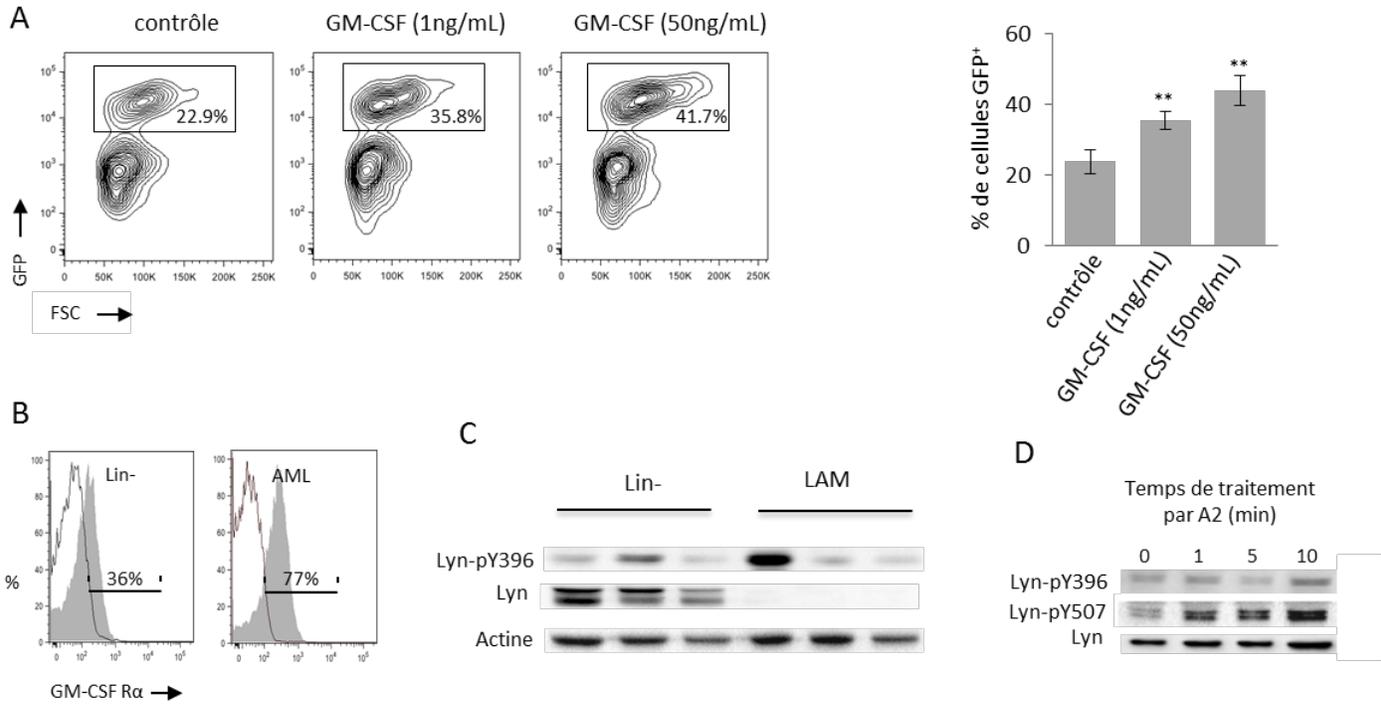
(A ) Quantification par ELISA des cytokines IL-6 et IL-10 sécrétées par les cellules de LAM après 3 jours de traitement par *PyQ*. (B) Quantification par PCR quantitative des chimiokines CCL2 et CCL4 exprimées par les cellules de LAM après 24h de traitement par *PyQ*.

### ***Pyrido[4,3-b]quinoxaline* module seulement une partie de la voie du GM-CSF, suractivée dans les cellules HOXA9-MEIS1**

Le GM-CSF a été décrit comme un facteur de croissance induisant la prolifération cellulaire (Hong 2016b). Il était cependant nécessaire de vérifier l'effet du GM-CSF sur notre modèle cellulaire. La viabilité des cellules HOXA9-MEIS1 a donc été analysée par dosage de la GFP en cytométrie. Après 3 jours de culture *in vitro* en présence de GM-CSF, nous confirmons une expansion des cellules qui confirme que le GM-CSF induit leur prolifération et leur survie (Figure 19A).

Les cellules leucémiques présentent une suractivation de la voie du GM-CSF due à deux événements. Le CD45 est localisé préférentiellement dans les radeaux lipidiques des cellules leucémiques. Lorsqu'il est situé dans les radeaux lipidiques, le CD45 déphosphoryle la tyrosine inactivatrice de Lyn (Y507), activant ainsi la voie du GM-CSF (Figure 16). D'autre part, les cellules leucémiques présentent plus de GM-CSFR à leur surface (Figure 19B), induisant ainsi une forte phosphorylation de la tyrosine activatrice de Lyn (Figure 19C). Ainsi, les cellules blastiques présentent à la fois une sensibilité accrue au GM-CSF due à la forte expression du GM-CSFR $\alpha$ , et une absence de régulation efficace de la voie due à la localisation du CD45 dans les radeaux lipidiques. Ceci engendre une suractivation de la voie du GM-CSF dans les blastes, se traduisant par une survie et une prolifération accrue.

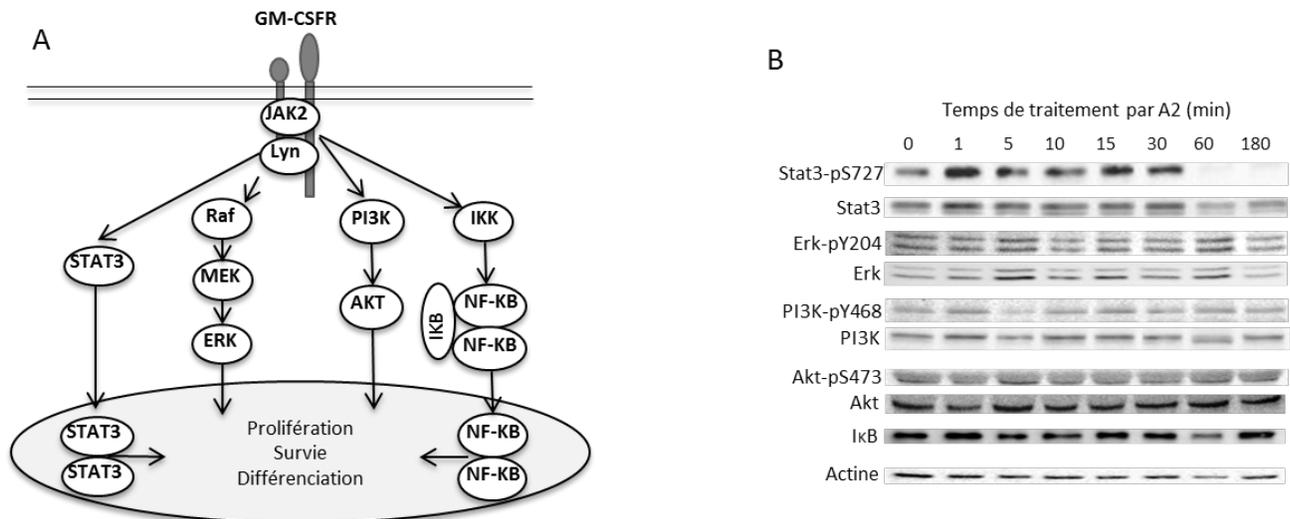
Un traitement par *PyQ* provoque une phosphorylation de la tyrosine inactivatrice de Lyn. En revanche, le traitement n'a aucun effet sur la tyrosine activatrice (Y396) (Figure 19D). Ainsi, l'effet régulateur de *PyQ* sur la voie du GM-CSF semble s'effectuer uniquement via la modulation de la tyrosine inactivatrice de lyn.



**Figure 19 : La voie du GM-CSF induit la prolifération cellulaire et est suractivée dans les cellules leucémiques**

(A) Viabilité cellulaire, analysée par cytométrie en flux après traitement des cellules leucémiques HOXA9-MEIS1 avec du GM-CSF pendant 24h, n = 3. (B) Le GM-CSFR est hautement exprimé à la surface des cellules HOXA9-MEIS1 comparé aux cellules Lin-, comme le montre l'analyse par cytométrie n = 3. (C) La tyrosine activatrice de Lyn (Y396) est hautement phosphorylée dans les cellules HOXA9-MEIS1 comparé aux cellules Lin-, comme le montre le western blotting. (D) Les cellules HOXA9-MEIS1 sont traitées avec *PyQ* (3,4 $\mu$ M) à différents temps. Le WB montre une phosphorylation de la tyrosine inhibitrice de Lyn (Y507) mais pas de la tyrosine activatrice (Y396).

En outre, malgré les nombreuses voies possibles activées par la liaison du GM-CSF à son récepteur (Figure 20A), seule la phosphorylation de Stat3, dépendante de Lyn subit une régulation après le traitement par *PyQ*. Les autres composants de la voie du GM-CSF ne subissent pas de modifications (Figure 20B), ce qui va dans le sens d'une régulation de la voie du GM-CSF par *PyQ* dépendante uniquement de la tyrosine 507.

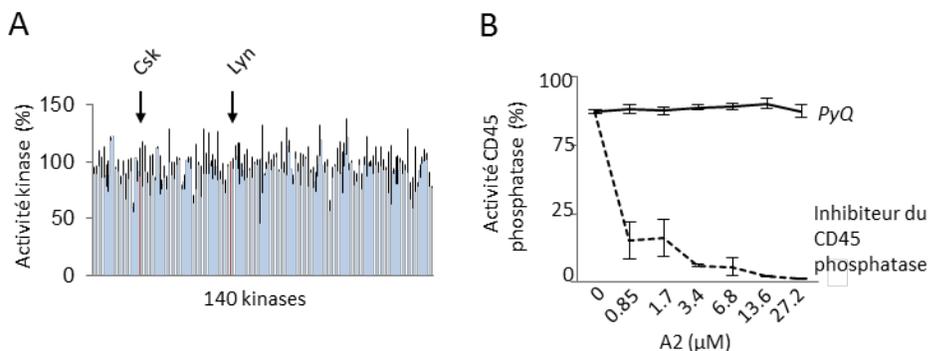


**Figure 20 : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* agit uniquement sur l'activité de Stat3 dans la voie du GM-CSF**

(A) Représentation schématique des différentes voies activées par le GM-CSF, d'après (Reuter, Morgan, and Bergmann 2000; van de Laar and Coffey, et Woltman 2012). (B) Lorsque les cellules HOXA9-MEIS 1 sont traitées avec *PyQ* à 3,4 $\mu$ M, selon une cinétique de temps allant jusqu'à 3h, seul Stat3 se trouve déphosphorylé, comme le montre le WB.

### ***Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* n'agit pas directement sur l'activité kinase de Lyn ou sur l'activité phosphatase du CD45**

Un traitement par *PyQ* induisant une phosphorylation de la tyrosine inactivatrice de Lyn (Y507), la première hypothèse a été que la molécule agissait directement sur l'activité de Lyn ou sur l'une des protéines régulant son activité. Le criblage de 140 kinases nous a informé que *PyQ* ne régule pas directement Lyn ni même l'une de ses kinases régulatrices (Figure 21A). Un dosage de l'activité du CD45 nous indique que *PyQ* n'agit pas non plus directement sur l'activité de la phosphatase du CD45 qui régule le taux de phosphorylation de Lyn (Figure 21B). Ainsi, *PyQ* contrôle l'activité de Lyn d'une autre manière qu'à travers son action directe sur sa phosphorylation ou sur l'activité des protéines kinases ou phosphatases régulatrices de Lyn. *PyQ* ayant une forte affinité pour les lipides de la membrane plasmique, ceci pourrait affecter la fonction des protéines intramembranaires et leurs voies de signalisation.



**Figure 21 : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* n'est pas un inhibiteur de kinases ou de l'activité phosphatase du CD45. (A) par Ronan Quéré**

(A) Représentation graphique de l'activité kinase, pour 140 kinases testées avec *PyQ* (3,4μM). (B) Activité phosphatase du CD45, testée avec différentes doses de *PyQ*, en comparaison avec un inhibiteur connu (R et D systems).

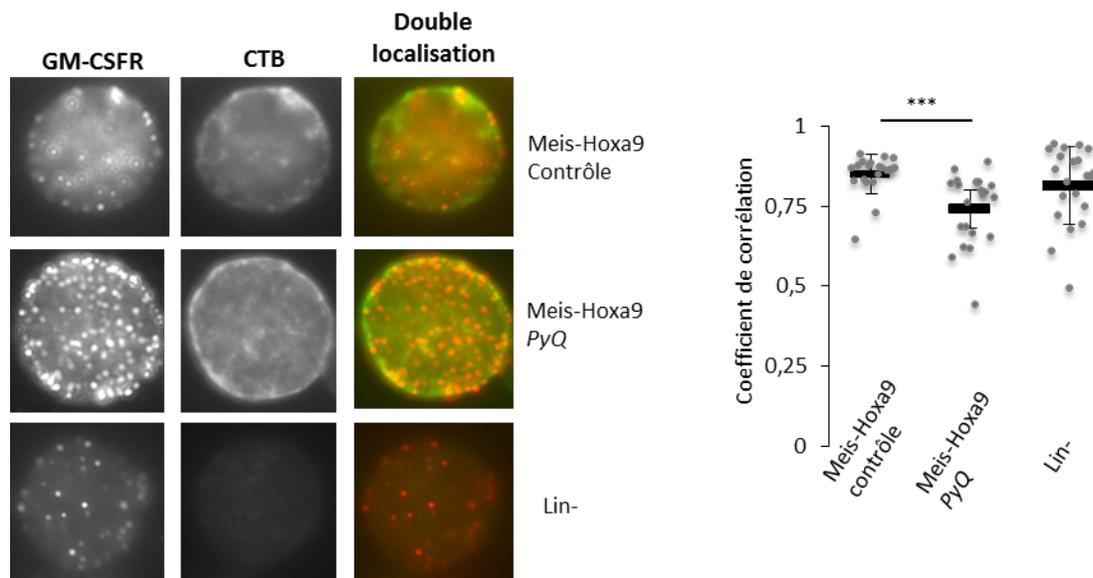
### ***Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* provoque le regroupement du récepteur au GM-CSF en dehors des radeaux lipidiques**

Le CD45 est une protéine dont l'activité tyrosine phosphatase est optimale lorsqu'elle est située dans les radeaux lipidiques. Dans les cellules leucémiques, le CD45 est localisé préférentiellement à leur niveau, ce qui n'est pas le cas des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs sains ou il est localisé essentiellement à l'extérieur. Un traitement des cellules leucémiques par *PyQ* modifie la distribution du CD45 avec un regroupement de la protéine en dehors des radeaux lipidiques. Ainsi, la phosphorylation de la tyrosine inhibitrice de Lyn, placée sous le contrôle du CD45, se trouve rapidement augmentée, ce qui a pour effet d'inhiber la prolifération cellulaire dépendante du GM-CSF (Figure 16).

Néanmoins, un traitement par *PyQ* ne semble pas modifier uniquement la distribution du CD45. Nous avons également observé la localisation du récepteur au GM-CSF, avant et après traitement par *PyQ*. Les cellules HOXA9-MEIS1 en culture dans du SFEM ont été traitées par 3,4 μM de *PyQ* pendant 15 minutes avant d'être marquées par un anti-CTB (*Cholera Toxin Subunit B*) couplé à l'AF488 (Life technologies) et un anti-GM-CSFR, sans perméabilisation cellulaire. L'analyse de l'immunofluorescence a confirmé une colocalisation bien plus importante du GM-CSFR et des radeaux lipidiques dans les cellules MEIS-HOXA9 en comparaison avec les cellules

Lin- (Figure 22). L'analyse de la colocalisation montre que le GM-CSFR, initialement localisé dans les radeaux lipidiques, se trouve partiellement regroupé en dehors des radeaux lipidiques après un traitement par *PyQ* (Figure 22). La valeur p est de 0,00031. La valeur p calculée sur la colocalisation du CD45 et du CTB entre les cellules MEIS1-HOXA9 traitées par 3,4  $\mu$ M de *PyQ* pendant 15 minutes, comparée aux cellules MEIS1-HOXA9 non traitées est de 0,00024. Dans les deux cas, la délocalisation de la protéine analysée en dehors des radeaux lipidiques est significative, bien que le GM-CSFR semble moins touché que le CD45. Il est à noter également que le GM-CSFR est localisé au niveau des radeaux lipidiques des cellules Lin-, contrairement au CD45, ce qui ne le place pas comme cible thérapeutique potentielle de *PyQ*.

Ceci suggère que l'affinité de *PyQ* pour la membrane plasmique pourrait perturber la fonction de nombreuses protéines intramembranaires et leurs voies de signalisation.



**Figure 22 : *Pyrido[4,3-b]quinoxaline* délocalise le GM-CSFR en dehors des radeaux lipidiques**

Les radeaux lipidiques sont marqués par un anti-CTB (en vert) et le récepteur au GM-CSF par un anti-GM-CSFR (en rouge). Au niveau de cellules HOXA9-MEIS1 non traitées (contrôle), le GM-CSFR colocalise avec les radeaux lipidiques. Lorsque les cellules HOXA9-MEIS1 sont traitées par *PyQ* (3,4 $\mu$ M), pendant 10 min, le GM-CSFR est partiellement regroupé en dehors des radeaux lipidiques. Pour les cellules Lin- non traitées, le GM-CSFR est partiellement regroupé en dehors des radeaux lipidiques. Les scores de colocalisation entre le GM-CSFR et le CTB ont été calculés (n > 30 cellules) et représentés sur le graphique de droite.

### ***Pyrido[4,3-b]quinoxaline, un traitement potentiel des leucémies aiguës lymphoblastiques***

La voie du GM-CSF est l'une des voies principales dérégulées lors de la transformation leucémique de notre modèle d'étude. Ainsi, *PyQ* se place comme un inhibiteur potentiel de la voie du GM-CSF dans le traitement des LAM.

Cependant, dans d'autres modèles, d'autres voies sont perturbées. Ainsi, une autre doctorante de l'équipe, Anne Buffière, également sous la supervision de Ronan Quéré, a évalué l'efficacité de *PyQ* sur les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T). En collaboration avec l'équipe de Françoise Pflumio (UMR 967 Inserm/CEA, Fontenay-aux-Roses) des cellules de patients ont été amplifiées *in vivo* par xéno-transplantation dans des souris immunodéficientes NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$  (NSG). L'effet de la molécule a été étudié *in vivo*, mais aussi *ex vivo* sur les cellules de rate et de moelle des souris malades. Ils ont ainsi démontré que *PyQ* induit l'apoptose des cellules LAL-T. Le CD45 étant localisé en dehors des radeaux lipidiques dans les cellules de LAL-T, ils ont recherché le mécanisme d'action impliqué. La voie de l'interleukine 7 (IL-7) est une voie essentielle à la prolifération des lymphocytes T et une suractivation de cette voie semble être retrouvée dans les LAL-T. L'activité du récepteur à l'IL-7 (CD127) est optimale lorsqu'il est localisé dans les radeaux lipidiques, induisant ainsi la phosphorylation du facteur de transcription STAT5.

Anne Buffière et Ronan Quéré ont mis en évidence que le CD127 était colocalisé dans les radeaux lipidiques des cellules de LAL-T et qu'un traitement par *PyQ* provoquait l'exclusion du CD127. Cette délocalisation du CD127 inhibe la voie signalétique de l'IL-7 et les signaux de prolifération qui en découlent.

L'hypothèse selon laquelle l'affinité de *PyQ* pour la membrane plasmique perturbe la fonction de nombreuses protéines intramembranaires et leurs voies de signalisation est donc confirmée. En effet, dans le modèle de cellules LAM, *PyQ* provoque l'exclusion du CD45 en dehors des radeaux lipidiques, affectant ainsi la voie du GM-CSF. Concernant les cellules LAL T, *PyQ* perturbe la localisation du CD127, inhibant donc la voie de l'IL-7. Une étude approfondie des effets secondaires induits par *PyQ* devra donc être menée.

### **Effets secondaires potentiels de *Pyrido[4,3-b]quinoxaline***

L'un des aspects des plus importants restant en suspens correspond aux effets secondaires potentiels que pourrait causer un traitement par *PyQ* sur l'hématopoïèse saine, le microenvironnement médullaire mais également sur l'ensemble des organes.

Nous avons testé une gamme de concentration de *PyQ* sur des lignées cellulaires et montré que les cellules hématopoïétiques humaines sont plus sensibles que les cellules non hématopoïétiques. De plus, lorsque nous mettons les cellules HOXA9-MEIS1 en co-culture avec les cellules murines stromales de la lignée MS5, nous avons remarqué que, lors d'un traitement, les cellules MS5 étaient bien moins affectées par la molécule que les cellules leucémiques. Ceci suggère que l'injection de *PyQ* n'affectera probablement pas le microenvironnement médullaire.

Néanmoins, des tests portant sur la toxicité et les effets secondaires éventuels de *PyQ* devront être menés. Ainsi, nous avons démontré que *PyQ* a une forte affinité pour les membranes plasmiques. *PyQ* n'est donc pas une molécule spécifique, ce qui pourrait limiter son utilisation. En effet, de par sa non spécificité, *PyQ* pourrait affecter l'activité de nombreux récepteurs et leurs voies de signalisation et donc perturber d'éventuelles fonctions biologiques.

A l'heure actuelle, *PyQ* est administrée aux souris par deux injections intra-péritonéales à 3mg/kg, à 3 jours d'intervalle. Il faudra dans un premier temps établir le profil toxicologique de *PyQ* par des analyses de pharmacocinétique et de pharmacodynamique.

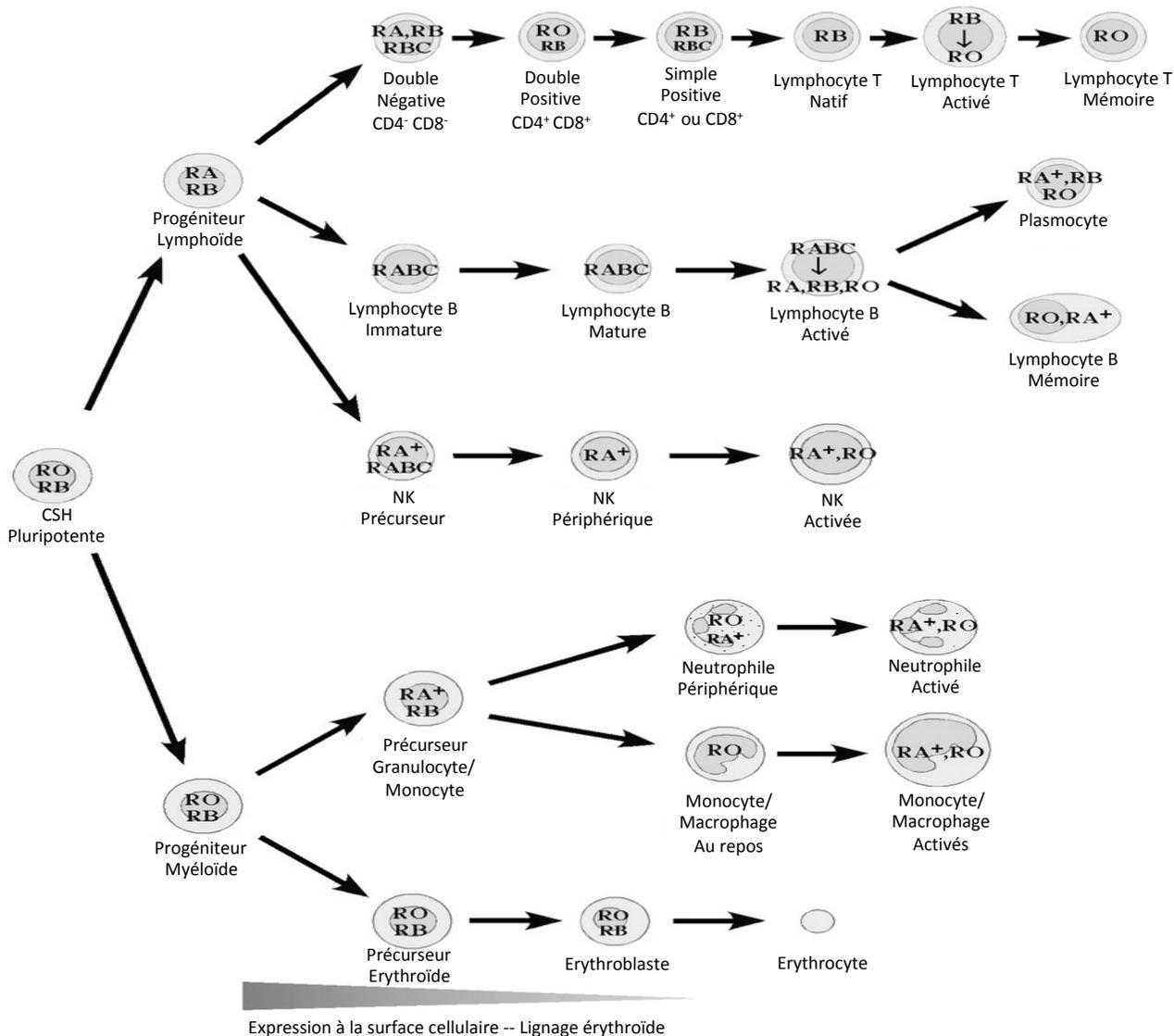
### **La localisation membranaire du CD45 est fonction de ses différentes isoformes**

Les radeaux lipidiques jouent donc un rôle majeur dans la transduction des signaux et contribuent à la modulation des voies de signalisation dans l'hématopoïèse. Leur perturbation peut provoquer des troubles importants parmi lesquels le développement de leucémies. Ainsi, la localisation du CD45 a une importance capitale, puisque, situé dans les radeaux lipidiques, le CD45 déphosphoryle la tyrosine inactivatrice de lyn et soutient ainsi la prolifération cellulaire dépendante du GM-CSF. Lors de la transformation oncogénique, une colocalisation du CD45 au niveau des radeaux lipidiques est observée alors qu'il est situé à l'extérieur dans les cellules saines.

L'épissage alternatif et la glycosylation des différents exons génèrent plusieurs isoformes du CD45 qui semblent avoir une importance déterminante dans sa localisation. Il est probable que la glycosylation du domaine extracellulaire modifie la capacité de translocation du CD45 dans les radeaux lipidiques.

L'équipe de Kawano a montré qu'une stimulation cellulaire avec de l'IL-6 induit la translocation du CD45 dans les radeaux lipidiques d'une manière dépendante des isoformes. Le CD45RO et le CD45RB se regroupent à leur niveau en réponse à l'IL-6, mais pas le CD45RA qui en reste exclus. D'une manière générale, la plus petite isoforme CD45RO transloque plus rapidement que l'isoforme de taille intermédiaire CD45RB, alors que celle de plus grande taille CD45RA n'est pas transloquée dans les radeaux lipidiques. Dans cette étude menée sur des cellules de moelle osseuse de patients atteints d'un myélome, ou de donneurs sains, le CD45 présent dans les radeaux lipidiques agit en tant que régulateur positif de la prolifération dépendante de la voie de l'IL-6. En effet, le CD45 se retrouve à proximité du récepteur à l'IL-6 et de Lyn, localisé dans les radeaux lipidiques, et agit en déphosphorylant la tyrosine inhibitrice de Lyn. Il s'avère que le CD45RO est exprimé dans les cellules de myélome mais pas dans les cellules normales, donnant ainsi aux cellules de myélome une plus grande capacité de réponse à l'IL-6 et donc un avantage prolifératif (Li et al. 2005).

Au cours de l'hématopoïèse normale, le domaine extracellulaire du CD45 est exprimé sous différentes isoformes, en fonction du type cellulaire, du stade de développement et de l'état d'activation de la cellule (Figure 24) ce qui conforte l'idée que les différentes isoformes ont une importance fonctionnelle (Craig et al. 1994; Hermiston, Xu, and Weiss 2003).

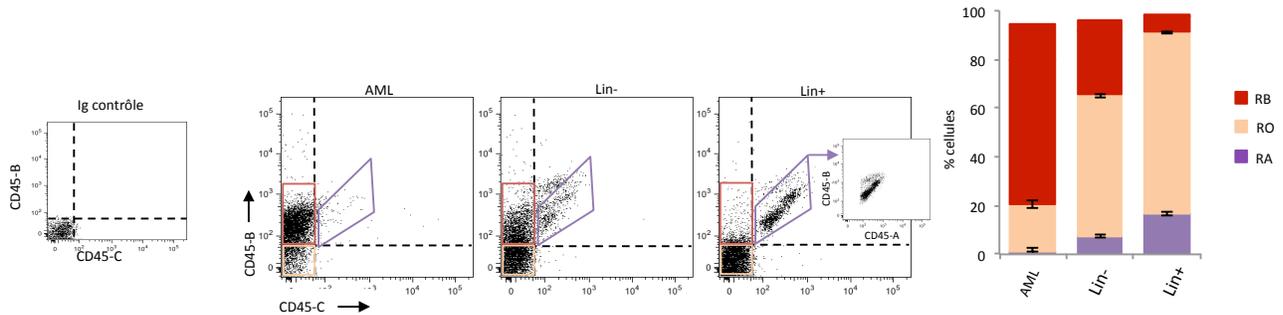


**Figure 24 : Modèles d'expression des isoformes du CD45 à la surface cellulaire, d'après Hermiston, Xu, and Weiss 2003.**

Seules les isoformes prédominantes sont représentées. Les isoformes moins exprimées sont désignées par une taille de police plus petite. Les triangles représentent une expression croissante de la protéine au cours du développement des lignées T, B et myéloïdes et une diminution de l'expression au cours de la différenciation érythroïde, à l'exception des plasmocytes, qui présentent une diminution de l'expression totale du CD45.

Nous avons quantifié l'expression des différentes isoformes à la surface des cellules MEIS-HOXA9 et des cellules murines non transformées Lin<sup>-</sup> et Lin<sup>+</sup>. Les cellules leucémiques

expriment une majorité de CD45RB alors que les cellules Lin<sup>-</sup> expriment essentiellement le CD45RO (Figure 23). En l'absence de stimulation extérieure, le CD45RO n'est pas colocalisé avec les radeaux lipidiques, contrairement au CD45RB dont une partie reste à leur niveau (Li et al. 2005). Ceci pourrait en partie expliquer pourquoi nous observons une colocalisation du CD45 et du CTB dans les cellules MEIS-HOXA9 que nous ne retrouvons pas dans les CSH saines.



**Figure 23 : Les cellules HOXA9-MEIS1 expriment une majorité de CD45RB. Par Ronan Quéré**

L'expression des différentes isoformes du CD45 à la surface cellulaire des cellules HOXA9-MEIS1, Lin<sup>-</sup> et Lin<sup>+</sup> est quantifiée par cytométrie en flux. n = 3.

### Le CD45 utilisé comme marqueur diagnostique

En partant de ce principe, le CD45 pourrait servir de marqueur diagnostique des leucémies. En 1993, l'équipe de Yamaguchi a étudié l'expression des isoformes CD45 RA et RO, par immunofluorescence, sur des échantillons provenant de 78 patients atteints de LAM et ont défini quatre phénotypes distincts : CD45 RA<sup>+</sup>/RO<sup>-</sup>, RA<sup>-</sup>/RO<sup>+</sup>, mixte, et CD45 RA<sup>-</sup>/RO<sup>-</sup>. Les LAM1, LAM2 et LAM3 présentent essentiellement le type CD45 RA<sup>+</sup>/RO<sup>-</sup>, bien qu'un rare sous-type de LAM1 soit de phénotype RA<sup>-</sup>/RO<sup>+</sup>. Les LAM4 sont RA<sup>+</sup> ou RO<sup>+</sup> tandis que la LAM5 est RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup>. L'expression du CD45RO dans des cellules de patients atteints de LAM2, LAM4 ou LAM5 est associée à des blastes matures dérivés de monocytes ou de granulocytes. Le CD45 étant une protéine tyrosine phosphatase associée à des tyrosine kinases, il a été supposé que le statut fonctionnel et le stade de différenciation des lignées granulo-monocytaires déterminaient le type de tyrosine kinase opérant et donc les isoformes CD45 exprimées (Kawano et al. 1993).

De même, en 1999, une autre équipe a étudié l'expression des isoformes RO et RA, par cytométrie en flux, des cellules de 91 patients atteints de LAM (Miyachi et al. 1999). La comparaison des différentes isoformes et des sous-types de LAM, classées selon le type FAB

confirmèrent en partie l'étude précédente. Ainsi, leur analyse montre une expression du CD45RA dans les LAM0, LAM1, LAM2 et, plus faiblement, dans la LAM3, alors que le CD45RO est absent.

Lorsque les blastes de LAM3 sont traités avec de l'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA), l'expression du CD45RO augmente. Les LAM4 et LAM5 expriment le CD45RA ou le CD45RO, ou, dans de rares cas, les deux. Lorsque les LAM5 sont subdivisées, selon leurs stades de différenciation en LAM monocytaire indifférenciée (LAM5a) et différenciée (LAM5b), l'expression du CD45RA est observée uniquement dans les LAM5a et le CD45RO uniquement dans les LAM5b (Figure 25). Ces résultats suggèrent que l'expression des isoformes du CD45 dans les LAM caractérise les stades de différenciation dans les lignées myélo-monocytaires et est spécifique de chaque sous-type de LAM. L'évaluation de l'expression des isoformes semble donc fournir un aperçu des caractéristiques biologiques de chaque sous-type de LAM (Miyachi et al. 1999).

Sous- types de LAM, classées selon le type FAB	Expression membranaire des isoformes du CD45
LAM0	RA+ RO-
LAM1	RA+ RO-
LAM2	RA+ RO-
LAM3	RA+ ou RO+
LAM4	RA+ ou RO+
LAM5a	RA+
LAM5b	RO+

**Figure 25 : Expression membranaire du CD45 RA et CD45 RO en fonction des sous-types de LAM selon le classement FAB.** D'après (Kawano et al. 1993 et Miyachi et al.)

### **Potentialiser les effets de *Pyrido[4,3-b]quinoxaline***

Actuellement, *PyQ* est administrée seul aux souris, à raison de deux injections intrapéritonéales à 3mg/kg, à 3 jours d'intervalle. Il serait intéressant d'analyser l'effet combinatoire de *PyQ* avec la Doxorubicine utilisée en chimiothérapie. En effet, les effets engendrés par deux molécules sont parfois amplifiés. Ainsi, dans le cadre du traitement des leucémies aiguës promyélocytaires (LAM3), la combinaison d'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA) et d'Arsenic

(trioxyde d'arsenic) à la chimiothérapie a été démontrée comme améliorant considérablement l'effet d'une chimiothérapie seule (Lo-Coco, Cicconi, and Breccia 2016).

Il serait également important de synthétiser des analogues de *PyQ*, afin de rechercher une molécule plus efficace.

## **Conclusion**

Cette étude met donc en évidence l'importance de la localisation des protéines intramembranaires et l'implication des radeaux lipidiques dans le développement des leucémies. Avec la découverte de *PyQ*, nous présentons une nouvelle stratégie dans le développement des LAM. En effet, *PyQ* inhibe la prolifération dépendante de la voie du GM-CSF, suractivée dans les cellules de LAM par délocalisation du CD45 en dehors des radeaux lipidiques.

Ainsi, *PyQ* se place comme une molécule d'intérêt dans le cadre de la mise en place d'un nouveau traitement potentiel des leucémies. En élargissant les perspectives, *PyQ* pourrait également cibler d'autres types de cellules cancéreuses ou bien avoir une utilité thérapeutique dans d'autres pathologies telles que les maladies auto-immunes. En effet, sa haute affinité pour les membranes plasmiques et sa capacité à perturber la fonction des protéines intramembranaires et leurs voies de signalisation pourrait potentiellement inhiber d'autres voies de signalisation suractivées dans différentes pathologies.

Cependant, cette faculté ne présente pas que des bénéfices. Ainsi, un traitement par *PyQ* provoque également la délocalisation du récepteur au GM-CSF en dehors des radeaux lipidiques. *PyQ* pourrait donc moduler d'autres voies de signalisation et provoquer des troubles physiologiques inattendus. A l'heure actuelle, les travaux menés portent uniquement sur la compréhension des mécanismes de signalisation mis en jeu par le traitement par *PyQ* mais il sera essentiel par la suite d'étudier ses éventuels effets secondaires.

Enfin, cette étude permet également d'envisager l'utilisation de la protéine phosphatase CD45 en tant que nouveau marqueur diagnostique des leucémies, puisque l'expression de ses différentes isoformes et sa localisation membranaire semblent être modifiées lors de la transformation oncogénique.

# **Références bibliographiques**

- Abramovich, Carolina, and R. Keith Humphries  
2005 Hox Regulation of Normal and Leukemic Hematopoietic Stem Cells. *Current Opinion in Hematology* 12(3): 210–216.
- Adolfsson, Jörgen, Ole Johan Borge, David Bryder, et al.  
2001 Upregulation of Flt3 Expression within the Bone Marrow Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> Stem Cell Compartment Is Accompanied by Loss of Self-Renewal Capacity. *Immunity* 15(4): 659–669.
- Ahmed, S. N., D. A. Brown, and E. London  
1997 On the Origin of Sphingolipid/Cholesterol-Rich Detergent-Insoluble Cell Membranes: Physiological Concentrations of Cholesterol and Sphingolipid Induce Formation of a Detergent-Insoluble, Liquid-Ordered Lipid Phase in Model Membranes. *Biochemistry* 36(36): 10944–10953.
- Akashi, Koichi, David Traver, Toshihiro Miyamoto, and Irving L. Weissman  
2000 A Clonogenic Common Myeloid Progenitor That Gives Rise to All Myeloid Lineages. *Nature* 404(6774): 193–197.
- Alder, Jonathan K., Robert W. Georgantas, Richard L. Hildreth, et al.  
2008 Kruppel-like Factor 4 Is Essential for Inflammatory Monocyte Differentiation in Vivo. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 180(8): 5645–5652.
- Apostolov, Apostol, Isma Litim-Mecheri, Attila Oravecz, et al.  
2016 Sumoylation Inhibits the Growth Suppressive Properties of Ikaros. *PloS One* 11(6): e0157767.
- Arber, Daniel A., Attilio Orazi, Robert Hasserjian, et al.  
2016 The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *Blood* 127(20): 2391–2405.
- Arranz, Lorena, Antonio Herrera-Merchan, Jose Manuel Ligos, et al.  
2012 Bmi1 Is Critical to Prevent Ikaros-Mediated Lymphoid Priming in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Cycle* (Georgetown, Tex.) 11(1): 65–78.
- Bain, Jenny, Hilary McLauchlan, Matthew Elliott, and Philip Cohen  
2003 The Specificities of Protein Kinase Inhibitors: An Update. *The Biochemical Journal* 371(Pt 1): 199–204.
- Becerra, José, Leonor Santos-Ruiz, José A. Andrades, and Manuel Marí-Beffa  
2010 The Stem Cell Niche Should Be a Key Issue for Cell Therapy in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports* 7(2): 248–255.
- Bilwes, A. M., J. den Hertog, T. Hunter, and J. P. Noel  
1996 Structural Basis for Inhibition of Receptor Protein-Tyrosine Phosphatase-Alpha by

Dimerization. *Nature* 382(6591): 555–559.

Bjorge, J. D., A. Jakymiw, and D. J. Fujita

2000 Selected Glimpses into the Activation and Function of Src Kinase. *Oncogene* 19(49): 5620–5635.

Boggon, Titus J., and Michael J. Eck

2004 Structure and Regulation of Src Family Kinases. *Oncogene* 23(48): 7918–7927.

Bougeret, C., S. Jiang, I. Keydar, and H. Avraham

2001 Functional Analysis of Csk and CHK Kinases in Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276(36): 33711–33720.

Bourguignon, L. Y., S. J. Suchard, M. L. Nagpal, and J. R. Glenney

1985 A T-Lymphoma Transmembrane Glycoprotein (gp180) Is Linked to the Cytoskeletal Protein, Fodrin. *The Journal of Cell Biology* 101(2): 477–487.

Bowie, Michelle B., Kristen D. McKnight, David G. Kent, et al.

2006 Hematopoietic Stem Cells Proliferate until after Birth and Show a Reversible Phase-Specific Engraftment Defect. *Journal of Clinical Investigation* 116(10): 2808–2816.

Bretscher, M. S.

1973 Membrane Structure: Some General Principles. *Science (New York, N.Y.)* 181(4100): 622–629.

Brown, D. A., and J. K. Rose

1992 Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface. *Cell* 68(3): 533–544.

Brown, Deborah A.

2006 Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signals. *Physiology (Bethesda, Md.)* 21: 430–439.

Brown, M. T., and J. A. Cooper

1996 Regulation, Substrates and Functions of Src. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1287(2–3): 121–149.

Bryder, David, Derrick J. Rossi, and Irving L. Weissman

2006 Hematopoietic Stem Cells. *The American Journal of Pathology* 169(2): 338–346.

Budel, L. M., I. P. Touw, R. Delwel, S. C. Clark, and B. Löwenberg

1989 Interleukin-3 and Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor Receptors on Human Acute Myelocytic Leukemia Cells and Relationship to the Proliferative Response. *Blood* 74(2): 565–571.

Burgess, A. W., J. Camakaris, and D. Metcalf

1977 Purification and Properties of Colony-Stimulating Factor from Mouse Lung-

Conditioned Medium. *The Journal of Biological Chemistry* 252(6): 1998–2003.

Carr, P. D., S. E. Gustin, A. P. Church, et al.

2001 Structure of the Complete Extracellular Domain of the Common Beta Subunit of the Human GM-CSF, IL-3, and IL-5 Receptors Reveals a Novel Dimer Configuration. *Cell* 104(2): 291–300.

Chatterjee, S., and S. Mayor

2001 The GPI-Anchor and Protein Sorting. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 58(14): 1969–1987.

Chaturvedi, P., S. Sharma, and E. P. Reddy

1997 Abrogation of Interleukin-3 Dependence of Myeloid Cells by the v-Src Oncogene Requires SH2 and SH3 Domains Which Specify Activation of STATs. *Molecular and Cellular Biology* 17(6): 3295–3304.

Chen, H. M., P. Zhang, M. T. Voso, et al.

1995 Neutrophils and Monocytes Express High Levels of PU.1 (Spi-1) but Not Spi-B. *Blood* 85(10): 2918–2928.

Chidiac, P.

1998 Rethinking Receptor-G Protein-Effector Interactions. *Biochemical Pharmacology* 55(5): 549–556.

Chong, Yuh-Ping, Kim Kui Ia, Terrence D. Mulhern, and Heung-Chin Cheng

2005 Endogenous and Synthetic Inhibitors of the Src-Family Protein Tyrosine Kinases. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1754(1–2): 210–220.

Chong, Yuh-Ping, Terrence D. Mulhern, and Heung-Chin Cheng

2005 C-Terminal Src Kinase (CSK) and CSK-Homologous Kinase (CHK)—endogenous Negative Regulators of Src-Family Protein Kinases. *Growth Factors* 23(3): 233–244.

Chong, Yuh-Ping, Terrence D. Mulhern, Hong-Jian Zhu, et al.

2004 A Novel Non-Catalytic Mechanism Employed by the C-Terminal Src-Homologous Kinase to Inhibit Src-Family Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 279(20): 20752–20766.

Coffer, P. J., L. Koenderman, and R. P. de Groot

2000 The Role of STATs in Myeloid Differentiation and Leukemia. *Oncogene* 19(21): 2511–2522.

Craig, W., S. Poppema, M. T. Little, W. Dragowska, and P. M. Lansdorp

1994 CD45 Isoform Expression on Human Haemopoietic Cells at Different Stages of Development. *British Journal of Haematology* 88(1): 24–30.

Daigle, Isabelle, Shida Yousefi, Marco Colonna, Douglas R. Green, and Hans-Uwe Simon

2002 Death Receptors Bind SHP-1 and Block Cytokine-Induced Anti-Apoptotic Signaling

in Neutrophils. *Nature Medicine* 8(1): 61–67.

Danielli, James Frederic, and Hugh Davson

1935 A Contribution to the Theory of Permeability of Thin Films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5(4): 495–508.

Davies, A. A., N. M. Wigglesworth, D. Allan, R. J. Owens, and M. J. Crumpton

1984 Nonidet P-40 Extraction of Lymphocyte Plasma Membrane. Characterization of the Insoluble Residue. *The Biochemical Journal* 219(1): 301–308.

Desai, D. M., J. Sap, J. Schlessinger, and A. Weiss

1993 Ligand-Mediated Negative Regulation of a Chimeric Transmembrane Receptor Tyrosine Phosphatase. *Cell* 73(3): 541–554.

Desai, D. M., J. Sap, O. Silvennoinen, J. Schlessinger, and A. Weiss

1994 The Catalytic Activity of the CD45 Membrane-Proximal Phosphatase Domain Is Required for TCR Signaling and Regulation. *The EMBO Journal* 13(17): 4002–4010.

Devaux, Philippe F., and Roger Morris

2004 Transmembrane Asymmetry and Lateral Domains in Biological Membranes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5(4): 241–246.

Dornan, Saffron, Zsolt Sebestyen, John Gamble, et al.

2002 Differential Association of CD45 Isoforms with CD4 and CD8 Regulates the Actions of Specific Pools of p56lck Tyrosine Kinase in T Cell Antigen Receptor Signal Transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 277(3): 1912–1918.

Farber, D. L., O. Acuto, and K. Bottomly

1997 Differential T Cell Receptor-Mediated Signaling in Naive and Memory CD4 T Cells. *European Journal of Immunology* 27(8): 2094–2101.

Felberg, J., and P. Johnson

1998 Characterization of Recombinant CD45 Cytoplasmic Domain Proteins. Evidence for Intramolecular and Intermolecular Interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 273(28): 17839–17845.

Field, K. A., D. Holowka, and B. Baird

1995 Fc Epsilon RI-Mediated Recruitment of p53/56lyn to Detergent-Resistant Membrane Domains Accompanies Cellular Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(20): 9201–9205.

Frankel, Arthur E., Bayard L. Powell, Philip D. Hall, L. Douglas Case, and Robert J. Kreitman

2002 Phase I Trial of a Novel Diphtheria Toxin/Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Fusion Protein (DT388GMCSF) for Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8(5): 1004–1013.

- Fukuhara, Kenjiro, Meinoshin Okumura, Hiroyuki Shiono, et al.  
2002 A Study on CD45 Isoform Expression during T-Cell Development and Selection Events in the Human Thymus. *Human Immunology* 63(5): 394–404.
- Furukawa, K., Y. Funakoshi, M. Autero, et al.  
1998 Structural Study of the O-Linked Sugar Chains of Human Leukocyte Tyrosine Phosphatase CD45. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 251(1–2): 288–294.
- Gilliland, D. G.  
2001 Hematologic Malignancies. *Current Opinion in Hematology* 8(4): 189–191.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, et al.  
1999 Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *Science* 286(5439): 531–537.
- Guan, Yinghui, Brigitte Gerhard, and Donna E. Hogge  
2003 Detection, Isolation, and Stimulation of Quiescent Primitive Leukemic Progenitor Cells from Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* 101(8): 3142–3149.
- Guarnerio, Jlenia, Marco Bezzi, Jong Cheol Jeong, et al.  
2016 Oncogenic Role of Fusion-circRNAs Derived from Cancer-Associated Chromosomal Translocations. *Cell* 165(2): 289–302.
- Hagmann, J., and P. H. Fishman  
1982 Detergent Extraction of Cholera Toxin and Gangliosides from Cultured Cells and Isolated Membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 720(2): 181–187.
- Hall, P. D., R. J. Kreitman, M. C. Willingham, and A. E. Frankel  
1998 Toxicology and Pharmacokinetics of DT388-GM-CSF, a Fusion Toxin Consisting of a Truncated Diphtheria Toxin (DT388) Linked to Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) in C57BL/6 Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 150(1): 91–97.
- Hall, S. R., B. M. Heffernan, N. T. Thompson, and W. C. Rowan  
1999 CD4+ CD45RA+ and CD4+ CD45RO+ T Cells Differ in Their TCR-Associated Signaling Responses. *European Journal of Immunology* 29(7): 2098–2106.
- Hata, A., H. Sabe, T. Kurosaki, M. Takata, and H. Hanafusa  
1994 Functional Analysis of Csk in Signal Transduction through the B-Cell Antigen Receptor. *Molecular and Cellular Biology* 14(11): 7306–7313.
- Hayami-Noumi, K., T. Tsuchiya, Y. Moriyama, and T. Noumi  
2000 Intra- and Intermolecular Interactions of the Catalytic Domains of Human CD45 Protein Tyrosine Phosphatase. *FEBS Letters* 468(1): 68–72.
- Hayashida, K., T. Kitamura, D. M. Gorman, et al.  
1990 Molecular Cloning of a Second Subunit of the Receptor for Human Granulocyte-

Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF): Reconstitution of a High-Affinity GM-CSF Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(24): 9655–9659.

Hegde, S. P., J. Zhao, R. A. Ashmun, and L. H. Shapiro  
1999 C-Maf Induces Monocytic Differentiation and Apoptosis in Bipotent Myeloid Progenitors. *Blood* 94(5): 1578–1589.

Hercus, Timothy R., Daniel Thomas, Mark A. Guthridge, et al.  
2009 The Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor: Linking Its Structure to Cell Signaling and Its Role in Disease. *Blood* 114(7): 1289–1298.

Hermiston, Michelle L., Zheng Xu, and Arthur Weiss  
2003 CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annual Review of Immunology* 21: 107–137.

Hibbs, Margaret L., and Kenneth W. Harder  
2006 The Duplicitous Nature of the Lyn Tyrosine Kinase in Growth Factor Signaling. *Growth Factors* 24(2): 137–149.

Hoessli, D. C., S. Ilangumaran, A. Soltermann, et al.  
2000 Signaling through Sphingolipid Microdomains of the Plasma Membrane: The Concept of Signaling Platform. *Glycoconjugate Journal* 17(3–4): 191–197.

Hoessli, D. C., and E. Rungger-Brändle  
1983 Isolation of Plasma Membrane Domains from Murine T Lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(2): 439–443.

Hong, In-Sun  
2016a Stimulatory versus Suppressive Effects of GM-CSF on Tumor Progression in Multiple Cancer Types. *Experimental & Molecular Medicine* 48(7): e242.  
2016b Stimulatory versus Suppressive Effects of GM-CSF on Tumor Progression in Multiple Cancer Types. *Experimental & Molecular Medicine* 48(7): e242.

Hubbard, Stevan R., and and Jeffrey H. Till  
2000 Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry* 69(1): 373–398.

Hunter, T., and J. A. Cooper  
1985 Protein-Tyrosine Kinases. *Annual Review of Biochemistry* 54: 897–930.

Inaba, Mayu, and Yukiko M. Yamashita  
2012 Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness. *Cell Stem Cell* 11(4): 461–469.

Irby, R. B., W. Mao, D. Coppola, et al.  
1999 Activating SRC Mutation in a Subset of Advanced Human Colon Cancers. *Nature*

Genetics 21(2): 187–190.

Ishikawa, H., M. S. Mahmoud, R. Fujii, S. Abroun, and M. M. Kawano  
2000 Proliferation of Immature Myeloma Cells by Interleukin-6 Is Associated with CD45 Expression in Human Multiple Myeloma. *Leukemia & Lymphoma* 39(1–2): 51–55.

Jakupovic, Ira, Victoria L. Grandage, David C. Linch, and Asim Khwaja  
2004 Lack of Effect of the Human GM-CSF Analog E21R on the Survival of Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *Blood* 103(8): 3230–3232.

Jude, Craig D., Leslie Climer, Diyong Xu, et al.  
2007 Unique and Independent Roles for MLL in Adult Hematopoietic Stem Cells and Progenitors. *Cell Stem Cell* 1(3): 324–337.

Kiel, Mark J., Ömer H. Yilmaz, Toshihide Iwashita, et al.  
2005 SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* 121(7): 1109–1121.

Klemsz, Michael J., Scott R. McKercher, Antonio Celada, Charles Van Beveren, and Richard A. Maki  
2008 Pillars Article: The Macrophage and B Cell-Specific Transcription Factor PU.1 Is Related to the Ets Oncogene. *Cell*, 1990. 61: 113-124. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 181(3): 1597–1608.

Kmieciak, Thomas E, and David Shalloway  
1987 Activation and Suppression of pp60c-Src Transforming Ability by Mutation of Its Primary Sites of Tyrosine Phosphorylation. *Cell* 49(1): 65–73.

Knoblich, Juergen A.  
2008 Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* 132(4): 583–597.

Kreitman, R. J., and I. Pastan  
1997 Recombinant Toxins Containing Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Either Pseudomonas Exotoxin or Diphtheria Toxin Kill Gastrointestinal Cancer and Leukemia Cells. *Blood* 90(1): 252–259.

Kroon, E, J Krosl, U Thorsteinsdottir, et al.  
1998 Hoxa9 Transforms Primary Bone Marrow Cells through Specific Collaboration with Meis1a but Not Pbx1b. *The EMBO Journal* 17(13): 3714–3725.

Ku, Chia-Jui, Tomonori Hosoya, Ivan Maillard, and James Douglas Engel  
2012 GATA-3 Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Cell-Cycle Entry. *Blood* 119(10): 2242–2251.

Lanza, F., B. Castagnari, G. Rigolin, et al.  
1997 Flow Cytometry Measurement of GM-CSF Receptors in Acute Leukemic Blasts, and Normal Hemopoietic Cells. *Leukemia* 11(10): 1700–1710.

- Lappi, D. A., D. Martineau, P. Sarmientos, et al.  
1993 Characterization of a Saporin Mitotoxin Specifically Cytotoxic to Cells Bearing the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor. *Growth Factors* (Chur, Switzerland) 9(1): 31–39.
- Larochelle, Andre, Michael Savona, Michael Wiggins, et al.  
2011 Human and Rhesus Macaque Hematopoietic Stem Cells Cannot Be Purified Based Only on SLAM Family Markers. *Blood* 117(5): 1550–1554.
- Latour, S., and A. Veillette  
2001 Proximal Protein Tyrosine Kinases in Immunoreceptor Signaling. *Current Opinion in Immunology* 13(3): 299–306.
- Levy, E. R., E. Parganas, K. Morishita, et al.  
1994 DNA Rearrangements Proximal to the EVI1 Locus Associated with the 3q21q26 Syndrome. *Blood* 83(5): 1348–1354.
- Li, Fu-Jun, Naohiro Tsuyama, Hideaki Ishikawa, et al.  
2005 A Rapid Translocation of CD45RO but Not CD45RA to Lipid Rafts in IL-6-Induced Proliferation in Myeloma. *Blood* 105(8): 3295–3302.
- Li, Li, Hao Jin, Jin Xu, Yuqian Shi, and Zilong Wen  
2011 Irf8 Regulates Macrophage versus Neutrophil Fate during Zebrafish Primitive Myelopoiesis. *Blood* 117(4): 1359–1369.
- Liang, X., A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, et al.  
2001 Heterogeneous Fatty Acylation of Src Family Kinases with Polyunsaturated Fatty Acids Regulates Raft Localization and Signal Transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 276(33): 30987–30994.
- Lisanti, M. P., and E. Rodriguez-Boulan  
1990 Glycophospholipid Membrane Anchoring Provides Clues to the Mechanism of Protein Sorting in Polarized Epithelial Cells. *Trends in Biochemical Sciences* 15(3): 113–118.
- Lo-Coco, Francesco, Laura Cicconi, and Massimo Breccia  
2016 Current Standard Treatment of Adult Acute Promyelocytic Leukaemia. *British Journal of Haematology* 172(6): 841–854.
- London, E., and D. A. Brown  
2000 Insolubility of Lipids in Triton X-100: Physical Origin and Relationship to Sphingolipid/Cholesterol Membrane Domains (Rafts). *Biochimica Et Biophysica Acta* 1508(1–2): 182–195.
- Look, A. Thomas  
1997 Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias. *Science*

278(5340): 1059–1064.

Lorenz, Egon, Delta Uphoff, T. R. Reid, and Emma Shelton  
1951 Modification of Irradiation Injury in Mice and Guinea Pigs by Bone Marrow Injections. *Journal of the National Cancer Institute* 12(1): 197–201.

Macdonald, Jennifer L., and Linda J. Pike  
2005 A Simplified Method for the Preparation of Detergent-Free Lipid Rafts. *Journal of Lipid Research* 46(5): 1061–1067.

Mahmoud, M. S., H. Ishikawa, R. Fujii, and M. M. Kawano  
1998 Induction of CD45 Expression and Proliferation in U-266 Myeloma Cell Line by Interleukin-6. *Blood* 92(10): 3887–3897.

Majeti, R., A. M. Bilwes, J. P. Noel, T. Hunter, and A. Weiss  
1998 Dimerization-Induced Inhibition of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Function through an Inhibitory Wedge. *Science (New York, N.Y.)* 279(5347): 88–91.

Majeti, R., Z. Xu, T. G. Parslow, et al.  
2000 An Inactivating Point Mutation in the Inhibitory Wedge of CD45 Causes Lymphoproliferation and Autoimmunity. *Cell* 103(7): 1059–1070.

Mathew, Mrudula, K. C. Zaineb, and Rama Shanker Verma  
2013 GM-CSF-DFF40: A Novel Humanized Immunotoxin Induces Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Apoptosis* 18(7): 882–895.

Mayer, B. J.  
2001 SH3 Domains: Complexity in Moderation. *Journal of Cell Science* 114(7): 1253–1263.

McIntosh, Thomas J., Adriana Vidal, and Sidney A. Simon  
2003 Sorting of Lipids and Transmembrane Peptides between Detergent-Soluble Bilayers and Detergent-Resistant Rafts. *Biophysical Journal* 85(3): 1656–1666.

McKenzie, Joby L., Katsuto Takenaka, Olga I. Gan, Monica Doedens, and John E. Dick  
2007 Low Rhodamine 123 Retention Identifies Long-Term Human Hematopoietic Stem Cells within the Lin-CD34+CD38- Population. *Blood* 109(2): 543–545.

van Meer, G.  
1998 Lipids of the Golgi Membrane. *Trends in Cell Biology* 8(1): 29–33.

Metcalfe, Donald  
2008 Hematopoietic Cytokines. *Blood* 111(2): 485–491.

Miyachi, H., Y. Tanaka, K. Gondo, et al.  
1999 Altered Expression of CD45 Isoforms in Differentiation of Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Hematology* 62(3): 159–164.

- Mori, Hiroshi, Susan M. Colman, Zhijian Xiao, et al.  
2002 Chromosome Translocations and Covert Leukemic Clones Are Generated during Normal Fetal Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(12): 8242–8247.
- Moroco, Jamie A., Jodi K. Craig, Roxana E. Iacob, et al.  
2014a Differential Sensitivity of Src-Family Kinases to Activation by SH3 Domain Displacement. *PLoS One* 9(8): e105629.  
2014b Differential Sensitivity of Src-Family Kinases to Activation by SH3 Domain Displacement. *PLOS ONE* 9(8): e105629.
- Nguyen, C. H., E. Fan, J. F. Riou, et al.  
1995 Synthesis and Biological Evaluation of Amino-Substituted benzo[f]pyrido[4,3-B] and pyrido[3,4-B]quinoxalines: A New Class of Antineoplastic Agents. *Anti-Cancer Drug Design* 10(4): 277–297.
- Nimmo, Rachael A., Gillian E. May, and Tariq Enver  
2015 Primed and Ready: Understanding Lineage Commitment through Single Cell Analysis. *Trends in Cell Biology* 25(8): 459–467.
- Nutt, Stephen L., and Barbara L. Kee  
2007 The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment. *Immunity* 26(6): 715–725.
- Ohvo-Rekilä, Henna, Bodil Ramstedt, Petra Leppimäki, and J. Peter Slotte  
2002 Cholesterol Interactions with Phospholipids in Membranes. *Progress in Lipid Research* 41(1): 66–97.
- Okada, M., S. Nada, Y. Yamanashi, T. Yamamoto, and H. Nakagawa  
1991 CSK: A Protein-Tyrosine Kinase Involved in Regulation of Src Family Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 266(36): 24249–24252.
- Okada, S., H. Nakauchi, K. Nagayoshi, et al.  
1991 Enrichment and Characterization of Murine Hematopoietic Stem Cells That Express c-Kit Molecule. *Blood* 78(7): 1706–1712.
- Park, Linda, Della Friend, Steven Gillis, and David Urdal  
1986 Characterization of the Cell Surface Receptor for Human Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Experimental Medicine* 164(1): 251–262.
- Pawson, Tony  
2004 Specificity in Signal Transduction: From Phosphotyrosine-SH2 Domain Interactions to Complex Cellular Systems. *Cell* 116(2): 191–203.
- Penninger, J. M., J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, and A. J. Oliveira-dos-Santos  
2001 CD45: New Jobs for an Old Acquaintance. *Nature Immunology* 2(5): 389–396.

- Perentesis, J. P., K. G. Waddick, A. E. Bendel, et al.  
1997 Induction of Apoptosis in Multidrug-Resistant and Radiation-Resistant Acute Myeloid Leukemia Cells by a Recombinant Fusion Toxin Directed against the Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3(3): 347–355.
- Pierce, Susan K.  
2002 Lipid Rafts and B-Cell Activation. *Nature Reviews. Immunology* 2(2): 96–105.
- Pike, Linda J.  
2004 Lipid Rafts: Heterogeneity on the High Seas. *The Biochemical Journal* 378(Pt 2): 281–292.  
2006 Rafts Defined: A Report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research* 47(7): 1597–1598.
- Plzak, L. F., W. Fried, L. O. Jacobson, and W. F. Bethard  
1955 Demonstration of Stimulation of Erythropoiesis by Plasma from Anemic Rats Using Fe59. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 46(5): 671–678.
- Powell, L. D., D. Sgroi, E. R. Sjoberg, I. Stamenkovic, and A. Varki  
1993 Natural Ligands of the B Cell Adhesion Molecule CD22 Beta Carry N-Linked Oligosaccharides with Alpha-2,6-Linked Sialic Acids That Are Required for Recognition. *The Journal of Biological Chemistry* 268(10): 7019–7027.
- Rabbitts, Terence H  
2001 Chromosomal Translocation Master Genes, Mouse Models and Experimental Therapeutics. , Published Online: 10 September 2001; | doi:10.1038/sj.onc.1204597 20(40). <http://www.nature.com/gate2.inist.fr/onc/journal/v20/n40/full/1204597a.html>, accessed June 9, 2016.
- Rajendran, Lawrence, Madhan Masilamani, Samuel Solomon, et al.  
2003 Asymmetric Localization of Flotillins/Reggies in Preassembled Platforms Confers Inherent Polarity to Hematopoietic Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(14): 8241–8246.
- Ramstedt, Bodil, and J. Peter Slotte  
2002 Membrane Properties of Sphingomyelins. *FEBS Letters* 531(1): 33–37.
- Renström, Jonas, Monika Kröger, Christian Peschel, and Robert A. J. Oostendorp  
2010 How the Niche Regulates Hematopoietic Stem Cells. *Chemico-Biological Interactions* 184(1–2). *BENZENE 2009-Health Effects and Mechanisms of Bone Marrow Toxicity: Implications for T-AML and the Mode of Action Framework.*: 7–15.
- Reya, Tannishtha, Sean J. Morrison, Michael F. Clarke, and Irving L. Weissman  
2001 Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* 414(6859): 105–111.

Rodgers, W., and J. K. Rose

1996 Exclusion of CD45 Inhibits Activity of p56lck Associated with Glycolipid-Enriched Membrane Domains. *The Journal of Cell Biology* 135(6 Pt 1): 1515–1523.

Rosenbauer, Frank, and Daniel G. Tenen

2007 Transcription Factors in Myeloid Development: Balancing Differentiation with Transformation. *Nature Reviews Immunology* 7(2): 105–117.

Roskoski Jr., Robert

2015 Src Protein-Tyrosine Kinase Structure, Mechanism, and Small Molecule Inhibitors. *Pharmacological Research* 94: 9–25.

Rous, Peyton

1911 A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *The Journal of Experimental Medicine* 13(4): 397–411.

Saint-Paul, Laetitia, Chi-Hung Nguyen, Anne Buffière, et al.

2016 CD45 Phosphatase Is Crucial for Human and Murine Acute Myeloid Leukemia Maintenance through Its Localization in Lipid Rafts. *Oncotarget*.

Sato, T., K. Furukawa, M. Autero, C. G. Gahmberg, and A. Kobata

1993 Structural Study of the Sugar Chains of Human Leukocyte Common Antigen CD45. *Biochemistry* 32(47): 12694–12704.

Scandura, Joseph M, Piernicola Boccuni, Jorg Cammenga, and Stephen D Nime

2002 Transcription Factor Fusions in Acute Leukemia: Variations on a Theme. ,  
Published Online: 15 May 2002; | doi:10.1038/sj.onc.1205315 21(21).  
<http://www.nature.com/gate2.inist.fr/onc/journal/v21/n21/full/1205315a.html>, accessed June 9, 2016.

Scapini, Patrizia, Shalini Pereira, Hong Zhang, and Clifford A. Lowell

2009 Multiple Roles of Lyn Kinase in Myeloid Cell Signaling and Function. *Immunological Reviews* 228(1): 23–40.

Scheijen, Blanca, and Griffin James D

2002 Tyrosine Kinase Oncogenes in Normal Hematopoiesis and Hematological Disease. ,  
Published Online: 15 May 2002; | doi:10.1038/sj.onc.1205317 21(21).  
<http://www.nature.com/gate2.inist.fr/onc/journal/v21/n21/full/1205317a.html>, accessed June 9, 2016.

Schindler, Thomas, Frank Sicheri, Alexander Pico, et al.

1999 Crystal Structure of Hck in Complex with a Src Family–Selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *Molecular Cell* 3(5): 639–648.

Schroeder, F., G. Nemezc, W. G. Wood, et al.

1991 Transmembrane Distribution of Sterol in the Human Erythrocyte. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1066(2): 183–192.

- Scott, L. M., C. I. Civin, P. Rorth, and A. D. Friedman  
1992 A Novel Temporal Expression Pattern of Three C/EBP Family Members in Differentiating Myelomonocytic Cells. *Blood* 80(7): 1725–1735.
- Sengupta, Prabuddha, Barbara Baird, and David Holowka  
2007 Lipid Rafts, Fluid/Fluid Phase Separation, and Their Relevance to Plasma Membrane Structure and Function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18(5): 583–590.
- Shi, Yufang, Catherine H. Liu, Arthur I. Roberts, et al.  
2006 Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) and T-Cell Responses: What We Do and Don't Know. *Cell Research* 16(2): 126–133.
- Sieweke, M. H., H. Tekotte, J. Frampton, and T. Graf  
1996 MafB Is an Interaction Partner and Repressor of Ets-1 That Inhibits Erythroid Differentiation. *Cell* 85(1): 49–60.
- Simons, K., and J. Gruenberg  
2000 Jamming the Endosomal System: Lipid Rafts and Lysosomal Storage Diseases. *Trends in Cell Biology* 10(11): 459–462.
- Simons, K., and E. Ikonen  
1997 Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* 387(6633): 569–572.
- Simons, Kai, and Derek Toomre  
2000 Lipid Rafts and Signal Transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1(1): 31–39.
- Singer, S. J., and G. L. Nicolson  
1972 The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (New York, N.Y.)* 175(4023): 720–731.
- Smaby, J. M., M. Momsen, V. S. Kulkarni, and R. E. Brown  
1996 Cholesterol-Induced Interfacial Area Condensations of Galactosylceramides and Sphingomyelins with Identical Acyl Chains. *Biochemistry* 35(18): 5696–5704.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, and I. L. Weissman  
1988 Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells. *Science* 241(4861): 58–62.
- Spradling, Allan, Daniela Drummond-Barbosa, and Toshie Kai  
2001 Stem Cells Find Their Niche. *Nature* 414(6859): 98–104.
- Staal, F. J., F. Weerkamp, A. W. Langerak, R. W. Hendriks, and H. C. Clevers  
2001 Transcriptional Control of T Lymphocyte Differentiation. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 19(3): 165–179.

- Stamenkovic, I., D. Sgroi, A. Aruffo, M. S. Sy, and T. Anderson  
1991 The B Lymphocyte Adhesion Molecule CD22 Interacts with Leukocyte Common Antigen CD45RO on T Cells and Alpha 2-6 Sialyltransferase, CD75, on B Cells. *Cell* 66(6): 1133–1144.
- Sun, Q., K. Jones, B. McClure, et al.  
1999 Simultaneous Antagonism of Interleukin-5, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Interleukin-3 Stimulation of Human Eosinophils by Targetting the Common Cytokine Binding Site of Their Receptors. *Blood* 94(6): 1943–1951.
- Symons, A., A. C. Willis, and A. N. Barclay  
1999 Domain Organization of the Extracellular Region of CD45. *Protein Engineering* 12(10): 885–892.
- Takeda, A., J. J. Wu, and A. L. Maizel  
1992 Evidence for Monomeric and Dimeric Forms of CD45 Associated with a 30-kDa Phosphorylated Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 267(23): 16651–16659.
- Thomas, M. L.  
1989 The Leukocyte Common Antigen Family. *Annual Review of Immunology* 7(1): 339–369.
- Till J E & McCulloch E A. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat. Res.* 14:213-22, 1961. - A1979HP46800001.pdf  
N.d. <http://garfield.library.upenn.edu/classics1979/A1979HP46800001.pdf>, accessed May 25, 2016.
- Till, J. E., and E. A. McCULLOCH  
1961 A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* 14: 213–222.
- Tocanne, J. F., L. Cézanne, A. Lopez, et al.  
1994 Lipid Domains and Lipid/Protein Interactions in Biological Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 73(1–2): 139–158.
- Tonks, N. K., H. Charbonneau, C. D. Diltz, E. H. Fischer, and K. A. Walsh  
1988 Demonstration That the Leukocyte Common Antigen CD45 Is a Protein Tyrosine Phosphatase. *Biochemistry* 27(24): 8695–8701.
- Trowbridge, I. S., and M. L. Thomas  
1994a CD45: An Emerging Role as a Protein Tyrosine Phosphatase Required for Lymphocyte Activation and Development. *Annual Review of Immunology* 12: 85–116.  
1994b CD45: An Emerging Role as a Protein Tyrosine Phosphatase Required for Lymphocyte Activation and Development. *Annual Review of Immunology* 12: 85–116.
- Virts, E., D. Barritt, and W. C. Raschke

1998 Expression of CD45 Isoforms Lacking Exons 7, 8 and 10. *Molecular Immunology* 35(3): 167–176.

Vogel, Daphne Y. S., Judith E. Glim, Andrea W. D. Stavenuiter, et al.  
2014 Human Macrophage Polarization in Vitro: Maturation and Activation Methods Compared. *Immunobiology* 219(9): 695–703.

de Vos, A. M., M. Ultsch, and A. A. Kossiakoff  
1992 Human Growth Hormone and Extracellular Domain of Its Receptor: Crystal Structure of the Complex. *Science (New York, N.Y.)* 255(5042): 306–312.

Walker, F, and A W Burgess  
1985 Specific Binding of Radioiodinated Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor to Hemopoietic Cells. *The EMBO Journal* 4(4): 933–939.

Walzel, H., U. Schulz, P. Neels, and J. Brock  
1999 Galectin-1, a Natural Ligand for the Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase CD45. *Immunology Letters* 67(3): 193–202.

Wang, Dongxia, Walter J. Esselman, and Philip A. Cole  
2002 Substrate Conformational Restriction and CD45-Catalyzed Dephosphorylation of Tail Tyrosine-Phosphorylated Src Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 277(43): 40428–40433.

Wei, S., J. H. Liu, P. K. Epling-Burnette, et al.  
1996 Critical Role of Lyn Kinase in Inhibition of Neutrophil Apoptosis by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Immunology* 157(11): 5155–5162.

Wells, J. A., and A. M. de Vos  
1996 Hematopoietic Receptor Complexes. *Annual Review of Biochemistry* 65: 609–634.

Williams, J. C., R. K. Wierenga, and M. Saraste  
1998 Insights into Src Kinase Functions: Structural Comparisons. *Trends in Biochemical Sciences* 23(5): 179–184.

Woolthuis, Carolien M., and Christopher Y. Park  
2016 Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Commitment to the Megakaryocyte Lineage. *Blood* 127(10): 1242–1248.

Wu, Liangtang, Jun Fu, and Shi-Hsiang Shen  
2002 SKAP55 Coupled with CD45 Positively Regulates T-Cell Receptor-Mediated Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 22(8): 2673–2686.

Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed  
1998 Membrane Compartmentation Is Required for Efficient T Cell Activation. *Immunity* 8(6): 723–732.

- Xu, W. Q., S. C. Harrison, and M. J. Eck  
1997 Three-Dimensional Structure of the Tyrosine Kinase c-Src. *Nature* 385(6617): 595–602.
- Xu, Wenqing, Amish Doshi, Ming Lei, Michael J Eck, and Stephen C Harrison  
1999 Crystal Structures of c-Src Reveal Features of Its Autoinhibitory Mechanism. *Molecular Cell* 3(5): 629–638.
- Yamamoto, Ryo, Yohei Morita, Jun Ooehara, et al.  
2013 Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells. *Cell* 154(5): 1112–1126.
- Yamanaka, R., C. Barlow, J. Lekstrom-Himes, et al.  
1997 Impaired Granulopoiesis, Myelodysplasia, and Early Lethality in CCAAT/Enhancer Binding Protein Epsilon-Deficient Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(24): 13187–13192.
- Yeagle, P. L.  
1985 Cholesterol and the Cell Membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta* 822(3–4): 267–287.
- Yeziel, E., Y. I. Henis, and Y. Barenholz  
1986 Aging of Rat Heart Fibroblasts: Relationship between Lipid Composition, Membrane Organization and Biological Properties. *Biochimica Et Biophysica Acta* 859(1): 95–104.
- Yousefi, S., D. C. Hoessli, K. Blaser, G. B. Mills, and H. U. Simon  
1996 Requirement of Lyn and Syk Tyrosine Kinases for the Prevention of Apoptosis by Cytokines in Human Eosinophils. *The Journal of Experimental Medicine* 183(4): 1407–1414.
- Yu, Vionnie W. C., and David T. Scadden  
N.d. Heterogeneity of the Bone Marrow Niche. [Review]. *Current Opinion in Hematology*.
- Yuan, Y., L. Zhou, T. Miyamoto, et al.  
2001 AML1-ETO Expression Is Directly Involved in the Development of Acute Myeloid Leukemia in the Presence of Additional Mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(18): 10398–10403.

# Annexes

## Résumé

Afin de découvrir de nouvelles molécules pour le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), nous avons analysé la toxicité de 8000 composés indols *in vitro* sur des cellules leucémiques, isolées de la moelle osseuse de souris souffrant de LAM. Nous avons identifié un nouveau composé chimique, de la famille des *Pyrido[4,3-b]quinoxaline (PyQ)*, affectant seulement les cellules leucémiques, mais ne perturbant pas la reconstitution de l'hématopoïèse saine *in vivo*. Lorsque nous avons analysé la présence de *PyQ* dans différents compartiments subcellulaires, nous avons découvert que *PyQ* a une forte affinité pour les membranes plasmiques, avec une faible diffusion au niveau du noyau. Par conséquent, nous avons supposé, que *PyQ*, en liant la membrane plasmique, pourrait affecter la fonction de nombreuses protéines intra-membranaires et leurs voies de signalisation. Puisque les lignées cellulaires hématopoïétiques sont plus sensibles à *PyQ* que les lignées non hématopoïétiques, nous avons analysé les protéines intramembranaires spécifiquement exprimées par les cellules hématopoïétiques.

Le CD45 est une protéine à activité tyrosine phosphatase impliquée dans la régulation de plusieurs récepteurs à cytokines régulant la croissance des cellules et leur prolifération, dont le GM-CSF hautement exprimé par les blastes leucémiques. En utilisant une transduction lentivirale de ShRNA, nous avons généré une lignée de cellules THP1 sous exprimant le CD45, qui perd alors sa sensibilité à *PyQ*. Ceci confirme l'hypothèse stipulant que le CD45 est requis pour l'effet inhibiteur dépendant de *PyQ*. De plus, nous avons observé que la population de cellules leucémiques exprimant un taux élevé de CD45 est enrichie en cellules initiateuses de leucémie et est plus sensible à *PyQ*. L'inhibition de l'expression du CD45 prévient la transformation oncogénique des cellules, ce qui prouve que l'expression du CD45 est essentielle au maintien des cellules leucémiques *in vivo*.

La localisation de la protéine phosphatase CD45 au niveau ou en dehors des radeaux lipidiques est essentielle à la déphosphorylation de la tyrosine inactivatrice (Y507) de Lyn. Le CD45, principalement localisé au niveau des radeaux lipidiques dans les cellules leucémiques, est rapidement délocalisé après un traitement par *PyQ*. Par conséquent, l'activité phosphatase du CD45 est profondément affectée, Lyn est donc phosphorylée sur son site inhibiteur, ce qui a pour effet de perturber la voie du GM-CSF, une cytokine clé à la croissance et à la survie des cellules. Dans les cellules non transformées, le CD45 n'est pas localisé au niveau des radeaux lipidiques, ce qui explique la faible toxicité observée sur ces cellules.

Ainsi, cette thèse décrit le rôle de la protéine phosphatase CD45 et des radeaux lipidiques dans le maintien des LAM et propose un nouveau modèle de traitement thérapeutique.

# **Discussion et perspectives**

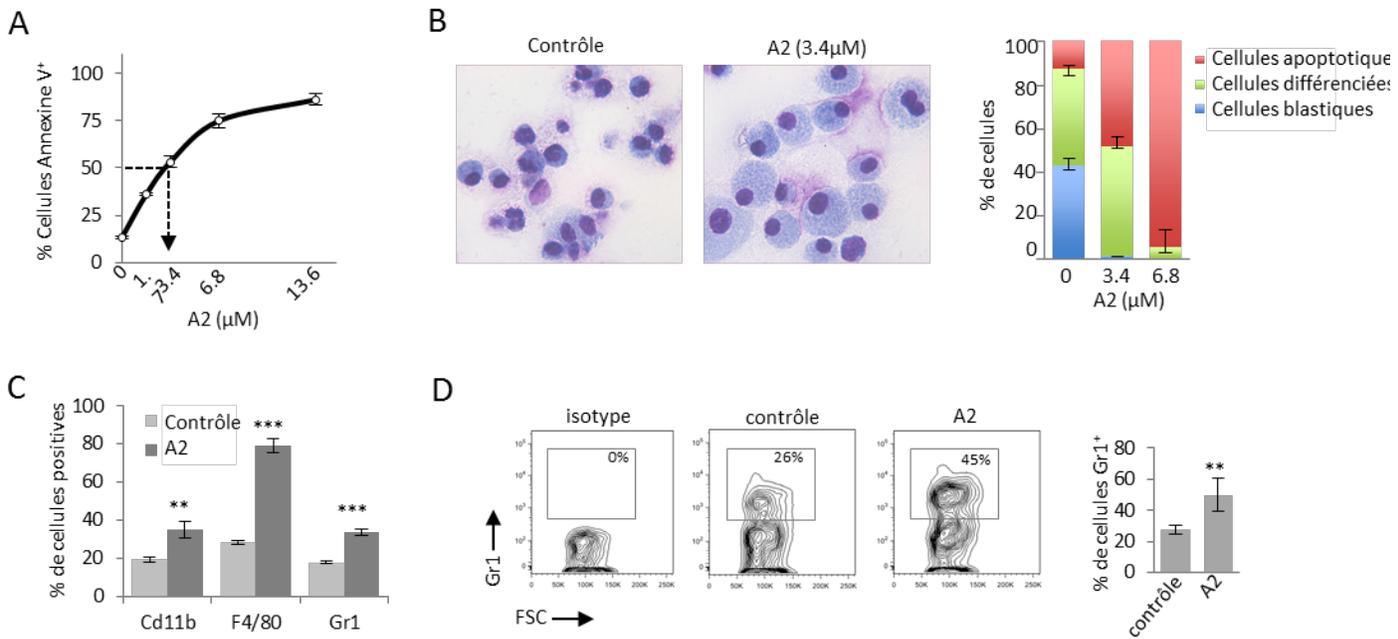
Un nouvel agent de la famille des *Pyrido[4,3-b]quinoxaline* (*PyQ*) ayant une forte affinité pour les membranes plasmiques a donc été caractérisé. Ce composé bloque la prolifération dépendante de la voie du GM-CSF des cellules leucémiques. Le CD45, initialement localisé dans les radeaux lipidiques au sein de la membrane plasmique, est rapidement délocalisé après traitement. L'activité du CD45 est donc affectée ; la kinase Lyn se trouve phosphorylée sur son site inhibiteur (Y507), conduisant à une altération de la voie du GM-CSF. De façon intéressante, le CD45 n'est pas localisé dans les radeaux lipidiques des cellules hématopoïétiques primitives normales et *PyQ* ne présente qu'une faible toxicité sur ces cellules.

Ce travail soulève néanmoins un certain nombre de questions, auxquelles les perspectives apportent un début de réponse.

### ***Pyrido[4,3-b]quinoxaline* induit une différenciation des blastes leucémiques murins**

Nous avons démontré que *PyQ* affecte la prolifération des cellules leucémiques sans impact notable sur l'hématopoïèse saine (Figure 1A de l'article). En effet, *PyQ* induit l'apoptose des cellules LAM HOXA9-MEIS1, à une concentration inhibitrice médiane (IC50) proche de 3,4  $\mu$ M (Figure 17A).

Ceci soulève la question du devenir des 50% de blastes restants, ne partant pas en apoptose. Une coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) montre que lorsque les blastes leucémiques sont traités à cette concentration pendant trois jours *in vitro*, ils se différencient en cellules ayant une morphologie de macrophages (Figure 17B), ce qui a été confirmé en cytométrie par l'expression accrue de marqueurs spécifiques exprimé par des cellules myéloïdes matures (Gr1 et CD11b) ou le F4/80 spécifiquement exprimés par les macrophages (Figure 17C). Nous avons donc décidé de traiter des souris HOXA9-MEIS1 par deux injections de *PyQ* afin d'évaluer son potentiel de différenciation cellulaire leucémique *in vivo*. Trois jours après le second traitement avec *PyQ*, nous avons confirmé une augmentation de l'expression de Gr1 sur les cellules leucémiques GFP<sup>+</sup> isolées à partir de moelle osseuse de souris traitées avec *PyQ* *in vivo*. Nous avons également observé une perte de cellules c-Kit<sup>+</sup>, ce qui témoigne également d'une différenciation des blastes leucémiques après un traitement *in vivo* (Figure 17D).



**Figure 17 : Pyrido[4,3-b]quinoxaline induit l'apoptose et la différenciation des cellules LAM. (A) et (D) par Ronan Quéré**

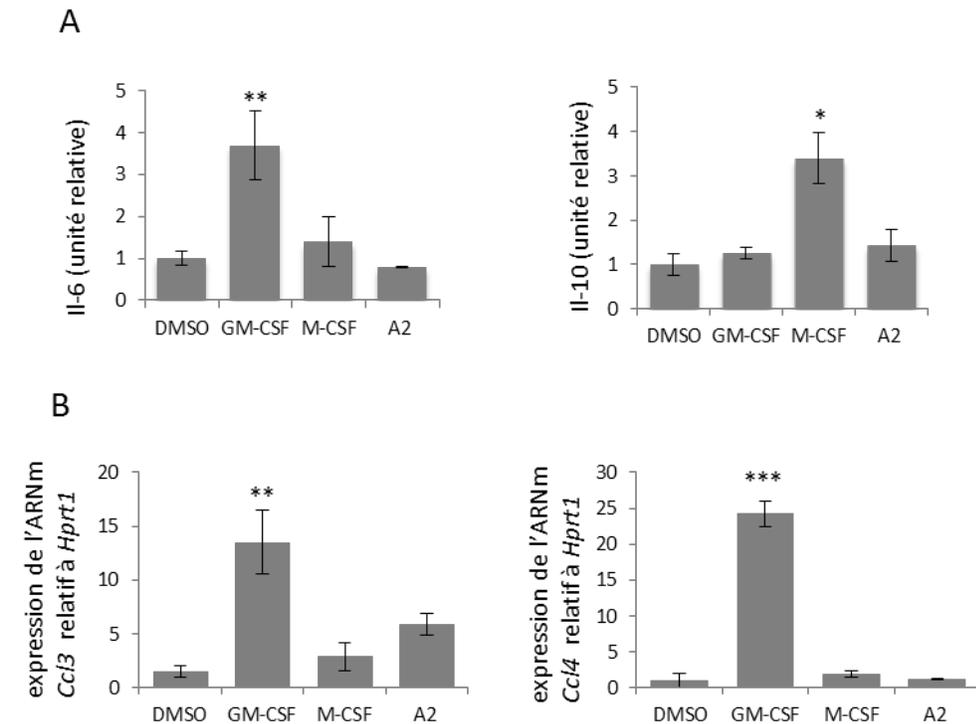
(A) Pourcentage de cellules positives à l'Annexine V, après traitement des cellules LAM HOXA9-MEIS1 avec des concentrations de PyQ variant de 0 à 13,6 μM, pendant 18h, n = 3. (B) coloration au May-Grünwald-Giemsa montrant la morphologie des cellules HOXA9-MEIS1 traitées avec 3,4 μM de PyQ pendant 4 jours, grossissement × 20. Les proportions moyennes de cellules apoptotiques, cellules différenciées et cellules blastiques, 4 jours après un traitement avec PyQ testé à différentes concentrations sont indiquées, n = 3. (C) Pourcentage de cellules Cd11b+, F4/80+ et Gr1+, analysées par cytométrie en flux après traitement des cellules leucémiques HOXA9-MEIS1 avec 3,4 μM de PyQ pendant 4 jours, n = 3 biologiques. (D) Les souris HOXA9-MEIS1 ont reçu deux injections intrapéritonéales de PyQ (3 mg / kg). Après le traitement, les souris ont été sacrifiées et l'expression de Gr1 et c-Kit a été mesurée par cytométrie en flux sur des cellules GFP + isolées de la moelle osseuse, n = 5 souris. Moyenne ± SEM. \*\*, P <0,001, \*\*\*, P <0,0001, mesuré par le test t de Student non apparié.

Il existe deux types de macrophages, les macrophages M1 produisant principalement des cytokines pro-inflammatoires et les macrophages M2 produisant des facteurs anti-inflammatoires. Le GM-CSF et le M-CSF modulent l'état de polarisation des macrophages, avec une orientation des macrophages vers le phénotype M1 par le GM-CSF et M2 par le M-CSF (Vogel et al. 2014). Nous avons traité les cellules HOXA9-MEIS1 avec PyQ à 3,4μM en comparaison au GM-CSF ou au M-CSF à 25ng/mL. Après trois jours de traitement, nous avons utilisé un kit ELISA afin de doser les différentes cytokines produites par nos cellules pour

caractériser le type de macrophage induit par la différenciation des cellules HOXA9-MEIS1 (Figure 18A). Nous avons également quantifié par PCR quantitative en temps réel, le taux de chimiokines produites (Figure 18B). Il est vite apparu que les cellules HOXA9-MEIS1 ne se différenciaient pas en macrophages fonctionnels et ne produisaient pas les cytokines essentielles caractérisant les macrophages.

De plus, l'analyse des lignées cellulaires et des échantillons de patients révèle qu'aucune différenciation ne se produit dans ces types cellulaires.

Nous avons donc conclu qu'un traitement par *PyQ* n'activait pas de voie spécifique à la différenciation des macrophages, mais bloquait la prolifération des blastes leucémiques. La différenciation observée chez les cellules HOXA9-MEIS1 ne serait qu'un effet secondaire à ce blocage de la différenciation.



**Figure 18 : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* n'induit pas la différenciation des cellules de LAM en macrophages fonctionnels**

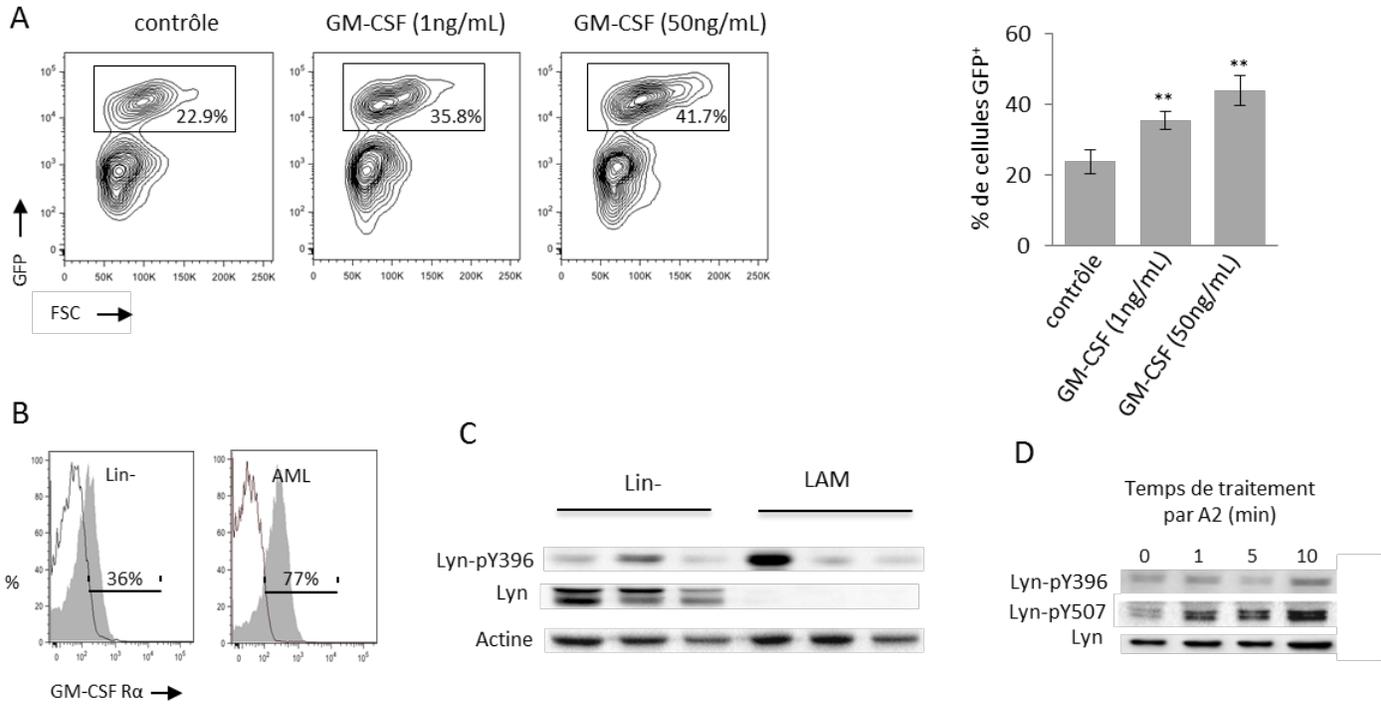
(A ) Quantification par ELISA des cytokines IL-6 et IL-10 sécrétées par les cellules de LAM après 3 jours de traitement par *PyQ*. (B) Quantification par PCR quantitative des chimiokines CCL2 et CCL4 exprimées par les cellules de LAM après 24h de traitement par *PyQ*.

### ***Pyrido[4,3-b]quinoxaline* module seulement une partie de la voie du GM-CSF, suractivée dans les cellules HOXA9-MEIS1**

Le GM-CSF a été décrit comme un facteur de croissance induisant la prolifération cellulaire (Hong 2016b). Il était cependant nécessaire de vérifier l'effet du GM-CSF sur notre modèle cellulaire. La viabilité des cellules HOXA9-MEIS1 a donc été analysée par dosage de la GFP en cytométrie. Après 3 jours de culture *in vitro* en présence de GM-CSF, nous confirmons une expansion des cellules qui confirme que le GM-CSF induit leur prolifération et leur survie (Figure 19A).

Les cellules leucémiques présentent une suractivation de la voie du GM-CSF due à deux événements. Le CD45 est localisé préférentiellement dans les radeaux lipidiques des cellules leucémiques. Lorsqu'il est situé dans les radeaux lipidiques, le CD45 déphosphoryle la tyrosine inactivatrice de Lyn (Y507), activant ainsi la voie du GM-CSF (Figure 16). D'autre part, les cellules leucémiques présentent plus de GM-CSFR à leur surface (Figure 19B), induisant ainsi une forte phosphorylation de la tyrosine activatrice de Lyn (Figure 19C). Ainsi, les cellules blastiques présentent à la fois une sensibilité accrue au GM-CSF due à la forte expression du GM-CSFR $\alpha$ , et une absence de régulation efficace de la voie due à la localisation du CD45 dans les radeaux lipidiques. Ceci engendre une suractivation de la voie du GM-CSF dans les blastes, se traduisant par une survie et une prolifération accrue.

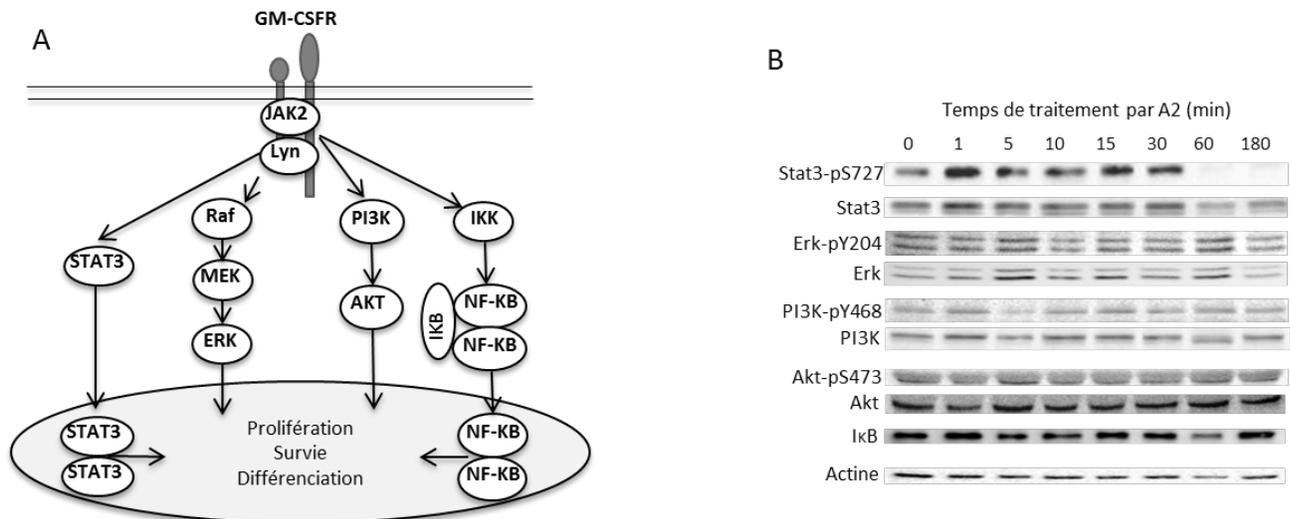
Un traitement par *PyQ* provoque une phosphorylation de la tyrosine inactivatrice de Lyn. En revanche, le traitement n'a aucun effet sur la tyrosine activatrice (Y396) (Figure 19D). Ainsi, l'effet régulateur de *PyQ* sur la voie du GM-CSF semble s'effectuer uniquement via la modulation de la tyrosine inactivatrice de lyn.



**Figure 19 : La voie du GM-CSF induit la prolifération cellulaire et est suractivée dans les cellules leucémiques**

(A) Viabilité cellulaire, analysée par cytométrie en flux après traitement des cellules leucémiques HOXA9-MEIS1 avec du GM-CSF pendant 24h, n = 3. (B) Le GM-CSFR est hautement exprimé à la surface des cellules HOXA9-MEIS1 comparé aux cellules Lin-, comme le montre l'analyse par cytométrie n = 3. (C) La tyrosine activatrice de Lyn (Y396) est hautement phosphorylée dans les cellules HOXA9-MEIS1 comparé aux cellules Lin-, comme le montre le western blotting. (D) Les cellules HOXA9-MEIS1 sont traitées avec *PyQ* (3,4 $\mu$ M) à différents temps. Le WB montre une phosphorylation de la tyrosine inhibitrice de Lyn (Y507) mais pas de la tyrosine activatrice (Y396).

En outre, malgré les nombreuses voies possibles activées par la liaison du GM-CSF à son récepteur (Figure 20A), seule la phosphorylation de Stat3, dépendante de Lyn subit une régulation après le traitement par *PyQ*. Les autres composants de la voie du GM-CSF ne subissent pas de modifications (Figure 20B), ce qui va dans le sens d'une régulation de la voie du GM-CSF par *PyQ* dépendante uniquement de la tyrosine 507.

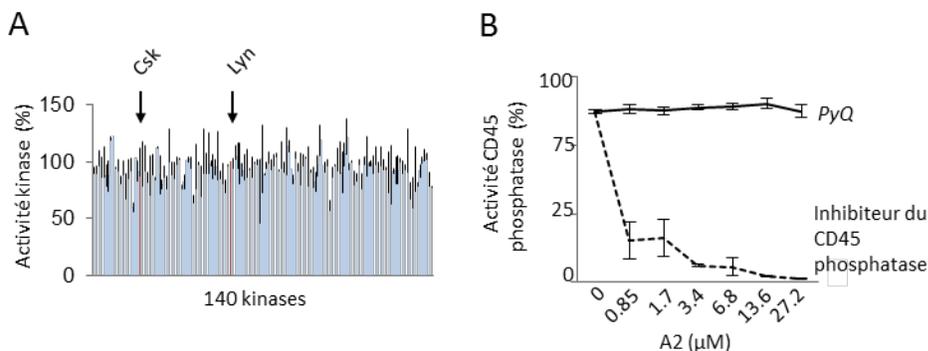


**Figure 20 : *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* agit uniquement sur l'activité de Stat3 dans la voie du GM-CSF**

(A) Représentation schématique des différentes voies activées par le GM-CSF, d'après (Reuter, Morgan, and Bergmann 2000; van de Laar and Coffey, et Woltman 2012). (B) Lorsque les cellules HOXA9-MEIS 1 sont traitées avec *PyQ* à 3,4 $\mu$ M, selon une cinétique de temps allant jusqu'à 3h, seul Stat3 se trouve déphosphorylé, comme le montre le WB.

### ***Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* n'agit pas directement sur l'activité kinase de Lyn ou sur l'activité phosphatase du CD45**

Un traitement par *PyQ* induisant une phosphorylation de la tyrosine inactivatrice de Lyn (Y507), la première hypothèse a été que la molécule agissait directement sur l'activité de Lyn ou sur l'une des protéines régulant son activité. Le criblage de 140 kinases nous a informé que *PyQ* ne régule pas directement Lyn ni même l'une de ses kinases régulatrices (Figure 21A). Un dosage de l'activité du CD45 nous indique que *PyQ* n'agit pas non plus directement sur l'activité de la phosphatase du CD45 qui régule le taux de phosphorylation de Lyn (Figure 21B). Ainsi, *PyQ* contrôle l'activité de Lyn d'une autre manière qu'à travers son action directe sur sa phosphorylation ou sur l'activité des protéines kinases ou phosphatases régulatrices de Lyn. *PyQ* ayant une forte affinité pour les lipides de la membrane plasmique, ceci pourrait affecter la fonction des protéines intramembranaires et leurs voies de signalisation.



**Figure 21 : *Pyrido[4,3-b]quinoxaline* n'est pas un inhibiteur de kinases ou de l'activité phosphatase du CD45. (A) par Ronan Quéré**

(A) Représentation graphique de l'activité kinase, pour 140 kinases testées avec *PyQ* (3,4μM). (B) Activité phosphatase du CD45, testée avec différentes doses de *PyQ*, en comparaison avec un inhibiteur connu (R et D systems).

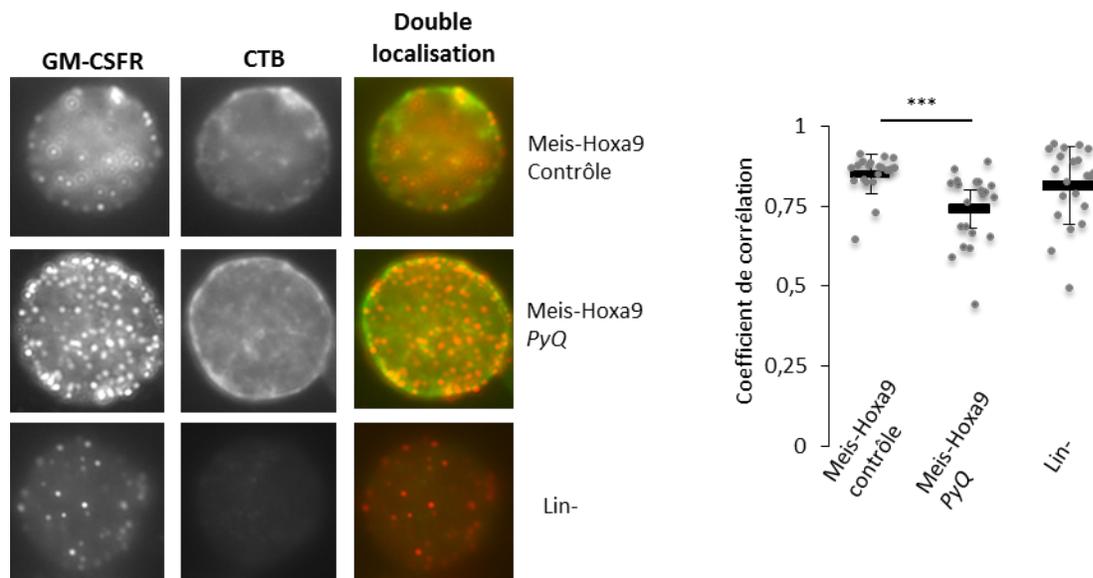
### ***Pyrido[4,3-b]quinoxaline* provoque le regroupement du récepteur au GM-CSF en dehors des radeaux lipidiques**

Le CD45 est une protéine dont l'activité tyrosine phosphatase est optimale lorsqu'elle est située dans les radeaux lipidiques. Dans les cellules leucémiques, le CD45 est localisé préférentiellement à leur niveau, ce qui n'est pas le cas des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs sains ou il est localisé essentiellement à l'extérieur. Un traitement des cellules leucémiques par *PyQ* modifie la distribution du CD45 avec un regroupement de la protéine en dehors des radeaux lipidiques. Ainsi, la phosphorylation de la tyrosine inhibitrice de Lyn, placée sous le contrôle du CD45, se trouve rapidement augmentée, ce qui a pour effet d'inhiber la prolifération cellulaire dépendante du GM-CSF (Figure 16).

Néanmoins, un traitement par *PyQ* ne semble pas modifier uniquement la distribution du CD45. Nous avons également observé la localisation du récepteur au GM-CSF, avant et après traitement par *PyQ*. Les cellules HOXA9-MEIS1 en culture dans du SFEM ont été traitées par 3,4 μM de *PyQ* pendant 15 minutes avant d'être marquées par un anti-CTB (*Cholera Toxin Subunit B*) couplé à l'AF488 (Life technologies) et un anti-GM-CSFR, sans perméabilisation cellulaire. L'analyse de l'immunofluorescence a confirmé une colocalisation bien plus importante du GM-CSFR et des radeaux lipidiques dans les cellules MEIS-HOXA9 en comparaison avec les cellules

Lin- (Figure 22). L'analyse de la colocalisation montre que le GM-CSFR, initialement localisé dans les radeaux lipidiques, se trouve partiellement regroupé en dehors des radeaux lipidiques après un traitement par *PyQ* (Figure 22). La valeur p est de 0,00031. La valeur p calculée sur la colocalisation du CD45 et du CTB entre les cellules MEIS1-HOXA9 traitées par 3,4  $\mu$ M de *PyQ* pendant 15 minutes, comparée aux cellules MEIS1-HOXA9 non traitées est de 0,00024. Dans les deux cas, la délocalisation de la protéine analysée en dehors des radeaux lipidiques est significative, bien que le GM-CSFR semble moins touché que le CD45. Il est à noter également que le GM-CSFR est localisé au niveau des radeaux lipidiques des cellules Lin-, contrairement au CD45, ce qui ne le place pas comme cible thérapeutique potentielle de *PyQ*.

Ceci suggère que l'affinité de *PyQ* pour la membrane plasmique pourrait perturber la fonction de nombreuses protéines intramembranaires et leurs voies de signalisation.



**Figure 22 : *Pyrido[4,3-b]quinoxaline* délocalise le GM-CSFR en dehors des radeaux lipidiques**

Les radeaux lipidiques sont marqués par un anti-CTB (en vert) et le récepteur au GM-CSF par un anti-GM-CSFR (en rouge). Au niveau de cellules HOXA9-MEIS1 non traitées (contrôle), le GM-CSFR colocalise avec les radeaux lipidiques. Lorsque les cellules HOXA9-MEIS1 sont traitées par *PyQ* (3,4 $\mu$ M), pendant 10 min, le GM-CSFR est partiellement regroupé en dehors des radeaux lipidiques. Pour les cellules Lin- non traitées, le GM-CSFR est partiellement regroupé en dehors des radeaux lipidiques. Les scores de colocalisation entre le GM-CSFR et le CTB ont été calculés (n > 30 cellules) et représentés sur le graphique de droite.

### ***Pyrido[4,3-b]quinoxaline, un traitement potentiel des leucémies aiguës lymphoblastiques***

La voie du GM-CSF est l'une des voies principales dérégulées lors de la transformation leucémique de notre modèle d'étude. Ainsi, *PyQ* se place comme un inhibiteur potentiel de la voie du GM-CSF dans le traitement des LAM.

Cependant, dans d'autres modèles, d'autres voies sont perturbées. Ainsi, une autre doctorante de l'équipe, Anne Buffière, également sous la supervision de Ronan Quéré, a évalué l'efficacité de *PyQ* sur les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T). En collaboration avec l'équipe de Françoise Pflumio (UMR 967 Inserm/CEA, Fontenay-aux-Roses) des cellules de patients ont été amplifiées *in vivo* par xéno-transplantation dans des souris immunodéficientes NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$  (NSG). L'effet de la molécule a été étudié *in vivo*, mais aussi *ex vivo* sur les cellules de rate et de moelle des souris malades. Ils ont ainsi démontré que *PyQ* induit l'apoptose des cellules LAL-T. Le CD45 étant localisé en dehors des radeaux lipidiques dans les cellules de LAL-T, ils ont recherché le mécanisme d'action impliqué. La voie de l'interleukine 7 (IL-7) est une voie essentielle à la prolifération des lymphocytes T et une suractivation de cette voie semble être retrouvée dans les LAL-T. L'activité du récepteur à l'IL-7 (CD127) est optimale lorsqu'il est localisé dans les radeaux lipidiques, induisant ainsi la phosphorylation du facteur de transcription STAT5.

Anne Buffière et Ronan Quéré ont mis en évidence que le CD127 était colocalisé dans les radeaux lipidiques des cellules de LAL-T et qu'un traitement par *PyQ* provoquait l'exclusion du CD127. Cette délocalisation du CD127 inhibe la voie signalétique de l'IL-7 et les signaux de prolifération qui en découlent.

L'hypothèse selon laquelle l'affinité de *PyQ* pour la membrane plasmique perturbe la fonction de nombreuses protéines intramembranaires et leurs voies de signalisation est donc confirmée. En effet, dans le modèle de cellules LAM, *PyQ* provoque l'exclusion du CD45 en dehors des radeaux lipidiques, affectant ainsi la voie du GM-CSF. Concernant les cellules LAL T, *PyQ* perturbe la localisation du CD127, inhibant donc la voie de l'IL-7. Une étude approfondie des effets secondaires induits par *PyQ* devra donc être menée.

### **Effets secondaires potentiels de *Pyrido[4,3-b]quinoxaline***

L'un des aspects des plus importants restant en suspens correspond aux effets secondaires potentiels que pourrait causer un traitement par *PyQ* sur l'hématopoïèse saine, le microenvironnement médullaire mais également sur l'ensemble des organes.

Nous avons testé une gamme de concentration de *PyQ* sur des lignées cellulaires et montré que les cellules hématopoïétiques humaines sont plus sensibles que les cellules non hématopoïétiques. De plus, lorsque nous mettons les cellules HOXA9-MEIS1 en co-culture avec les cellules murines stromales de la lignée MS5, nous avons remarqué que, lors d'un traitement, les cellules MS5 étaient bien moins affectées par la molécule que les cellules leucémiques. Ceci suggère que l'injection de *PyQ* n'affectera probablement pas le microenvironnement médullaire.

Néanmoins, des tests portant sur la toxicité et les effets secondaires éventuels de *PyQ* devront être menés. Ainsi, nous avons démontré que *PyQ* a une forte affinité pour les membranes plasmiques. *PyQ* n'est donc pas une molécule spécifique, ce qui pourrait limiter son utilisation. En effet, de par sa non spécificité, *PyQ* pourrait affecter l'activité de nombreux récepteurs et leurs voies de signalisation et donc perturber d'éventuelles fonctions biologiques.

A l'heure actuelle, *PyQ* est administrée aux souris par deux injections intra-péritonéales à 3mg/kg, à 3 jours d'intervalle. Il faudra dans un premier temps établir le profil toxicologique de *PyQ* par des analyses de pharmacocinétique et de pharmacodynamique.

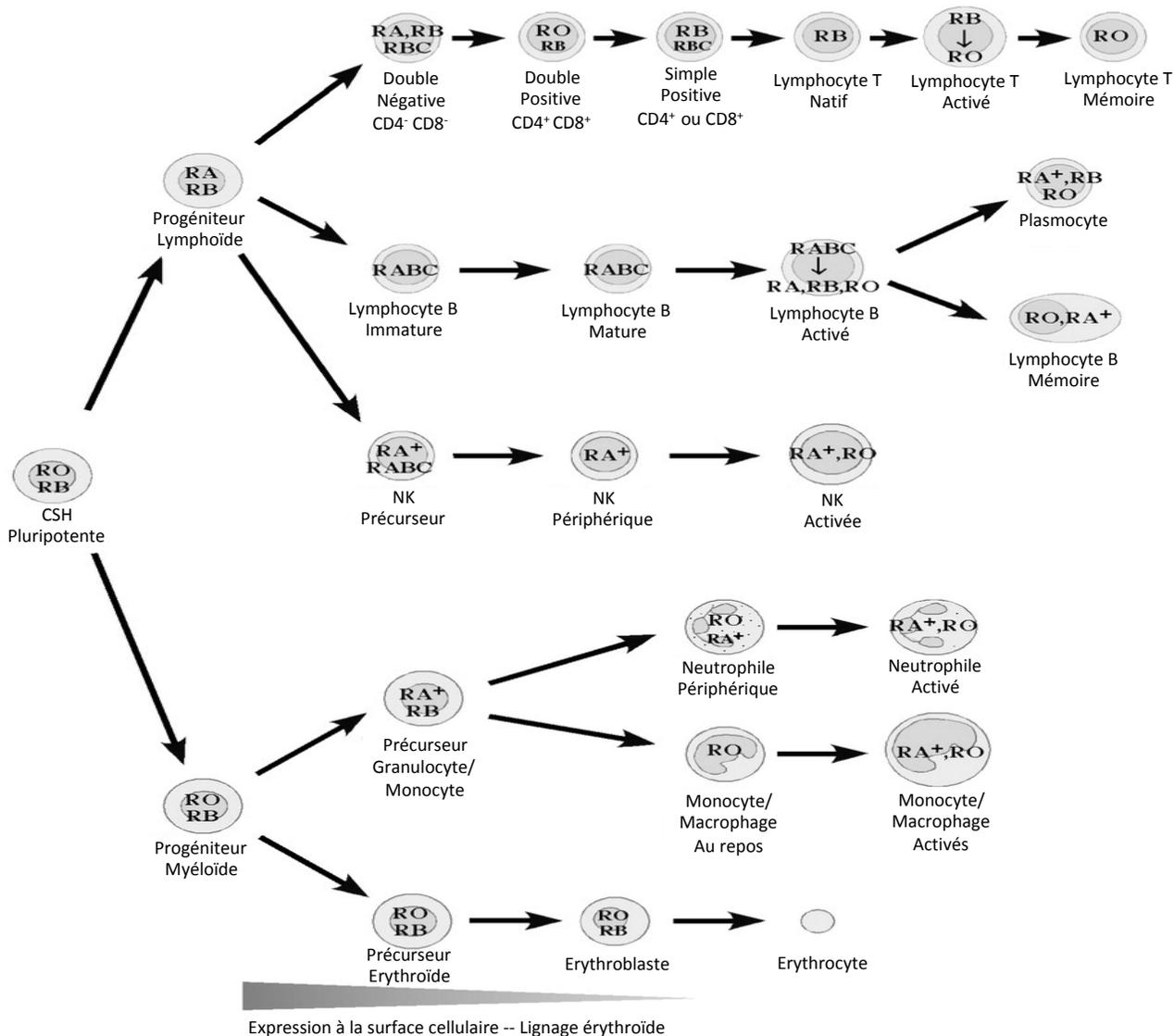
### **La localisation membranaire du CD45 est fonction de ses différentes isoformes**

Les radeaux lipidiques jouent donc un rôle majeur dans la transduction des signaux et contribuent à la modulation des voies de signalisation dans l'hématopoïèse. Leur perturbation peut provoquer des troubles importants parmi lesquels le développement de leucémies. Ainsi, la localisation du CD45 a une importance capitale, puisque, situé dans les radeaux lipidiques, le CD45 déphosphoryle la tyrosine inactivatrice de lyn et soutient ainsi la prolifération cellulaire dépendante du GM-CSF. Lors de la transformation oncogénique, une colocalisation du CD45 au niveau des radeaux lipidiques est observée alors qu'il est situé à l'extérieur dans les cellules saines.

L'épissage alternatif et la glycosylation des différents exons génèrent plusieurs isoformes du CD45 qui semblent avoir une importance déterminante dans sa localisation. Il est probable que la glycosylation du domaine extracellulaire modifie la capacité de translocation du CD45 dans les radeaux lipidiques.

L'équipe de Kawano a montré qu'une stimulation cellulaire avec de l'IL-6 induit la translocation du CD45 dans les radeaux lipidiques d'une manière dépendante des isoformes. Le CD45RO et le CD45RB se regroupent à leur niveau en réponse à l'IL-6, mais pas le CD45RA qui en reste exclus. D'une manière générale, la plus petite isoforme CD45RO transloque plus rapidement que l'isoforme de taille intermédiaire CD45RB, alors que celle de plus grande taille CD45RA n'est pas transloquée dans les radeaux lipidiques. Dans cette étude menée sur des cellules de moelle osseuse de patients atteints d'un myélome, ou de donneurs sains, le CD45 présent dans les radeaux lipidiques agit en tant que régulateur positif de la prolifération dépendante de la voie de l'IL-6. En effet, le CD45 se retrouve à proximité du récepteur à l'IL-6 et de Lyn, localisé dans les radeaux lipidiques, et agit en déphosphorylant la tyrosine inhibitrice de Lyn. Il s'avère que le CD45RO est exprimé dans les cellules de myélome mais pas dans les cellules normales, donnant ainsi aux cellules de myélome une plus grande capacité de réponse à l'IL-6 et donc un avantage prolifératif (Li et al. 2005).

Au cours de l'hématopoïèse normale, le domaine extracellulaire du CD45 est exprimé sous différentes isoformes, en fonction du type cellulaire, du stade de développement et de l'état d'activation de la cellule (Figure 24) ce qui conforte l'idée que les différentes isoformes ont une importance fonctionnelle (Craig et al. 1994; Hermiston, Xu, and Weiss 2003).

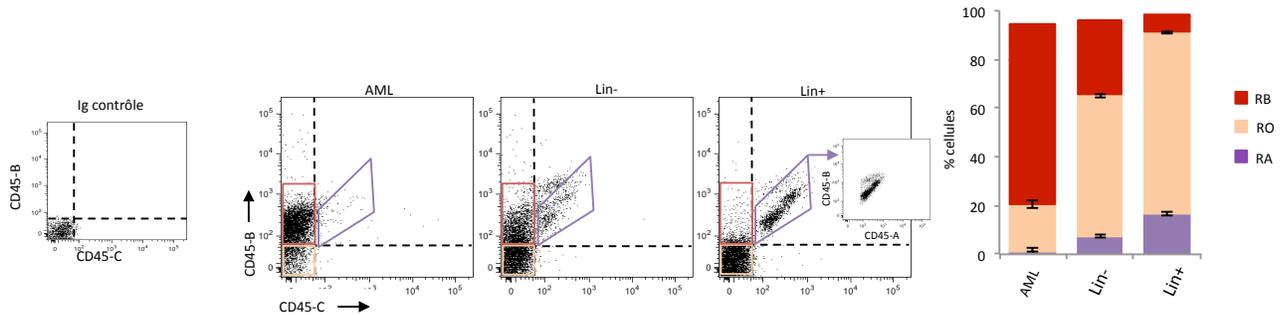


**Figure 24 : Modèles d'expression des isoformes du CD45 à la surface cellulaire, d'après Hermiston, Xu, and Weiss 2003.**

Seules les isoformes prédominantes sont représentées. Les isoformes moins exprimées sont désignées par une taille de police plus petite. Les triangles représentent une expression croissante de la protéine au cours du développement des lignées T, B et myéloïdes et une diminution de l'expression au cours de la différenciation érythroïde, à l'exception des plasmocytes, qui présentent une diminution de l'expression totale du CD45.

Nous avons quantifié l'expression des différentes isoformes à la surface des cellules MEIS-HOXA9 et des cellules murines non transformées Lin<sup>-</sup> et Lin<sup>+</sup>. Les cellules leucémiques

expriment une majorité de CD45RB alors que les cellules Lin<sup>-</sup> expriment essentiellement le CD45RO (Figure 23). En l'absence de stimulation extérieure, le CD45RO n'est pas colocalisé avec les radeaux lipidiques, contrairement au CD45RB dont une partie reste à leur niveau (Li et al. 2005). Ceci pourrait en partie expliquer pourquoi nous observons une colocalisation du CD45 et du CTB dans les cellules MEIS-HOXA9 que nous ne retrouvons pas dans les CSH saines.



**Figure 23 : Les cellules HOXA9-MEIS1 expriment une majorité de CD45RB. Par Ronan Quéré**

L'expression des différentes isoformes du CD45 à la surface cellulaire des cellules HOXA9-MEIS1, Lin<sup>-</sup> et Lin<sup>+</sup> est quantifiée par cytométrie en flux. n = 3.

### Le CD45 utilisé comme marqueur diagnostique

En partant de ce principe, le CD45 pourrait servir de marqueur diagnostique des leucémies. En 1993, l'équipe de Yamaguchi a étudié l'expression des isoformes CD45 RA et RO, par immunofluorescence, sur des échantillons provenant de 78 patients atteints de LAM et ont défini quatre phénotypes distincts : CD45 RA<sup>+</sup>/RO<sup>-</sup>, RA<sup>-</sup>/RO<sup>+</sup>, mixte, et CD45 RA<sup>-</sup>/RO<sup>-</sup>. Les LAM1, LAM2 et LAM3 présentent essentiellement le type CD45 RA<sup>+</sup>/RO<sup>-</sup>, bien qu'un rare sous-type de LAM1 soit de phénotype RA<sup>-</sup>/RO<sup>+</sup>. Les LAM4 sont RA<sup>+</sup> ou RO<sup>+</sup> tandis que la LAM5 est RA<sup>+</sup>/RO<sup>+</sup>. L'expression du CD45RO dans des cellules de patients atteints de LAM2, LAM4 ou LAM5 est associée à des blastes matures dérivés de monocytes ou de granulocytes. Le CD45 étant une protéine tyrosine phosphatase associée à des tyrosine kinases, il a été supposé que le statut fonctionnel et le stade de différenciation des lignées granulo-monocytaires déterminaient le type de tyrosine kinase opérant et donc les isoformes CD45 exprimées (Kawano et al. 1993).

De même, en 1999, une autre équipe a étudié l'expression des isoformes RO et RA, par cytométrie en flux, des cellules de 91 patients atteints de LAM (Miyachi et al. 1999). La comparaison des différentes isoformes et des sous-types de LAM, classées selon le type FAB

confirmèrent en partie l'étude précédente. Ainsi, leur analyse montre une expression du CD45RA dans les LAM0, LAM1, LAM2 et, plus faiblement, dans la LAM3, alors que le CD45RO est absent.

Lorsque les blastes de LAM3 sont traités avec de l'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA), l'expression du CD45RO augmente. Les LAM4 et LAM5 expriment le CD45RA ou le CD45RO, ou, dans de rares cas, les deux. Lorsque les LAM5 sont subdivisées, selon leurs stades de différenciation en LAM monocytaire indifférenciée (LAM5a) et différenciée (LAM5b), l'expression du CD45RA est observée uniquement dans les LAM5a et le CD45RO uniquement dans les LAM5b (Figure 25). Ces résultats suggèrent que l'expression des isoformes du CD45 dans les LAM caractérise les stades de différenciation dans les lignées myélo-monocytaires et est spécifique de chaque sous-type de LAM. L'évaluation de l'expression des isoformes semble donc fournir un aperçu des caractéristiques biologiques de chaque sous-type de LAM (Miyachi et al. 1999).

Sous- types de LAM, classées selon le type FAB	Expression membranaire des isoformes du CD45
LAM0	RA+ RO-
LAM1	RA+ RO-
LAM2	RA+ RO-
LAM3	RA+ ou RO+
LAM4	RA+ ou RO+
LAM5a	RA+
LAM5b	RO+

**Figure 25 : Expression membranaire du CD45 RA et CD45 RO en fonction des sous-types de LAM selon le classement FAB.** D'après (Kawano et al. 1993 et Miyachi et al.)

### **Potentialiser les effets de *Pyrido[4,3-b]quinoxaline***

Actuellement, *PyQ* est administrée seul aux souris, à raison de deux injections intrapéritonéales à 3mg/kg, à 3 jours d'intervalle. Il serait intéressant d'analyser l'effet combinatoire de *PyQ* avec la Doxorubicine utilisée en chimiothérapie. En effet, les effets engendrés par deux molécules sont parfois amplifiés. Ainsi, dans le cadre du traitement des leucémies aiguës promyélocytaires (LAM3), la combinaison d'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA) et d'Arsenic

(trioxyde d'arsenic) à la chimiothérapie a été démontrée comme améliorant considérablement l'effet d'une chimiothérapie seule (Lo-Coco, Cicconi, and Breccia 2016).

Il serait également important de synthétiser des analogues de *PyQ*, afin de rechercher une molécule plus efficace.

## **Conclusion**

Cette étude met donc en évidence l'importance de la localisation des protéines intramembranaires et l'implication des radeaux lipidiques dans le développement des leucémies. Avec la découverte de *PyQ*, nous présentons une nouvelle stratégie dans le développement des LAM. En effet, *PyQ* inhibe la prolifération dépendante de la voie du GM-CSF, suractivée dans les cellules de LAM par délocalisation du CD45 en dehors des radeaux lipidiques.

Ainsi, *PyQ* se place comme une molécule d'intérêt dans le cadre de la mise en place d'un nouveau traitement potentiel des leucémies. En élargissant les perspectives, *PyQ* pourrait également cibler d'autres types de cellules cancéreuses ou bien avoir une utilité thérapeutique dans d'autres pathologies telles que les maladies auto-immunes. En effet, sa haute affinité pour les membranes plasmiques et sa capacité à perturber la fonction des protéines intramembranaires et leurs voies de signalisation pourrait potentiellement inhiber d'autres voies de signalisation suractivées dans différentes pathologies.

Cependant, cette faculté ne présente pas que des bénéfices. Ainsi, un traitement par *PyQ* provoque également la délocalisation du récepteur au GM-CSF en dehors des radeaux lipidiques. *PyQ* pourrait donc moduler d'autres voies de signalisation et provoquer des troubles physiologiques inattendus. A l'heure actuelle, les travaux menés portent uniquement sur la compréhension des mécanismes de signalisation mis en jeu par le traitement par *PyQ* mais il sera essentiel par la suite d'étudier ses éventuels effets secondaires.

Enfin, cette étude permet également d'envisager l'utilisation de la protéine phosphatase CD45 en tant que nouveau marqueur diagnostique des leucémies, puisque l'expression de ses différentes isoformes et sa localisation membranaire semblent être modifiées lors de la transformation oncogénique.

# **Références bibliographiques**

- Abramovich, Carolina, and R. Keith Humphries  
2005 Hox Regulation of Normal and Leukemic Hematopoietic Stem Cells. *Current Opinion in Hematology* 12(3): 210–216.
- Adolfsson, Jörgen, Ole Johan Borge, David Bryder, et al.  
2001 Upregulation of Flt3 Expression within the Bone Marrow Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> Stem Cell Compartment Is Accompanied by Loss of Self-Renewal Capacity. *Immunity* 15(4): 659–669.
- Ahmed, S. N., D. A. Brown, and E. London  
1997 On the Origin of Sphingolipid/Cholesterol-Rich Detergent-Insoluble Cell Membranes: Physiological Concentrations of Cholesterol and Sphingolipid Induce Formation of a Detergent-Insoluble, Liquid-Ordered Lipid Phase in Model Membranes. *Biochemistry* 36(36): 10944–10953.
- Akashi, Koichi, David Traver, Toshihiro Miyamoto, and Irving L. Weissman  
2000 A Clonogenic Common Myeloid Progenitor That Gives Rise to All Myeloid Lineages. *Nature* 404(6774): 193–197.
- Alder, Jonathan K., Robert W. Georgantas, Richard L. Hildreth, et al.  
2008 Kruppel-like Factor 4 Is Essential for Inflammatory Monocyte Differentiation in Vivo. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 180(8): 5645–5652.
- Apostolov, Apostol, Isma Litim-Mecheri, Attila Oravecz, et al.  
2016 Sumoylation Inhibits the Growth Suppressive Properties of Ikaros. *PloS One* 11(6): e0157767.
- Arber, Daniel A., Attilio Orazi, Robert Hasserjian, et al.  
2016 The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *Blood* 127(20): 2391–2405.
- Arranz, Lorena, Antonio Herrera-Merchan, Jose Manuel Ligos, et al.  
2012 Bmi1 Is Critical to Prevent Ikaros-Mediated Lymphoid Priming in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Cycle* (Georgetown, Tex.) 11(1): 65–78.
- Bain, Jenny, Hilary McLauchlan, Matthew Elliott, and Philip Cohen  
2003 The Specificities of Protein Kinase Inhibitors: An Update. *The Biochemical Journal* 371(Pt 1): 199–204.
- Becerra, José, Leonor Santos-Ruiz, José A. Andrades, and Manuel Marí-Beffa  
2010 The Stem Cell Niche Should Be a Key Issue for Cell Therapy in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports* 7(2): 248–255.
- Bilwes, A. M., J. den Hertog, T. Hunter, and J. P. Noel  
1996 Structural Basis for Inhibition of Receptor Protein-Tyrosine Phosphatase-Alpha by

Dimerization. *Nature* 382(6591): 555–559.

Bjorge, J. D., A. Jakymiw, and D. J. Fujita

2000 Selected Glimpses into the Activation and Function of Src Kinase. *Oncogene* 19(49): 5620–5635.

Boggon, Titus J., and Michael J. Eck

2004 Structure and Regulation of Src Family Kinases. *Oncogene* 23(48): 7918–7927.

Bougeret, C., S. Jiang, I. Keydar, and H. Avraham

2001 Functional Analysis of Csk and CHK Kinases in Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276(36): 33711–33720.

Bourguignon, L. Y., S. J. Suchard, M. L. Nagpal, and J. R. Glenney

1985 A T-Lymphoma Transmembrane Glycoprotein (gp180) Is Linked to the Cytoskeletal Protein, Fodrin. *The Journal of Cell Biology* 101(2): 477–487.

Bowie, Michelle B., Kristen D. McKnight, David G. Kent, et al.

2006 Hematopoietic Stem Cells Proliferate until after Birth and Show a Reversible Phase-Specific Engraftment Defect. *Journal of Clinical Investigation* 116(10): 2808–2816.

Bretscher, M. S.

1973 Membrane Structure: Some General Principles. *Science (New York, N.Y.)* 181(4100): 622–629.

Brown, D. A., and J. K. Rose

1992 Sorting of GPI-Anchored Proteins to Glycolipid-Enriched Membrane Subdomains during Transport to the Apical Cell Surface. *Cell* 68(3): 533–544.

Brown, Deborah A.

2006 Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signals. *Physiology (Bethesda, Md.)* 21: 430–439.

Brown, M. T., and J. A. Cooper

1996 Regulation, Substrates and Functions of Src. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1287(2–3): 121–149.

Bryder, David, Derrick J. Rossi, and Irving L. Weissman

2006 Hematopoietic Stem Cells. *The American Journal of Pathology* 169(2): 338–346.

Budel, L. M., I. P. Touw, R. Delwel, S. C. Clark, and B. Löwenberg

1989 Interleukin-3 and Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor Receptors on Human Acute Myelocytic Leukemia Cells and Relationship to the Proliferative Response. *Blood* 74(2): 565–571.

Burgess, A. W., J. Camakaris, and D. Metcalf

1977 Purification and Properties of Colony-Stimulating Factor from Mouse Lung-

Conditioned Medium. *The Journal of Biological Chemistry* 252(6): 1998–2003.

Carr, P. D., S. E. Gustin, A. P. Church, et al.

2001 Structure of the Complete Extracellular Domain of the Common Beta Subunit of the Human GM-CSF, IL-3, and IL-5 Receptors Reveals a Novel Dimer Configuration. *Cell* 104(2): 291–300.

Chatterjee, S., and S. Mayor

2001 The GPI-Anchor and Protein Sorting. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 58(14): 1969–1987.

Chaturvedi, P., S. Sharma, and E. P. Reddy

1997 Abrogation of Interleukin-3 Dependence of Myeloid Cells by the v-Src Oncogene Requires SH2 and SH3 Domains Which Specify Activation of STATs. *Molecular and Cellular Biology* 17(6): 3295–3304.

Chen, H. M., P. Zhang, M. T. Voso, et al.

1995 Neutrophils and Monocytes Express High Levels of PU.1 (Spi-1) but Not Spi-B. *Blood* 85(10): 2918–2928.

Chidiac, P.

1998 Rethinking Receptor-G Protein-Effector Interactions. *Biochemical Pharmacology* 55(5): 549–556.

Chong, Yuh-Ping, Kim Kui Ia, Terrence D. Mulhern, and Heung-Chin Cheng

2005 Endogenous and Synthetic Inhibitors of the Src-Family Protein Tyrosine Kinases. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1754(1–2): 210–220.

Chong, Yuh-Ping, Terrence D. Mulhern, and Heung-Chin Cheng

2005 C-Terminal Src Kinase (CSK) and CSK-Homologous Kinase (CHK)—endogenous Negative Regulators of Src-Family Protein Kinases. *Growth Factors* 23(3): 233–244.

Chong, Yuh-Ping, Terrence D. Mulhern, Hong-Jian Zhu, et al.

2004 A Novel Non-Catalytic Mechanism Employed by the C-Terminal Src-Homologous Kinase to Inhibit Src-Family Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 279(20): 20752–20766.

Coffer, P. J., L. Koenderman, and R. P. de Groot

2000 The Role of STATs in Myeloid Differentiation and Leukemia. *Oncogene* 19(21): 2511–2522.

Craig, W., S. Poppema, M. T. Little, W. Dragowska, and P. M. Lansdorp

1994 CD45 Isoform Expression on Human Haemopoietic Cells at Different Stages of Development. *British Journal of Haematology* 88(1): 24–30.

Daigle, Isabelle, Shida Yousefi, Marco Colonna, Douglas R. Green, and Hans-Uwe Simon

2002 Death Receptors Bind SHP-1 and Block Cytokine-Induced Anti-Apoptotic Signaling

in Neutrophils. *Nature Medicine* 8(1): 61–67.

Danielli, James Frederic, and Hugh Davson

1935 A Contribution to the Theory of Permeability of Thin Films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5(4): 495–508.

Davies, A. A., N. M. Wigglesworth, D. Allan, R. J. Owens, and M. J. Crumpton

1984 Nonidet P-40 Extraction of Lymphocyte Plasma Membrane. Characterization of the Insoluble Residue. *The Biochemical Journal* 219(1): 301–308.

Desai, D. M., J. Sap, J. Schlessinger, and A. Weiss

1993 Ligand-Mediated Negative Regulation of a Chimeric Transmembrane Receptor Tyrosine Phosphatase. *Cell* 73(3): 541–554.

Desai, D. M., J. Sap, O. Silvennoinen, J. Schlessinger, and A. Weiss

1994 The Catalytic Activity of the CD45 Membrane-Proximal Phosphatase Domain Is Required for TCR Signaling and Regulation. *The EMBO Journal* 13(17): 4002–4010.

Devaux, Philippe F., and Roger Morris

2004 Transmembrane Asymmetry and Lateral Domains in Biological Membranes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5(4): 241–246.

Dornan, Saffron, Zsolt Sebestyen, John Gamble, et al.

2002 Differential Association of CD45 Isoforms with CD4 and CD8 Regulates the Actions of Specific Pools of p56lck Tyrosine Kinase in T Cell Antigen Receptor Signal Transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 277(3): 1912–1918.

Farber, D. L., O. Acuto, and K. Bottomly

1997 Differential T Cell Receptor-Mediated Signaling in Naive and Memory CD4 T Cells. *European Journal of Immunology* 27(8): 2094–2101.

Felberg, J., and P. Johnson

1998 Characterization of Recombinant CD45 Cytoplasmic Domain Proteins. Evidence for Intramolecular and Intermolecular Interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 273(28): 17839–17845.

Field, K. A., D. Holowka, and B. Baird

1995 Fc Epsilon RI-Mediated Recruitment of p53/56lyn to Detergent-Resistant Membrane Domains Accompanies Cellular Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(20): 9201–9205.

Frankel, Arthur E., Bayard L. Powell, Philip D. Hall, L. Douglas Case, and Robert J. Kreitman

2002 Phase I Trial of a Novel Diphtheria Toxin/Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Fusion Protein (DT388GMCSF) for Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8(5): 1004–1013.

- Fukuhara, Kenjiro, Meinoshin Okumura, Hiroyuki Shiono, et al.  
2002 A Study on CD45 Isoform Expression during T-Cell Development and Selection Events in the Human Thymus. *Human Immunology* 63(5): 394–404.
- Furukawa, K., Y. Funakoshi, M. Autero, et al.  
1998 Structural Study of the O-Linked Sugar Chains of Human Leukocyte Tyrosine Phosphatase CD45. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 251(1–2): 288–294.
- Gilliland, D. G.  
2001 Hematologic Malignancies. *Current Opinion in Hematology* 8(4): 189–191.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, et al.  
1999 Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *Science* 286(5439): 531–537.
- Guan, Yinghui, Brigitte Gerhard, and Donna E. Hogge  
2003 Detection, Isolation, and Stimulation of Quiescent Primitive Leukemic Progenitor Cells from Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* 101(8): 3142–3149.
- Guarnerio, Jlenia, Marco Bezzi, Jong Cheol Jeong, et al.  
2016 Oncogenic Role of Fusion-circRNAs Derived from Cancer-Associated Chromosomal Translocations. *Cell* 165(2): 289–302.
- Hagmann, J., and P. H. Fishman  
1982 Detergent Extraction of Cholera Toxin and Gangliosides from Cultured Cells and Isolated Membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 720(2): 181–187.
- Hall, P. D., R. J. Kreitman, M. C. Willingham, and A. E. Frankel  
1998 Toxicology and Pharmacokinetics of DT388-GM-CSF, a Fusion Toxin Consisting of a Truncated Diphtheria Toxin (DT388) Linked to Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) in C57BL/6 Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 150(1): 91–97.
- Hall, S. R., B. M. Heffernan, N. T. Thompson, and W. C. Rowan  
1999 CD4+ CD45RA+ and CD4+ CD45RO+ T Cells Differ in Their TCR-Associated Signaling Responses. *European Journal of Immunology* 29(7): 2098–2106.
- Hata, A., H. Sabe, T. Kurosaki, M. Takata, and H. Hanafusa  
1994 Functional Analysis of Csk in Signal Transduction through the B-Cell Antigen Receptor. *Molecular and Cellular Biology* 14(11): 7306–7313.
- Hayami-Noumi, K., T. Tsuchiya, Y. Moriyama, and T. Noumi  
2000 Intra- and Intermolecular Interactions of the Catalytic Domains of Human CD45 Protein Tyrosine Phosphatase. *FEBS Letters* 468(1): 68–72.
- Hayashida, K., T. Kitamura, D. M. Gorman, et al.  
1990 Molecular Cloning of a Second Subunit of the Receptor for Human Granulocyte-

Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF): Reconstitution of a High-Affinity GM-CSF Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(24): 9655–9659.

Hegde, S. P., J. Zhao, R. A. Ashmun, and L. H. Shapiro  
1999 C-Maf Induces Monocytic Differentiation and Apoptosis in Bipotent Myeloid Progenitors. *Blood* 94(5): 1578–1589.

Hercus, Timothy R., Daniel Thomas, Mark A. Guthridge, et al.  
2009 The Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor: Linking Its Structure to Cell Signaling and Its Role in Disease. *Blood* 114(7): 1289–1298.

Hermiston, Michelle L., Zheng Xu, and Arthur Weiss  
2003 CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annual Review of Immunology* 21: 107–137.

Hibbs, Margaret L., and Kenneth W. Harder  
2006 The Duplicitous Nature of the Lyn Tyrosine Kinase in Growth Factor Signaling. *Growth Factors* 24(2): 137–149.

Hoessli, D. C., S. Ilangumaran, A. Soltermann, et al.  
2000 Signaling through Sphingolipid Microdomains of the Plasma Membrane: The Concept of Signaling Platform. *Glycoconjugate Journal* 17(3–4): 191–197.

Hoessli, D. C., and E. Rungger-Brändle  
1983 Isolation of Plasma Membrane Domains from Murine T Lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(2): 439–443.

Hong, In-Sun  
2016a Stimulatory versus Suppressive Effects of GM-CSF on Tumor Progression in Multiple Cancer Types. *Experimental & Molecular Medicine* 48(7): e242.  
2016b Stimulatory versus Suppressive Effects of GM-CSF on Tumor Progression in Multiple Cancer Types. *Experimental & Molecular Medicine* 48(7): e242.

Hubbard, Stevan R., and and Jeffrey H. Till  
2000 Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annual Review of Biochemistry* 69(1): 373–398.

Hunter, T., and J. A. Cooper  
1985 Protein-Tyrosine Kinases. *Annual Review of Biochemistry* 54: 897–930.

Inaba, Mayu, and Yukiko M. Yamashita  
2012 Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness. *Cell Stem Cell* 11(4): 461–469.

Irby, R. B., W. Mao, D. Coppola, et al.  
1999 Activating SRC Mutation in a Subset of Advanced Human Colon Cancers. *Nature*

Genetics 21(2): 187–190.

Ishikawa, H., M. S. Mahmoud, R. Fujii, S. Abroun, and M. M. Kawano  
2000 Proliferation of Immature Myeloma Cells by Interleukin-6 Is Associated with CD45 Expression in Human Multiple Myeloma. *Leukemia & Lymphoma* 39(1–2): 51–55.

Jakupovic, Ira, Victoria L. Grandage, David C. Linch, and Asim Khwaja  
2004 Lack of Effect of the Human GM-CSF Analog E21R on the Survival of Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *Blood* 103(8): 3230–3232.

Jude, Craig D., Leslie Climer, Diyong Xu, et al.  
2007 Unique and Independent Roles for MLL in Adult Hematopoietic Stem Cells and Progenitors. *Cell Stem Cell* 1(3): 324–337.

Kiel, Mark J., Ömer H. Yilmaz, Toshihide Iwashita, et al.  
2005 SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* 121(7): 1109–1121.

Klemsz, Michael J., Scott R. McKercher, Antonio Celada, Charles Van Beveren, and Richard A. Maki  
2008 Pillars Article: The Macrophage and B Cell-Specific Transcription Factor PU.1 Is Related to the Ets Oncogene. *Cell*, 1990. 61: 113-124. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 181(3): 1597–1608.

Kmieciak, Thomas E, and David Shalloway  
1987 Activation and Suppression of pp60c-Src Transforming Ability by Mutation of Its Primary Sites of Tyrosine Phosphorylation. *Cell* 49(1): 65–73.

Knoblich, Juergen A.  
2008 Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* 132(4): 583–597.

Kreitman, R. J., and I. Pastan  
1997 Recombinant Toxins Containing Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Either Pseudomonas Exotoxin or Diphtheria Toxin Kill Gastrointestinal Cancer and Leukemia Cells. *Blood* 90(1): 252–259.

Kroon, E, J Krosl, U Thorsteinsdottir, et al.  
1998 Hoxa9 Transforms Primary Bone Marrow Cells through Specific Collaboration with Meis1a but Not Pbx1b. *The EMBO Journal* 17(13): 3714–3725.

Ku, Chia-Jui, Tomonori Hosoya, Ivan Maillard, and James Douglas Engel  
2012 GATA-3 Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance and Cell-Cycle Entry. *Blood* 119(10): 2242–2251.

Lanza, F., B. Castagnari, G. Rigolin, et al.  
1997 Flow Cytometry Measurement of GM-CSF Receptors in Acute Leukemic Blasts, and Normal Hemopoietic Cells. *Leukemia* 11(10): 1700–1710.

- Lappi, D. A., D. Martineau, P. Sarmientos, et al.  
1993 Characterization of a Saporin Mitotoxin Specifically Cytotoxic to Cells Bearing the Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor. *Growth Factors* (Chur, Switzerland) 9(1): 31-39.
- Larochelle, Andre, Michael Savona, Michael Wiggins, et al.  
2011 Human and Rhesus Macaque Hematopoietic Stem Cells Cannot Be Purified Based Only on SLAM Family Markers. *Blood* 117(5): 1550-1554.
- Latour, S., and A. Veillette  
2001 Proximal Protein Tyrosine Kinases in Immunoreceptor Signaling. *Current Opinion in Immunology* 13(3): 299-306.
- Levy, E. R., E. Parganas, K. Morishita, et al.  
1994 DNA Rearrangements Proximal to the EVI1 Locus Associated with the 3q21q26 Syndrome. *Blood* 83(5): 1348-1354.
- Li, Fu-Jun, Naohiro Tsuyama, Hideaki Ishikawa, et al.  
2005 A Rapid Translocation of CD45RO but Not CD45RA to Lipid Rafts in IL-6-Induced Proliferation in Myeloma. *Blood* 105(8): 3295-3302.
- Li, Li, Hao Jin, Jin Xu, Yuqian Shi, and Zilong Wen  
2011 Irf8 Regulates Macrophage versus Neutrophil Fate during Zebrafish Primitive Myelopoiesis. *Blood* 117(4): 1359-1369.
- Liang, X., A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, et al.  
2001 Heterogeneous Fatty Acylation of Src Family Kinases with Polyunsaturated Fatty Acids Regulates Raft Localization and Signal Transduction. *The Journal of Biological Chemistry* 276(33): 30987-30994.
- Lisanti, M. P., and E. Rodriguez-Boulan  
1990 Glycophospholipid Membrane Anchoring Provides Clues to the Mechanism of Protein Sorting in Polarized Epithelial Cells. *Trends in Biochemical Sciences* 15(3): 113-118.
- Lo-Coco, Francesco, Laura Cicconi, and Massimo Breccia  
2016 Current Standard Treatment of Adult Acute Promyelocytic Leukaemia. *British Journal of Haematology* 172(6): 841-854.
- London, E., and D. A. Brown  
2000 Insolubility of Lipids in Triton X-100: Physical Origin and Relationship to Sphingolipid/Cholesterol Membrane Domains (Rafts). *Biochimica Et Biophysica Acta* 1508(1-2): 182-195.
- Look, A. Thomas  
1997 Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias. *Science*

278(5340): 1059–1064.

Lorenz, Egon, Delta Uphoff, T. R. Reid, and Emma Shelton  
1951 Modification of Irradiation Injury in Mice and Guinea Pigs by Bone Marrow Injections. *Journal of the National Cancer Institute* 12(1): 197–201.

Macdonald, Jennifer L., and Linda J. Pike  
2005 A Simplified Method for the Preparation of Detergent-Free Lipid Rafts. *Journal of Lipid Research* 46(5): 1061–1067.

Mahmoud, M. S., H. Ishikawa, R. Fujii, and M. M. Kawano  
1998 Induction of CD45 Expression and Proliferation in U-266 Myeloma Cell Line by Interleukin-6. *Blood* 92(10): 3887–3897.

Majeti, R., A. M. Bilwes, J. P. Noel, T. Hunter, and A. Weiss  
1998 Dimerization-Induced Inhibition of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Function through an Inhibitory Wedge. *Science (New York, N.Y.)* 279(5347): 88–91.

Majeti, R., Z. Xu, T. G. Parslow, et al.  
2000 An Inactivating Point Mutation in the Inhibitory Wedge of CD45 Causes Lymphoproliferation and Autoimmunity. *Cell* 103(7): 1059–1070.

Mathew, Mrudula, K. C. Zaineb, and Rama Shanker Verma  
2013 GM-CSF-DFF40: A Novel Humanized Immunotoxin Induces Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Apoptosis* 18(7): 882–895.

Mayer, B. J.  
2001 SH3 Domains: Complexity in Moderation. *Journal of Cell Science* 114(7): 1253–1263.

McIntosh, Thomas J., Adriana Vidal, and Sidney A. Simon  
2003 Sorting of Lipids and Transmembrane Peptides between Detergent-Soluble Bilayers and Detergent-Resistant Rafts. *Biophysical Journal* 85(3): 1656–1666.

McKenzie, Joby L., Katsuto Takenaka, Olga I. Gan, Monica Doedens, and John E. Dick  
2007 Low Rhodamine 123 Retention Identifies Long-Term Human Hematopoietic Stem Cells within the Lin-CD34+CD38- Population. *Blood* 109(2): 543–545.

van Meer, G.  
1998 Lipids of the Golgi Membrane. *Trends in Cell Biology* 8(1): 29–33.

Metcalfe, Donald  
2008 Hematopoietic Cytokines. *Blood* 111(2): 485–491.

Miyachi, H., Y. Tanaka, K. Gondo, et al.  
1999 Altered Expression of CD45 Isoforms in Differentiation of Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Hematology* 62(3): 159–164.

- Mori, Hiroshi, Susan M. Colman, Zhijian Xiao, et al.  
2002 Chromosome Translocations and Covert Leukemic Clones Are Generated during Normal Fetal Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(12): 8242–8247.
- Moroco, Jamie A., Jodi K. Craig, Roxana E. Iacob, et al.  
2014a Differential Sensitivity of Src-Family Kinases to Activation by SH3 Domain Displacement. *PLoS One* 9(8): e105629.  
2014b Differential Sensitivity of Src-Family Kinases to Activation by SH3 Domain Displacement. *PLOS ONE* 9(8): e105629.
- Nguyen, C. H., E. Fan, J. F. Riou, et al.  
1995 Synthesis and Biological Evaluation of Amino-Substituted benzo[f]pyrido[4,3-B] and pyrido[3,4-B]quinoxalines: A New Class of Antineoplastic Agents. *Anti-Cancer Drug Design* 10(4): 277–297.
- Nimmo, Rachael A., Gillian E. May, and Tariq Enver  
2015 Primed and Ready: Understanding Lineage Commitment through Single Cell Analysis. *Trends in Cell Biology* 25(8): 459–467.
- Nutt, Stephen L., and Barbara L. Kee  
2007 The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment. *Immunity* 26(6): 715–725.
- Ohvo-Rekilä, Henna, Bodil Ramstedt, Petra Leppimäki, and J. Peter Slotte  
2002 Cholesterol Interactions with Phospholipids in Membranes. *Progress in Lipid Research* 41(1): 66–97.
- Okada, M., S. Nada, Y. Yamanashi, T. Yamamoto, and H. Nakagawa  
1991 CSK: A Protein-Tyrosine Kinase Involved in Regulation of Src Family Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 266(36): 24249–24252.
- Okada, S., H. Nakauchi, K. Nagayoshi, et al.  
1991 Enrichment and Characterization of Murine Hematopoietic Stem Cells That Express c-Kit Molecule. *Blood* 78(7): 1706–1712.
- Park, Linda, Della Friend, Steven Gillis, and David Urdal  
1986 Characterization of the Cell Surface Receptor for Human Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Experimental Medicine* 164(1): 251–262.
- Pawson, Tony  
2004 Specificity in Signal Transduction: From Phosphotyrosine-SH2 Domain Interactions to Complex Cellular Systems. *Cell* 116(2): 191–203.
- Penninger, J. M., J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, and A. J. Oliveira-dos-Santos  
2001 CD45: New Jobs for an Old Acquaintance. *Nature Immunology* 2(5): 389–396.

- Perentesis, J. P., K. G. Waddick, A. E. Bendel, et al.  
1997 Induction of Apoptosis in Multidrug-Resistant and Radiation-Resistant Acute Myeloid Leukemia Cells by a Recombinant Fusion Toxin Directed against the Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3(3): 347–355.
- Pierce, Susan K.  
2002 Lipid Rafts and B-Cell Activation. *Nature Reviews. Immunology* 2(2): 96–105.
- Pike, Linda J.  
2004 Lipid Rafts: Heterogeneity on the High Seas. *The Biochemical Journal* 378(Pt 2): 281–292.  
2006 Rafts Defined: A Report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research* 47(7): 1597–1598.
- Plzak, L. F., W. Fried, L. O. Jacobson, and W. F. Bethard  
1955 Demonstration of Stimulation of Erythropoiesis by Plasma from Anemic Rats Using Fe59. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 46(5): 671–678.
- Powell, L. D., D. Sgroi, E. R. Sjoberg, I. Stamenkovic, and A. Varki  
1993 Natural Ligands of the B Cell Adhesion Molecule CD22 Beta Carry N-Linked Oligosaccharides with Alpha-2,6-Linked Sialic Acids That Are Required for Recognition. *The Journal of Biological Chemistry* 268(10): 7019–7027.
- Rabbitts, Terence H  
2001 Chromosomal Translocation Master Genes, Mouse Models and Experimental Therapeutics. , Published Online: 10 September 2001; | doi:10.1038/sj.onc.1204597 20(40). <http://www.nature.com/gate2.inist.fr/onc/journal/v20/n40/full/1204597a.html>, accessed June 9, 2016.
- Rajendran, Lawrence, Madhan Masilamani, Samuel Solomon, et al.  
2003 Asymmetric Localization of Flotillins/Reggies in Preassembled Platforms Confers Inherent Polarity to Hematopoietic Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(14): 8241–8246.
- Ramstedt, Bodil, and J. Peter Slotte  
2002 Membrane Properties of Sphingomyelins. *FEBS Letters* 531(1): 33–37.
- Renström, Jonas, Monika Kröger, Christian Peschel, and Robert A. J. Oostendorp  
2010 How the Niche Regulates Hematopoietic Stem Cells. *Chemico-Biological Interactions* 184(1–2). *BENZENE 2009-Health Effects and Mechanisms of Bone Marrow Toxicity: Implications for T-AML and the Mode of Action Framework.*: 7–15.
- Reya, Tannishtha, Sean J. Morrison, Michael F. Clarke, and Irving L. Weissman  
2001 Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* 414(6859): 105–111.

Rodgers, W., and J. K. Rose

1996 Exclusion of CD45 Inhibits Activity of p56lck Associated with Glycolipid-Enriched Membrane Domains. *The Journal of Cell Biology* 135(6 Pt 1): 1515–1523.

Rosenbauer, Frank, and Daniel G. Tenen

2007 Transcription Factors in Myeloid Development: Balancing Differentiation with Transformation. *Nature Reviews Immunology* 7(2): 105–117.

Roskoski Jr., Robert

2015 Src Protein-Tyrosine Kinase Structure, Mechanism, and Small Molecule Inhibitors. *Pharmacological Research* 94: 9–25.

Rous, Peyton

1911 A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *The Journal of Experimental Medicine* 13(4): 397–411.

Saint-Paul, Laetitia, Chi-Hung Nguyen, Anne Buffière, et al.

2016 CD45 Phosphatase Is Crucial for Human and Murine Acute Myeloid Leukemia Maintenance through Its Localization in Lipid Rafts. *Oncotarget*.

Sato, T., K. Furukawa, M. Autero, C. G. Gahmberg, and A. Kobata

1993 Structural Study of the Sugar Chains of Human Leukocyte Common Antigen CD45. *Biochemistry* 32(47): 12694–12704.

Scandura, Joseph M, Piernicola Boccuni, Jorg Cammenga, and Stephen D Nime

2002 Transcription Factor Fusions in Acute Leukemia: Variations on a Theme. ,  
Published Online: 15 May 2002; | doi:10.1038/sj.onc.1205315 21(21).  
<http://www.nature.com/gate2.inist.fr/onc/journal/v21/n21/full/1205315a.html>, accessed June 9, 2016.

Scapini, Patrizia, Shalini Pereira, Hong Zhang, and Clifford A. Lowell

2009 Multiple Roles of Lyn Kinase in Myeloid Cell Signaling and Function. *Immunological Reviews* 228(1): 23–40.

Scheijen, Blanca, and Griffin James D

2002 Tyrosine Kinase Oncogenes in Normal Hematopoiesis and Hematological Disease. ,  
Published Online: 15 May 2002; | doi:10.1038/sj.onc.1205317 21(21).  
<http://www.nature.com/gate2.inist.fr/onc/journal/v21/n21/full/1205317a.html>, accessed June 9, 2016.

Schindler, Thomas, Frank Sicheri, Alexander Pico, et al.

1999 Crystal Structure of Hck in Complex with a Src Family–Selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *Molecular Cell* 3(5): 639–648.

Schroeder, F., G. Nemezc, W. G. Wood, et al.

1991 Transmembrane Distribution of Sterol in the Human Erythrocyte. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1066(2): 183–192.

- Scott, L. M., C. I. Civin, P. Rorth, and A. D. Friedman  
1992 A Novel Temporal Expression Pattern of Three C/EBP Family Members in Differentiating Myelomonocytic Cells. *Blood* 80(7): 1725–1735.
- Sengupta, Prabuddha, Barbara Baird, and David Holowka  
2007 Lipid Rafts, Fluid/Fluid Phase Separation, and Their Relevance to Plasma Membrane Structure and Function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18(5): 583–590.
- Shi, Yufang, Catherine H. Liu, Arthur I. Roberts, et al.  
2006 Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) and T-Cell Responses: What We Do and Don't Know. *Cell Research* 16(2): 126–133.
- Sieweke, M. H., H. Tekotte, J. Frampton, and T. Graf  
1996 MafB Is an Interaction Partner and Repressor of Ets-1 That Inhibits Erythroid Differentiation. *Cell* 85(1): 49–60.
- Simons, K., and J. Gruenberg  
2000 Jamming the Endosomal System: Lipid Rafts and Lysosomal Storage Diseases. *Trends in Cell Biology* 10(11): 459–462.
- Simons, K., and E. Ikonen  
1997 Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* 387(6633): 569–572.
- Simons, Kai, and Derek Toomre  
2000 Lipid Rafts and Signal Transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1(1): 31–39.
- Singer, S. J., and G. L. Nicolson  
1972 The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (New York, N.Y.)* 175(4023): 720–731.
- Smaby, J. M., M. Momsen, V. S. Kulkarni, and R. E. Brown  
1996 Cholesterol-Induced Interfacial Area Condensations of Galactosylceramides and Sphingomyelins with Identical Acyl Chains. *Biochemistry* 35(18): 5696–5704.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, and I. L. Weissman  
1988 Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells. *Science* 241(4861): 58–62.
- Spradling, Allan, Daniela Drummond-Barbosa, and Toshie Kai  
2001 Stem Cells Find Their Niche. *Nature* 414(6859): 98–104.
- Staal, F. J., F. Weerkamp, A. W. Langerak, R. W. Hendriks, and H. C. Clevers  
2001 Transcriptional Control of T Lymphocyte Differentiation. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 19(3): 165–179.

- Stamenkovic, I., D. Sgroi, A. Aruffo, M. S. Sy, and T. Anderson  
1991 The B Lymphocyte Adhesion Molecule CD22 Interacts with Leukocyte Common Antigen CD45RO on T Cells and Alpha 2-6 Sialyltransferase, CD75, on B Cells. *Cell* 66(6): 1133–1144.
- Sun, Q., K. Jones, B. McClure, et al.  
1999 Simultaneous Antagonism of Interleukin-5, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Interleukin-3 Stimulation of Human Eosinophils by Targetting the Common Cytokine Binding Site of Their Receptors. *Blood* 94(6): 1943–1951.
- Symons, A., A. C. Willis, and A. N. Barclay  
1999 Domain Organization of the Extracellular Region of CD45. *Protein Engineering* 12(10): 885–892.
- Takeda, A., J. J. Wu, and A. L. Maizel  
1992 Evidence for Monomeric and Dimeric Forms of CD45 Associated with a 30-kDa Phosphorylated Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 267(23): 16651–16659.
- Thomas, M. L.  
1989 The Leukocyte Common Antigen Family. *Annual Review of Immunology* 7(1): 339–369.
- Till J E & McCulloch E A. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat. Res.* 14:213-22, 1961. - A1979HP46800001.pdf  
N.d. <http://garfield.library.upenn.edu/classics1979/A1979HP46800001.pdf>, accessed May 25, 2016.
- Till, J. E., and E. A. McCULLOCH  
1961 A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* 14: 213–222.
- Tocanne, J. F., L. Cézanne, A. Lopez, et al.  
1994 Lipid Domains and Lipid/Protein Interactions in Biological Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 73(1–2): 139–158.
- Tonks, N. K., H. Charbonneau, C. D. Diltz, E. H. Fischer, and K. A. Walsh  
1988 Demonstration That the Leukocyte Common Antigen CD45 Is a Protein Tyrosine Phosphatase. *Biochemistry* 27(24): 8695–8701.
- Trowbridge, I. S., and M. L. Thomas  
1994a CD45: An Emerging Role as a Protein Tyrosine Phosphatase Required for Lymphocyte Activation and Development. *Annual Review of Immunology* 12: 85–116.  
1994b CD45: An Emerging Role as a Protein Tyrosine Phosphatase Required for Lymphocyte Activation and Development. *Annual Review of Immunology* 12: 85–116.
- Virts, E., D. Barritt, and W. C. Raschke

- 1998 Expression of CD45 Isoforms Lacking Exons 7, 8 and 10. *Molecular Immunology* 35(3): 167–176.
- Vogel, Daphne Y. S., Judith E. Glim, Andrea W. D. Stavenuiter, et al.  
2014 Human Macrophage Polarization in Vitro: Maturation and Activation Methods Compared. *Immunobiology* 219(9): 695–703.
- de Vos, A. M., M. Ultsch, and A. A. Kossiakoff  
1992 Human Growth Hormone and Extracellular Domain of Its Receptor: Crystal Structure of the Complex. *Science (New York, N.Y.)* 255(5042): 306–312.
- Walker, F, and A W Burgess  
1985 Specific Binding of Radioiodinated Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor to Hemopoietic Cells. *The EMBO Journal* 4(4): 933–939.
- Walzel, H., U. Schulz, P. Neels, and J. Brock  
1999 Galectin-1, a Natural Ligand for the Receptor-Type Protein Tyrosine Phosphatase CD45. *Immunology Letters* 67(3): 193–202.
- Wang, Dongxia, Walter J. Esselman, and Philip A. Cole  
2002 Substrate Conformational Restriction and CD45-Catalyzed Dephosphorylation of Tail Tyrosine-Phosphorylated Src Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 277(43): 40428–40433.
- Wei, S., J. H. Liu, P. K. Epling-Burnette, et al.  
1996 Critical Role of Lyn Kinase in Inhibition of Neutrophil Apoptosis by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Immunology* 157(11): 5155–5162.
- Wells, J. A., and A. M. de Vos  
1996 Hematopoietic Receptor Complexes. *Annual Review of Biochemistry* 65: 609–634.
- Williams, J. C., R. K. Wierenga, and M. Saraste  
1998 Insights into Src Kinase Functions: Structural Comparisons. *Trends in Biochemical Sciences* 23(5): 179–184.
- Woolthuis, Carolien M., and Christopher Y. Park  
2016 Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Commitment to the Megakaryocyte Lineage. *Blood* 127(10): 1242–1248.
- Wu, Liangtang, Jun Fu, and Shi-Hsiang Shen  
2002 SKAP55 Coupled with CD45 Positively Regulates T-Cell Receptor-Mediated Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 22(8): 2673–2686.
- Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed  
1998 Membrane Compartmentation Is Required for Efficient T Cell Activation. *Immunity* 8(6): 723–732.

- Xu, W. Q., S. C. Harrison, and M. J. Eck  
1997 Three-Dimensional Structure of the Tyrosine Kinase c-Src. *Nature* 385(6617): 595–602.
- Xu, Wenqing, Amish Doshi, Ming Lei, Michael J Eck, and Stephen C Harrison  
1999 Crystal Structures of c-Src Reveal Features of Its Autoinhibitory Mechanism. *Molecular Cell* 3(5): 629–638.
- Yamamoto, Ryo, Yohei Morita, Jun Ooehara, et al.  
2013 Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells. *Cell* 154(5): 1112–1126.
- Yamanaka, R., C. Barlow, J. Lekstrom-Himes, et al.  
1997 Impaired Granulopoiesis, Myelodysplasia, and Early Lethality in CCAAT/Enhancer Binding Protein Epsilon-Deficient Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(24): 13187–13192.
- Yeagle, P. L.  
1985 Cholesterol and the Cell Membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta* 822(3–4): 267–287.
- Yeziel, E., Y. I. Henis, and Y. Barenholz  
1986 Aging of Rat Heart Fibroblasts: Relationship between Lipid Composition, Membrane Organization and Biological Properties. *Biochimica Et Biophysica Acta* 859(1): 95–104.
- Yousefi, S., D. C. Hoessli, K. Blaser, G. B. Mills, and H. U. Simon  
1996 Requirement of Lyn and Syk Tyrosine Kinases for the Prevention of Apoptosis by Cytokines in Human Eosinophils. *The Journal of Experimental Medicine* 183(4): 1407–1414.
- Yu, Vionnie W. C., and David T. Scadden  
N.d. Heterogeneity of the Bone Marrow Niche. [Review]. *Current Opinion in Hematology*.
- Yuan, Y., L. Zhou, T. Miyamoto, et al.  
2001 AML1-ETO Expression Is Directly Involved in the Development of Acute Myeloid Leukemia in the Presence of Additional Mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(18): 10398–10403.

# Annexes

# CD45 phosphatase is crucial for human and murine acute myeloid leukemia maintenance through its localization in lipid rafts

Laetitia Saint-Paul<sup>1,2</sup>, Chi-Hung Nguyen<sup>3</sup>, Anne Buffière<sup>1,2</sup>, Jean-Paul Pais de Barros<sup>2,4</sup>, Arlette Hammann<sup>5</sup>, Corinne Landras-Guetta<sup>3</sup>, Rodolphe Filomenko<sup>6</sup>, Marie-Lorraine Chrétien<sup>1,2,7</sup>, Pauline Johnson<sup>8</sup>, Jean-Noël Bastie<sup>1,2,7</sup>, Laurent Delva<sup>1,2</sup> and Ronan Quéré<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Inserm UMR866, Université Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France

<sup>2</sup> LipSTIC Labex, Dijon, France

<sup>3</sup> Institut Curie, PSL Research University, UMR9187–U1196, CNRS-Institut Curie, Inserm, Centre Universitaire, Orsay, France

<sup>4</sup> Plateforme de lipidomique, Université Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France

<sup>5</sup> Plateforme de cytométrie, Université Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France

<sup>6</sup> INRA, UMR1324, Dijon, France

<sup>7</sup> Hôpital Universitaire François-Mitterrand, Service d'Hématologie Clinique, Dijon, France

<sup>8</sup> Department of Microbiology and Immunology, Life Sciences Institute, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

**Correspondence to:** Ronan Quéré, **email:** [ronan.quere@inserm.fr](mailto:ronan.quere@inserm.fr)

**Keywords:** acute myeloid leukemia, CD45 phosphatase, lipid rafts, hematopoietic cells, oncogenic transformation

**Received:** July 20, 2016

**Accepted:** August 20, 2016

**Published:** August 25, 2016

## ABSTRACT

**CD45 is a pan-leukocyte protein with tyrosine phosphatase activity involved in the regulation of signal transduction in hematopoiesis. Exploiting CD45 KO mice and lentiviral shRNA, we prove the crucial role that CD45 plays in acute myeloid leukemia (AML) development and maintenance. We discovered that CD45 does not colocalize with lipid rafts on murine and human non-transformed hematopoietic cells. Using a mouse model, we proved that CD45 positioning within lipid rafts is modified during their oncogenic transformation to AML. CD45 colocalized with lipid rafts on AML cells, which contributes to elevated GM-CSF signal intensity involved in proliferation of leukemic cells. We furthermore proved that the GM-CSF/Lyn/Stat3 pathway that contributes to growth of leukemic cells could be profoundly affected, by using a new plasma membrane disrupting agent, which rapidly delocalized CD45 away from lipid rafts. We provide evidence that this mechanism is also effective on human primary AML samples and xenograft transplantation. In conclusion, this study highlights the emerging evidence of the involvement of lipid rafts in oncogenic development of AML and the targeting of CD45 positioning among lipid rafts as a new strategy in the treatment of AML.**

## INTRODUCTION

CD45 is a member of the protein tyrosine phosphatase (PTP) family expressed on all hematopoietic cells, except mature erythrocytes and platelets. CD45 dephosphorylates Src kinases involved in the regulation of several cytokine-receptor signal transduction pathways, such as the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). GM-CSF receptor activation and

downstream signaling is a key driver in the pathogenesis of acute myeloid leukemia (AML). GM-CSF receptor is expressed in more than 80% of AML patients' blast cells [1-3]. AML shows evidence of autocrine production of the cytokine and overexpression of its receptor [4, 5]. Constitutive activation of GM-CSF survival pathway has also been reported in AML [6]. GM-CSF induces anti-apoptotic signals in acute myeloid leukemia (AML) [7]. Stat transcription factors are essential for GM-

CSF-regulated processes and constitutive activation of this pathway results in enhanced transcription of anti-apoptotic, survival and cell cycle progression genes, which contribute to the pathogenesis of various myeloid leukemias [8]. Different strategies have also been employed to inhibit the GM-CSF receptor on AML blasts [9, 10].

In myeloid cells, CD45 regulates Lyn (Src) on its tyrosine inhibitory site (Y507), and phosphorylation at this site correlates with inefficient signaling through the GM-CSF receptor [11-13]. The localization of CD45 phosphatase within or outside plasma-membrane lipid rafts is crucial for dephosphorylation of Src family kinases, and while this regulation has been thoroughly studied for normal lymphocyte maturation and activation in the immune response [14-16], very few studies have investigated myeloid cells, and even fewer in the context of leukemogenesis.

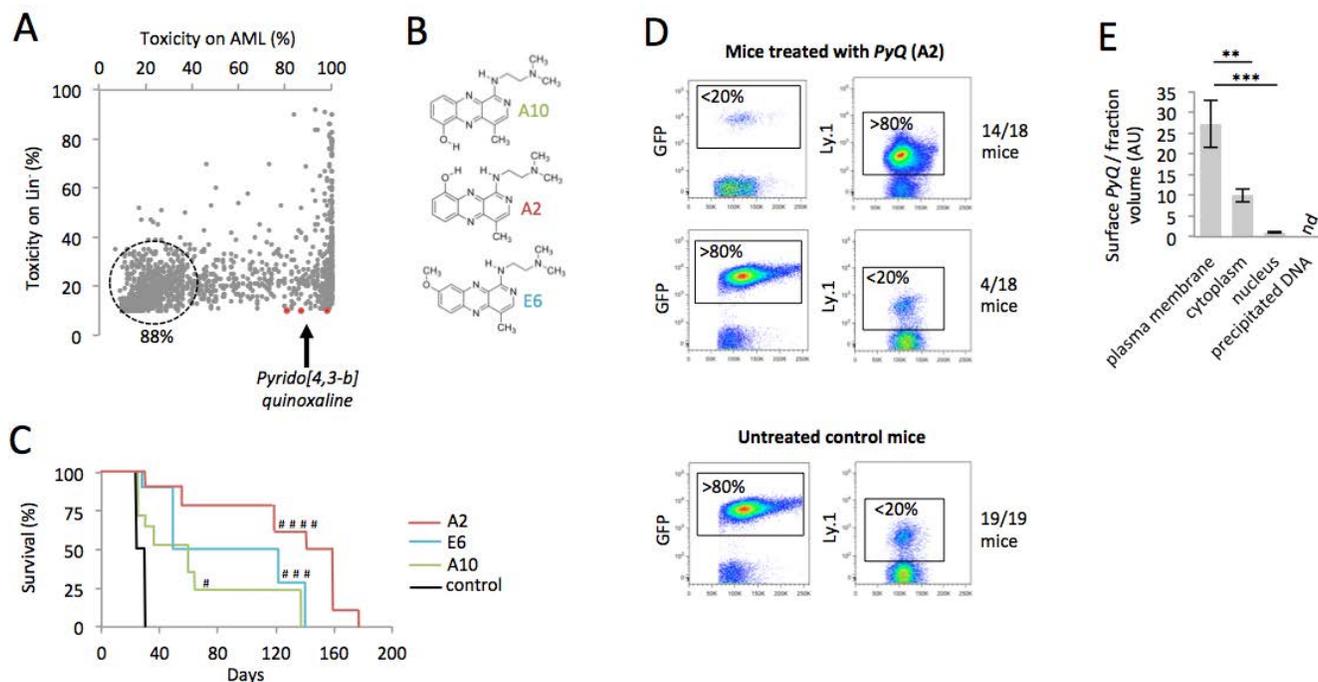
Using a well-recognized mouse model, human primary samples and a xenograft model, we discovered that a new plasma membrane binding agent belonging to the *Pyrido [4,3-b]quinoxaline (PyQ)* family blocks the GM-CSF-dependent proliferation of AML leukemic cells. This molecular mechanism is unique because CD45, which is mainly found within plasma-membrane lipid

rafts on AML cells, is rapidly delocalized after treatment and therefore the effect of its phosphatase activity is subsequently profoundly affected. Interestingly, given the fact that CD45 is not localized within lipid rafts of non-transformed murine and human hematopoietic cells, lower toxicity is observed in normal primitive hematopoietic cells.

## RESULTS

### A new chemical compound affects growth of leukemic cells, but does not impact normal hematopoiesis

Homeobox genes and the cofactor MEIS1 have been directly implicated in hematological malignancies [17-19]. We therefore used bone marrow (BM) transplantation experiments and performed retroviral transduction of lineage-negative (Lin<sup>-</sup>) cells for coexpression of human HOXA9 and MEIS1 genes, to induce rapid development of AML, ~2 months after transplantation. In order to identify new drugs for the treatment of AML, we analyzed the toxicity of more than 7,400 indole compounds on



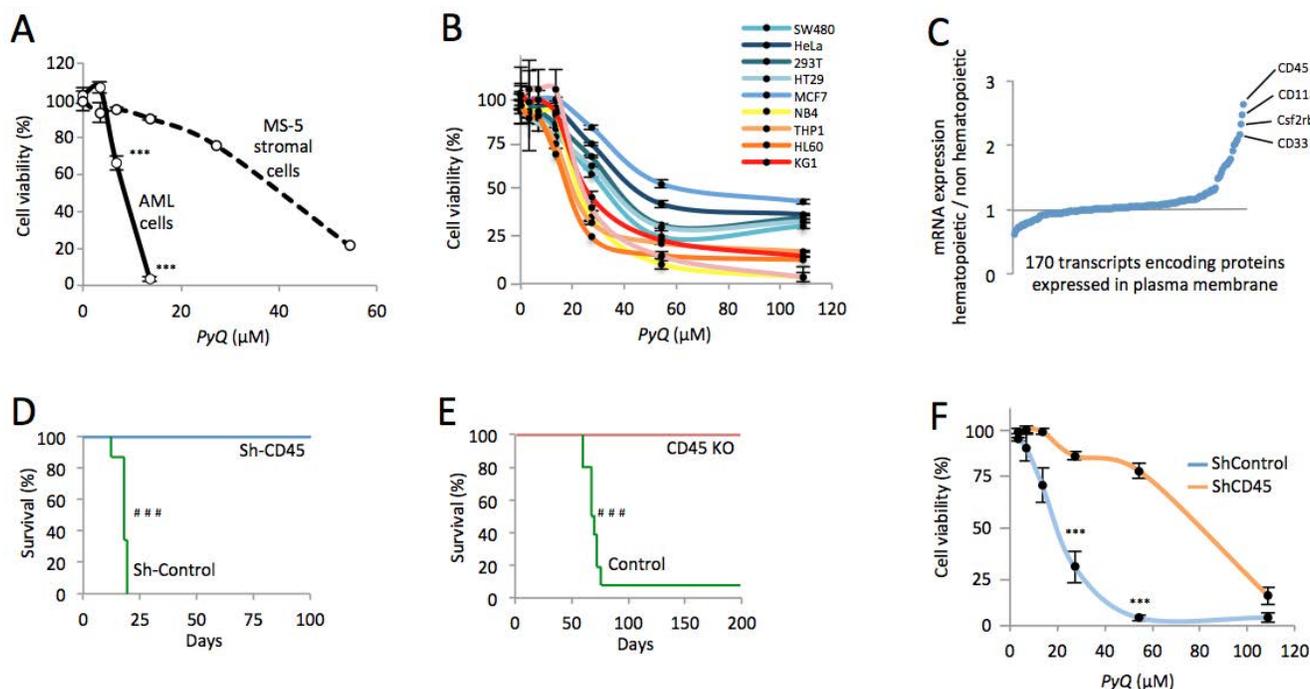
**Figure 1: A chemical compound binding to plasma membrane exhibits toxicity on AML cells.** **A.** Scatter plot showing the toxicity of more than 7,400 indole chemical compounds (10ng/mL) after 18 hours of *in vitro* culture on HOXA9-MEIS1 and Lin<sup>-</sup> cells. **B.** Chemical structures of the PyQ compounds A2, E6 and A10. **C.** Kaplan-Meier survival curves of HOXA9-MEIS1 mice treated with A2, E6 or A10 (3mg/Kg), compared with control groups. Control; n = 19 mice, A10; n = 17 mice, E6; n = 10 mice, A2; n = 18 mice from two different donors. **D.** Quantification by flow cytometry of the leukemic cells (GFP<sup>+</sup>) and hematopoietic cells (Ly.1) in peripheral blood, 21 days after the transplantation. Mice were treated with compound A2; n = 18. Untreated control mice; n = 19. **E.** Localization of PyQ (A2) by HPLC chromatography in different subcellular compartments of THP1 cells showing important binding of PyQ to plasma membrane, n = 3 biological samples. Mean ± SEM. nd, not detected, \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; measured by Student's unpaired t test. #, P < 0.1; ###, P < 0.001; ####, P < 0.0001; measured by the Mantel Haenszel logrank test, compared with control group.

HOXA9-MEIS1-transformed cells *in vitro*. We based our broad compound selection on high specificity for AML cells, with little effect on Lin<sup>-</sup> (Figure 1A). We identified three compounds (A2, E6 and A10; Figure 1B), belonging to the *Pyrido [4,3-b]quinoxaline* family. We then tested the effect of these compounds *in vivo* to evaluate their ability to block the development of leukemia. AML cells ( $5 \times 10^4$  GFP<sup>+</sup> cells) were transplanted in competition with Lin<sup>-</sup> hematopoietic cells ( $5 \times 10^4$  congenic Ly.1) into the tail vein of lethally irradiated recipients. Survival analyses showed that mice treated with *PyQ* survived significantly longer than untreated control mice, and it turned out that A2 was the best compound (Figure 1C). When AML growth was monitored *via* peripheral blood (PB) analysis, three weeks post-transplant, we observed that the untreated control mice had rapidly developed AML (> 80% of GFP<sup>+</sup> leukemic cells in PB), while mice treated with *PyQ* displayed a smaller number of leukemic cells (< 20%), and significantly reconstituted hematopoiesis with healthy hematopoietic cells (> 80%) (Figure 1D). Low toxicity

was furthermore detected on primitive hematopoietic stem cells and progenitors in BM when the compound was injected *in vivo* (Supplementary Figure S1).

### CD45 hematopoietic cells are more sensitive to *Pyrido [4,3-b]quinoxaline*, which target plasma membrane

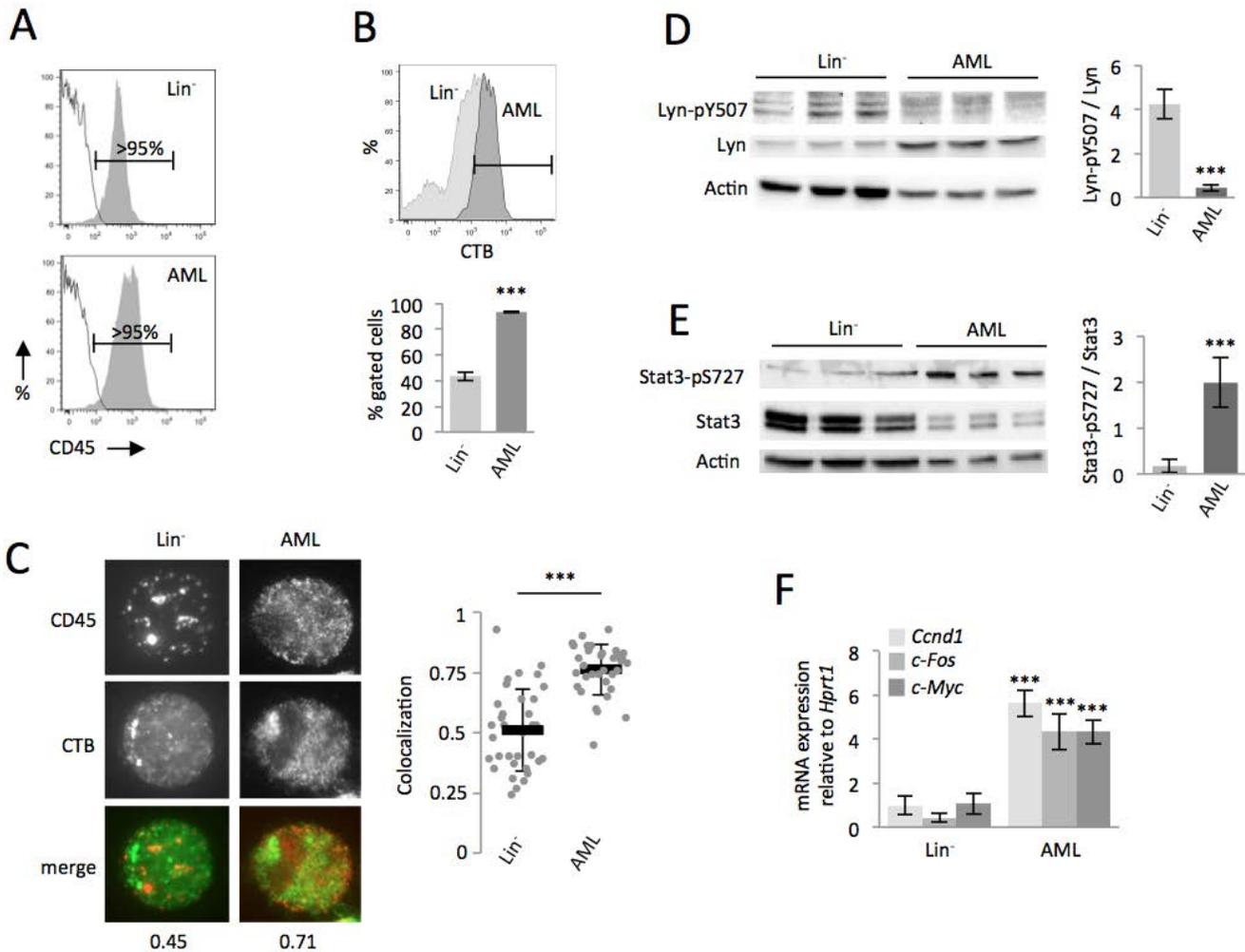
We next wanted to understand clearly the intracellular effect induced by this compound. By chromatography performed on different subcellular compartments (Figure 1E), the compound was not detectable in precipitated DNA and no effect was observed on cell cycle activity (Supplementary Figure S2) rejecting the hypothesis that *PyQ* could block replication by intercalating DNA. We furthermore excluded the possibility that *PyQ* could be an inhibitor of kinases (Supplementary Figure S3). In contrast, we interestingly pointed out that *PyQ* interacted strongly with the plasma



**Figure 2: CD45 expression is essential for AML and hematopoietic cells expressing CD45 are more sensitive to *Pyrido [4,3-b]quinoxaline*.** **A.** HOXA9-MEIS1 cells were grown on MS-5 stromal feeder cells *in vitro*, then treated with *PyQ*. Cell viabilities were measured at different concentrations and data were normalized to untreated control. **B.** Human hematopoietic cell lines were more sensitive to *PyQ*, compared with non-hematopoietic human cell lines,  $n = 4$  biological replicates. **C.** Expression of > 170 mRNA encoding proteins known to be localized in plasma membrane, in hematopoietic cell lines (mean values from NB4, HL60, THP1, KG1 and U937), compared with non-hematopoietic cells (mean values from HeLa, SW480, HT29 and MCF7). Data were obtained by computational analysis of the GSE57083 microarray study. **D.** Using shRNA lentivirus, CD45 was knocked down in AML cells and transplanted into lethally irradiated recipient mice. Kaplan-Meier survival curves showing that CD45 was critical for the maintenance of HOXA9-MEIS1 cells, Sh-Control;  $n = 8$  mice, Sh-CD45;  $n = 8$  mice. **E.** Deficiency in CD45 expression completely prevented CD45 KO primitive hematopoietic cells from leukemic transformation. Kaplan-Meier survival curves, Control;  $n = 10$  mice, CD45 KO;  $n = 10$  mice. **F.** THP1 cells were transduced with shRNA lentiviral particles (Sh-CD45 or Sh-Control) and treated with different concentrations of *PyQ* for 4 days. Sh-CD45 THP1 cells had lost their sensitivity to *PyQ*, compared with the control line,  $n = 3$  biological replicates. Mean  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $P < 0.001$ ; measured by Student's unpaired  $t$  test. ####,  $P < 0.001$ ; measured by the Mantel Haenszel logrank test.

membrane, with low diffusion into the nucleus (Figure 1E). We confirmed the interaction between *PyQ* and artificially made membranes (Supplementary Figure S4). We hypothesized that *PyQ*, by binding the plasma membrane, might affect the function of intramembranous proteins and their downstream signaling. When we treated HOXA9-MEIS1 cells cultured on MS-5-stromal cells, we surprisingly observed that *PyQ* had a far stronger effect on leukemic cells than on stromal feeder cells (Figure 2A), and it turned out that human hematopoietic cell lines were more sensitive than non-hematopoietic cells (Figure 2B). We therefore analyzed cell surface proteins that were specifically found expressed by hematopoietic

cells (Figure 2C). The most expressed, CD45, is a pan-leukocyte protein with tyrosine phosphatase activity involved in the regulation of several cytokine receptors that control cell growth and proliferation. CD45 is important for the homing and engraftment of leukemic cells [20]. Inhibition of CD45 expression by shRNA lentivirus (Supplementary Figure S5A) prevented AML cells from causing leukemia (Figure 2D and Supplementary Figure S5B), which clearly demonstrates that CD45 expression is essential for the maintenance of AML cells. The deficiency in CD45 expression (CD45KO cells) completely prevented primitive hematopoietic cells from leukemia transformation, demonstrating that CD45



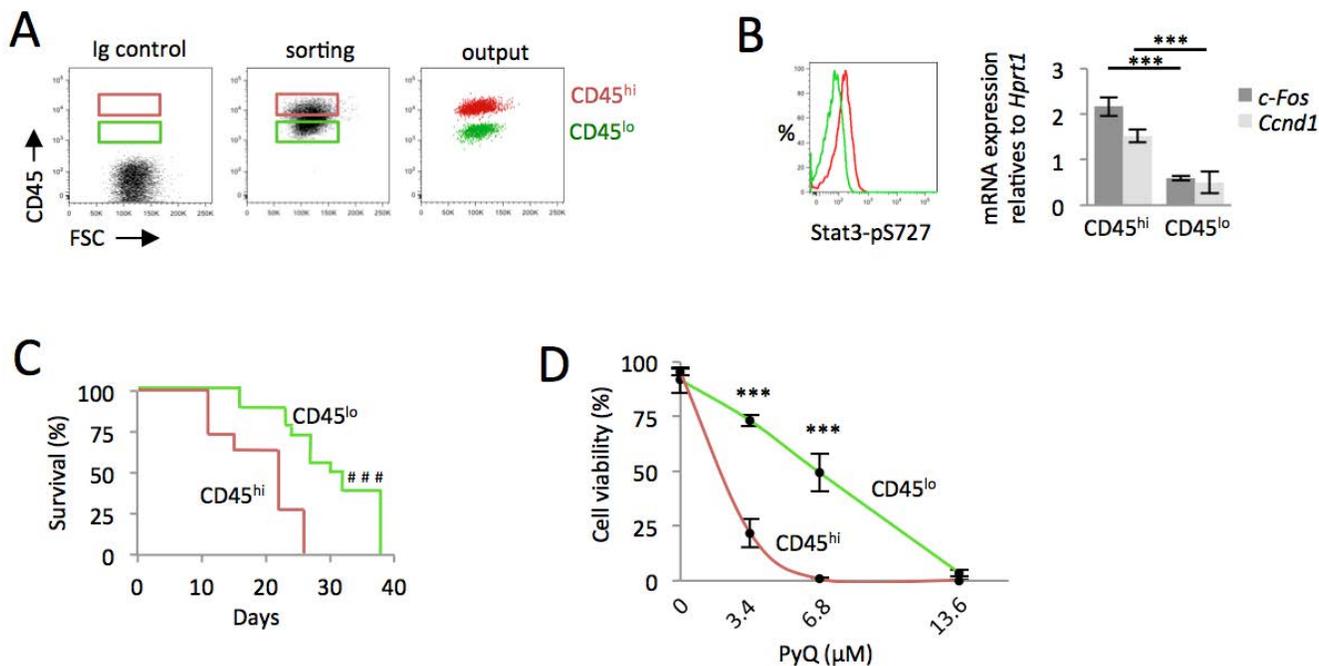
**Figure 3: Compared with the non-transformed hematopoietic cells, CD45 colocalized within lipid rafts in AML cells, which enhanced the Lyn/Stat3 pathway.** **A.** Both  $Lin^-$  and AML cells expressed high levels of CD45. **B.** Compared with  $Lin^-$  cells, AML cells are enriched in lipid rafts, as assessed by flow cytometry, with staining with the cholera toxin subunit B (CTB). **C.** Data showing that CD45 colocalized within lipid rafts (CTB) on AML, but not on  $Lin^-$  cells. Examples of single cell immunostaining were shown on the left panel. Colocalization scores between CD45 and CTB were reported below the immunostaining. Colocalization means were calculated ( $n > 30$  cells) and represented on the right panel. **D.** On AML cells, CD45 phosphatase localization in lipid rafts increased its activity, which was assessed by decreased phosphorylation of Lyn (Y507), shown by WB,  $n = 3$  biological replicates. **E.** The Stat3 pathway is highly activated in AML cells compared with  $Lin^-$  cells, as assessed by the increased phosphorylation (S727) of Stat3, shown by WB,  $n = 3$  biological replicates. **F.** RT-qPCR showing increased transcription of specific Stat3-target genes,  $n = 3$  biological replicates. Mean  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $P < 0.001$ ; measured by Student's unpaired  $t$  test.

is critical for the development of AML (Figure 2E and Supplementary Figure S5C). Using shRNA lentiviral transduction, we generated CD45 knocked down THP1 cells (Supplementary Figure S6) that had lost their sensitivity to *PyQ* and confirmed that CD45 was required for the inhibitory effect on leukemic cells (Figure 2F).

### CD45 is differently organized on the cell surface of non-transformed hematopoietic cells compared to leukemia-transformed cells

We next investigated whether the non-transformed cells were less sensitive than AML cells to *PyQ*. The proportion of CD45 could not explain this difference since expression levels were similar (Figure 3A). Lipid rafts are cholesterol- and glycosphingolipid-enriched patches located in the plasma membrane. They are a key component of the signal transduction pathway and contribute to signal intensity modulation in normal hematopoiesis [21-23]. CD45 is associated with lipid raft microdomains, and though the dynamic regulation of CD45 inside or outside lipid rafts has been well documented for lymphocyte activation in the immune response [14], its significance in leukemia is still unclear. Compared with Lin<sup>-</sup> cells, we observed that AML cells

were enriched in lipid rafts (Figure 3B) and therefore investigated the positioning of CD45 within lipid rafts by fluorescence microscopy. CD45 colocalized preferentially within lipid rafts on AML cells, but not on the non-transformed primitive murine hematopoietic cells (Figure 3C). CD45 was not furthermore colocalized within lipid rafts on different populations of hematopoietic stem cells (HSC) and progenitor cells purified from Lin<sup>-</sup> cells (Supplementary Figure S7). CD45 is a protein tyrosine phosphatase that, when situated within lipid rafts, reduces phosphorylation of the inhibitory site (Y507) of Lyn [24]. This kinase belongs to the Src family, and is activated when dephosphorylated on this site. In AML cells, CD45 was predominantly localized within lipid rafts, the cells consequently displayed relevant tyrosine dephosphorylation at Y507 of Lyn (Figure 3D), leading to an enhancement of its activity in AML cells [25]. Lyn regulates GM-CSF signaling [11, 12], a key pathway implicated in myeloproliferative disorders and leukemogenesis by increasing the proliferative capacity of cells and extending their lifespan [26]. We confirmed the strong activation of the GM-CSF pathway in AML cells, as assessed by an improved phosphorylation of the downstream Stat3 transcription factor (Figure 3E) and enhanced transcription of the Stat3 specific target genes, *c-Myc*, *c-Fos* and *Ccnd1* (Figure 3F), known to be



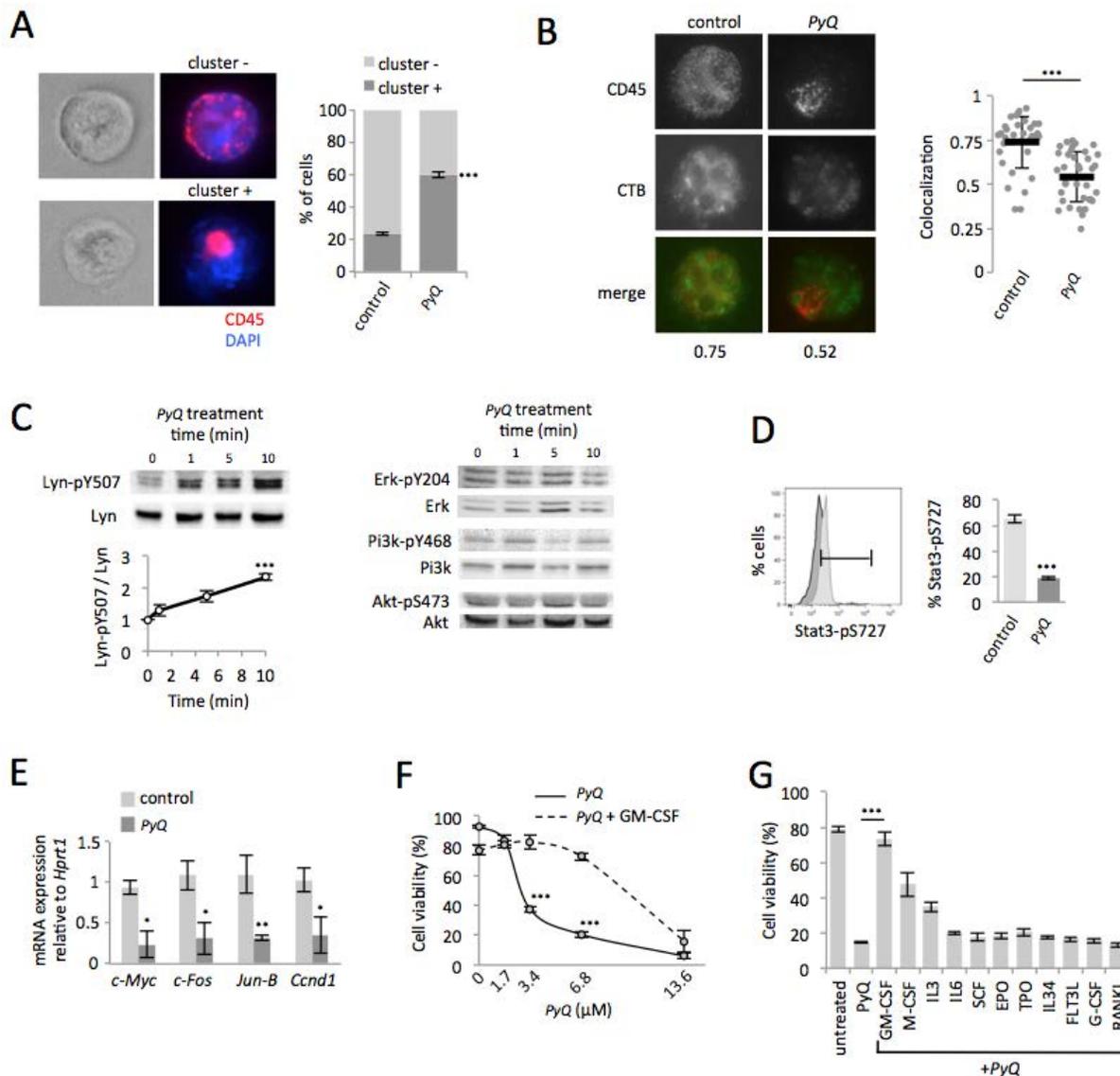
**Figure 4: AML cells expressing high level of CD45 are more leukemogenic and sensitive to *Pyrido [4,3-b]quinoxaline*.** CD45<sup>hi</sup> cells contained more leukemogenic cell. **A.** HOXA9-MEIS1 cells were stained with anti-CD45 antibody and sorted according to their high or low level of CD45 (CD45<sup>hi</sup> and CD45<sup>lo</sup>). **B.** Quantification of phospho-Stat3 (S727) by flow cytometry and real-time qPCR of Stat3 target genes indicated that the GM-CSF pathway was up-regulated in CD45<sup>hi</sup> cells. **C.** CD45<sup>hi</sup> and CD45<sup>lo</sup> AML cells analyzed for their ability to induce AML following their intra-femoral injection into recipient mice. Kaplan-Meier survival curves, *n* = 16 mice for each group, showing that CD45<sup>hi</sup> cells contained more leukemogenic cells. **D.** CD45<sup>hi</sup> and CD45<sup>lo</sup> cells were treated with various concentrations of *PyQ* for 18h. Cell viability indicated that CD45<sup>hi</sup> cells were more sensitive to *PyQ*, *n* = 3 biological replicates. Mean ± SEM. \*\*\*, *P* < 0.001; measured by Student's unpaired *t* test. ###, *P* < 0.001; measured by the Mantel Haenszel logrank test.

involved in cell cycling and proliferation of leukemic cells [8].

In conclusion, we showed that the localization of CD45 on the cell surface of hematopoietic cells changed during their oncogenic transformation and the Lyn/Stat3 pathway was consequently more activated in AML cells, compared to the non-transformed hematopoietic cells.

## AML cells expressing high levels of CD45 are more leukemogenic and sensitive to *Pyrido [4,3-*b*] quinoxaline*

From AML cells, we purified CD45 cells expressing either high or low levels of CD45 phosphatase (*i.e.* CD45<sup>hi</sup>)



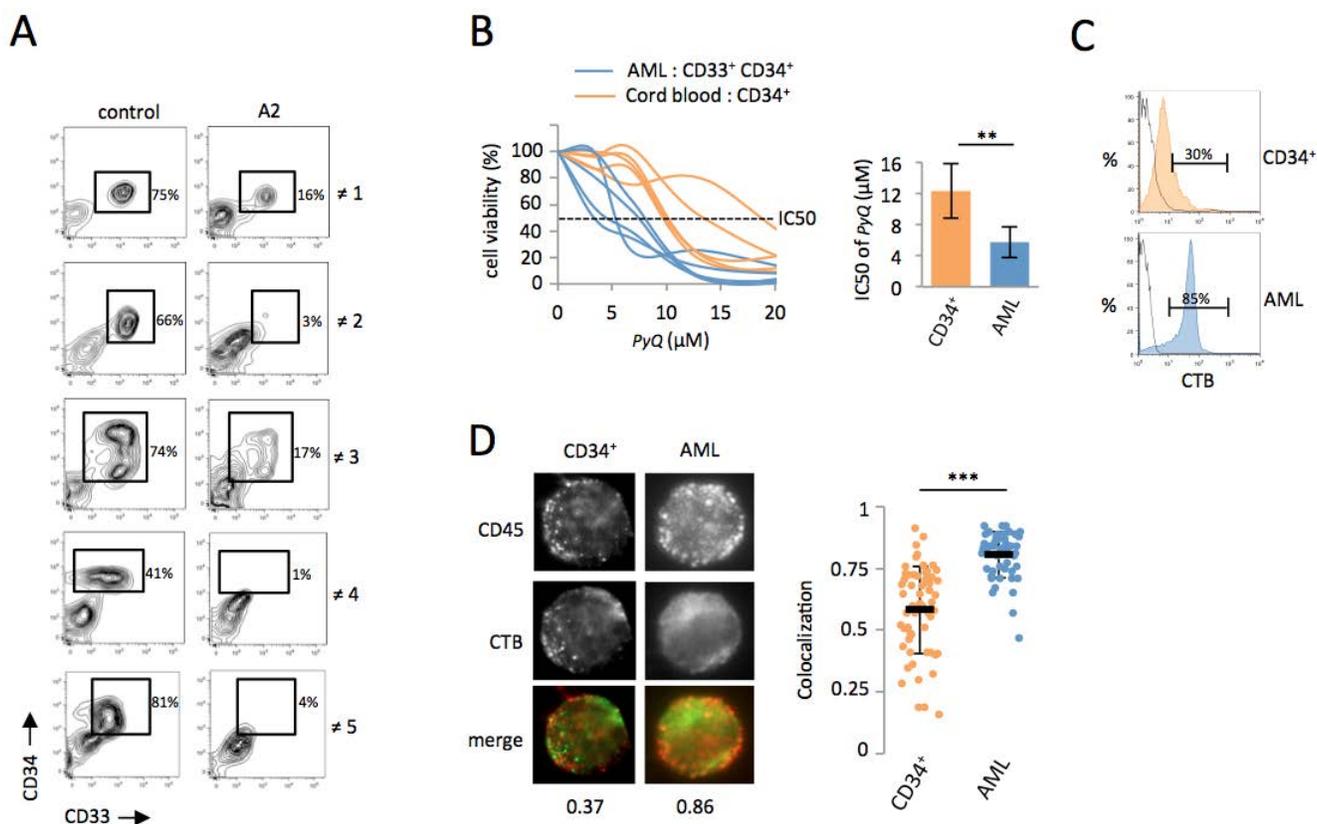
**Figure 5: Positioning of CD45 within lipid rafts is crucial for the Lyn/Stat3 proliferation pathway in AML cells.** **A.** Quantification of CD45 clustering induced by *PyQ* (3.4μM) for 10min on HOXA9-MEIS1 cells. The CD45 was either dispersed on the cell surface (cluster -) or clustered (cluster +). Examples of immunostaining are shown (magnification ×63) and statistics ( $n > 20$  cells). **B.** Lipid rafts were stained with cholera toxin subunit B (CTB). For untreated AML cells (control) the CD45 colocalized within lipid rafts. When AML cells were treated with *PyQ* (3.4μM) for 10 min, the CD45 was no longer colocalized with lipid rafts. Examples of single cell immunostaining were shown on the left panel. Colocalization scores between CD45 and CTB were reported below the immunostaining. Colocalization means were calculated ( $n > 30$  cells) and represented on the right panel. **C.** HOXA9-MEIS1 cells were treated with *PyQ* (3.4μM) for different times. WB and quantification indicated phosphorylation of the negative regulatory site of Lyn (Y507),  $n = 3$  biological replicates and WB for Erk, Pi3k and Akt. **D.** As assessed by flow cytometry, phosphorylation of Stat3 (S727) was found reduced 40 min after a treatment with *PyQ*. **E.** As observed by RT-qPCR, specific Stat3 target genes were furthermore inactivated 2 hours after a treatment with *PyQ* (3.4μM),  $n = 3$  biological. **F.** Viability of AML cells treated for 18h with various concentrations of *PyQ*, containing or not GM-CSF (25ng/ml),  $n = 3$  biological replicates. **G.** Viability of AML cells treated with *PyQ* alone or with several cytokines (25ng/mL). Mean ± SEM. \*,  $P < 0.1$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; measured by Student's unpaired *t* test.

or CD45<sup>lo</sup>, Figure 4A). Downstream GM-CSF signaling was highly activated on CD45<sup>hi</sup> cells, as assessed by increased phosphorylation of Stat3 (S727), as well as increased activation of Stat3 target genes (Figure 4B). Through a transplantation study, CD45<sup>hi</sup> cells were found more leukemogenic (Figure 4C). Cells expressing higher levels of CD45 phosphatase were found to be more sensitive to *PyQ*, further confirming the mechanism by which *PyQ* targets CD45 (Figure 4D).

### Delocalization of CD45 phosphatase away from lipid rafts inactivates the Lyn/Stat3 pathway on AML cells

We postulated that *PyQ*, by binding to the plasma membrane, could disrupt the organization of

intramembranous CD45 at the cell surface. Indeed, when AML cells were treated with *PyQ*, we noticed that the CD45 distribution was modified, with an elevated number of CD45-clustered cells observed after treatment (Figure 5A). CD45 mostly localized within lipid rafts was no longer detected after *PyQ* treatment (Figure 5B). *PyQ* rapidly increased phosphorylation of Lyn at the inhibitory Y507 site, which is under the control of CD45 [25], while other signaling pathways (Pi3k, Akt, Erk) were not affected (Figure 5C). CD45 is well known in leukemia to be involved in the regulation of the GM-CSF pathway and we observed that *PyQ* treatment decreased the S727 phosphorylation of the Stat3 transcription factor (Figure 5D), and its target genes involved in growth and proliferation were consequently found inactivated (Figure 5E). *PyQ* is accordingly a potent inhibitor of GM-CSF signaling and this was confirmed by the



**Figure 6: Primary human AML cells are sensitive to *Pyrido [4,3-b]quinoxaline*.** **A.** Total WBC were isolated by Ficoll from peripheral blood of five AML patients and treated *in vitro* with *PyQ* for 3 days. The percentage of blast cells (CD34<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>) was shown after a treatment with *PyQ* (A2 at 6.8 μM) or without (control). ≠ 1, AML3; ≠ 2, AML1; ≠ 3, AML2; ≠ 4, AML1; ≠ 5, AML4; data gated on viable cells. **B.** AML CD34<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> cells were more sensitive to *PyQ* treatment than normal primitive hematopoietic CD34<sup>+</sup> cells purified from cord blood (*n* = 5 biological replicates). Viability was measured 3 days after treatment with various concentrations of *PyQ*, IC50 dose (right panel). **C.** CD34<sup>+</sup> AML blasts were enriched in lipid rafts compared with CD34<sup>+</sup> cord blood cells, as assessed by staining with CTB, measured by flow cytometry. Staining with isotype control antibody IgG was shown. **D.** CD34<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> leukemic blasts and CD34<sup>+</sup> cord blood cells were sorted and analyzed by microscopy. Data showing that CD45 colocalized within lipid rafts (CTB) on CD33<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> AML blasts, but not on CD34<sup>+</sup> cord blood cells. Examples of single cell immunostaining were shown on the left panel. Colocalization scores between CD45 and CTB were reported below the immunostaining. Colocalization means were calculated (*n* > 30 cells) and represented on the right panel. Mean ± SEM. \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001; measured by Student's unpaired *t* test.

administration of high dose of the recombinant GM-CSF, which antagonized significantly the inhibitory effect mediated by *PyQ* (Figure 5F and 5G). We furthermore confirmed this mechanism on the human hematopoietic THP1 line, with an elevated number of CD45-clustered cells observed after treatment with *PyQ* (Supplementary Figure S8A), delocalization of the CD45 phosphatase outside the lipid rafts (Supplementary Figure S8B), which increased phosphorylation of Lyn at its inhibitory site and inactivated the Stat3 pathway (Supplementary Figure S8C).

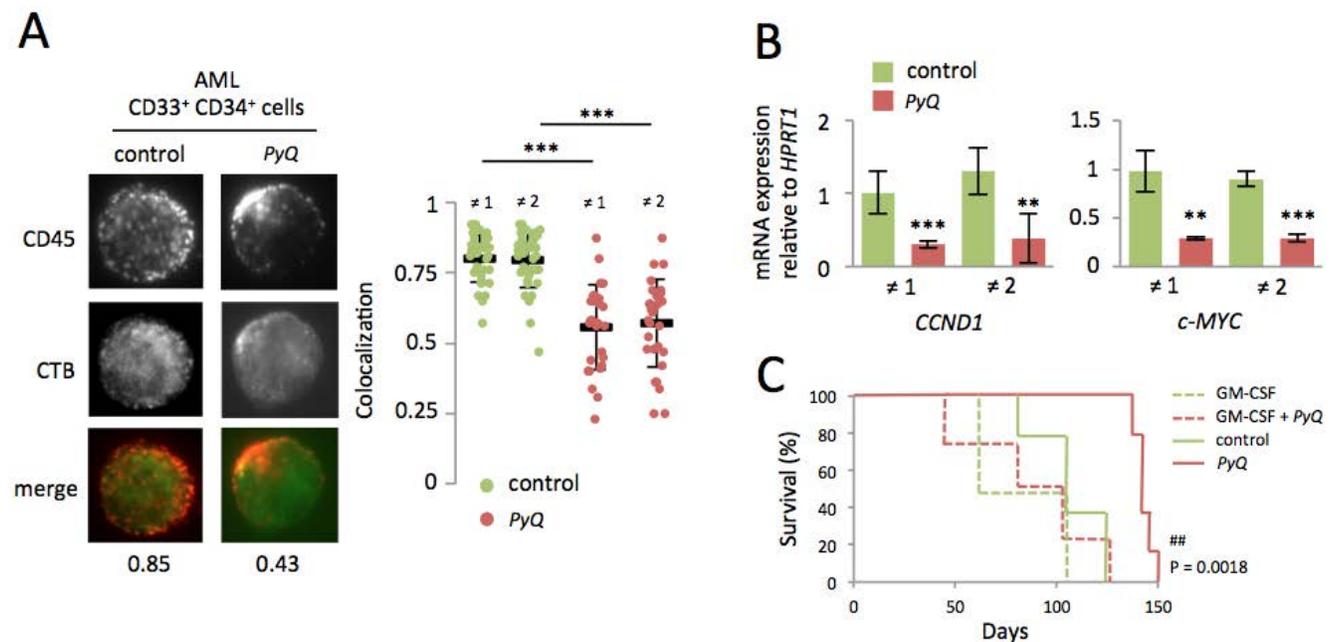
### CD45 colocalizes within lipid rafts on the cell surface of human AML blasts, but not on healthy HSCs

We next wanted to address if the positioning of the CD45 phosphatase within lipid rafts was also modified during the oncogenic transformation of human hematopoietic cells to acute myeloid leukemia. From peripheral blood of patients suffering of AML, we isolated leukemic blast that were *in vitro* treated with *PyQ* for 3 days. While CD34<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> leukemic myeloid blasts disappeared after a treatment with *PyQ*, the non-leukemic

cells (CD33<sup>-</sup>), which principally contained lymphoid cells were found to be less affected (Figure 6A), suggesting that leukemic blasts were more sensitive to *PyQ* than healthy lymphoid cells. CD34<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> leukemic myeloid blasts were also more sensitive to *PyQ* than were healthy CD34<sup>+</sup> HSCs isolated from cord blood (Figure 6B). We discovered that leukemic human myeloid blasts also contained a high level of lipid rafts, compared with the non-transformed human CD34<sup>+</sup> HSCs (Figure 6C). Finally, we demonstrated that CD45 was differently organized on the cell surface, since CD45 colocalized more within lipid rafts on leukemia blasts than was the case in CD34<sup>+</sup> cells (Figure 6D).

### Delocalization of CD45 outside lipid rafts affects the GM-CSF-dependent expansion of human AML cells

CD45, which is mainly found within plasma-membrane lipid rafts on AML patients' blast cells, is rapidly delocalized after treatment with *PyQ* (Figure 7A). GM-CSF-R $\alpha$  is expressed in more than 80% of human AML blasts [1-3], and GM-CSF is known to induce cell cycle progression [4, 5, 7, 8]. When cells were treated



**Figure 7: Localization of the CD45 within lipid rafts is important for maintenance of human AML cells.** **A.** After treatment of primary AML blasts with *PyQ* (6.8 $\mu$ M), CD45 was found delocalized outside the lipid rafts. Examples of single cell immunostaining were shown on the left panel (sample  $\neq$  1). Colocalization scores between CD45 and CTB were reported below the immunostaining. Colocalization means were calculated ( $n > 20$  cells) and represented on the right panel for samples  $\neq$  1 and  $\neq$  2, under untreated (control) or treated (*PyQ*) conditions. **B.** Two hours after treatment with *PyQ*, Stat3 target genes were found down regulated on human CD34<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> sorted blast cells. **C.** Human AML leukemic cells were transplanted into lethally irradiated immunodeficient mice. Ten and thirteen days post-transplant, mice were given a tail injection of *PyQ* (3mg/Kg) alone or associated with high dose of the recombinant human GM-CSF (500ng/mouse). Kaplan-Meier survival curves of mice treated with *PyQ*, compared with control groups ( $n = 4$  mice for GM-CSF and GM-CSF + *PyQ*,  $n = 5$  mice for control and *PyQ*). Mean  $\pm$  SEM. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; measured by Student's unpaired *t* test. ##,  $P < 0.01$ ; measured by the Mantel Haenszel logrank test, compared with control group.

with *PyQ*, we observed a marked downregulation of GM-CSF/Stat3 target genes for human AML blasts (Figure 7B). Next, we tested the effect of *PyQ* on a xenograft model to evaluate its ability to block the development of leukemia. We transplanted fresh AML cells into the tail vein of lethally irradiated immunodeficient mice. Survival analyses showed that mice treated with *PyQ* survived significantly longer than untreated control mice (Figure 7C). Interestingly, we also provided evidence that administration of a supra-physiological dose of GM-CSF significantly blocked the efficacy of *PyQ*. In conclusion, we have shown that *PyQ* inactivates the CD45/GM-CSF pathway on human AML cells and could be used as a novel therapeutic agent for the treatment of AML.

## DISCUSSION

Lipid rafts are cholesterol- and glycosphingolipid-enriched patches located in the plasma membrane. They are a key component of the signal transduction pathway and contribute to signal intensity modulation of normal hematopoiesis. Lipid rafts are master regulators of cytokine function, the cell cycle, survival and the retention of HSCs [21-23]. Lipid rafts play also important roles in malignant hematopoiesis. The presence of CD45 within lipid rafts is responsible for IL-6 induced proliferation in myeloma [27, 28]. Aberrant JAK2 signaling in myeloproliferative neoplasms has been also described to be dependent on lipid rafts [29]. The therapeutic effect of *Rituximab* (anti-CD20) on B-cell lymphomas may depend on membrane cholesterol content, which promotes lipid raft formation [30]. Accumulating evidence suggests that lipid rafts also play important roles in AML, since physiological hypoxia induces lipid raft formation and PI3K activation in AML [31]. The *fluoropyrimidine F10*, which displays anti-leukemia activity in pre-clinical models of AML, reduces overall lipid raft levels in the plasma membrane [32]. The induction of apoptosis in AML cells by CD44 ligation with A3D8 antibody requires the presence of CD44 on lipid rafts [33].

CD45, a member of the protein tyrosine phosphatase (PTP) family specifically expressed in hematopoietic cells, is associated with lipid raft microdomains, and though the dynamic regulation of CD45 inside or outside lipid rafts has been well documented for lymphocyte activation in the immune response [14], its significance in leukemia is still unclear. We showed that the localization of CD45 on the cell surface of hematopoietic cells changed dynamically during their oncogenic transformation. On non-transformed mouse and human primitive hematopoietic cells, CD45 was observed outside lipid rafts, but once those cells had been transformed, CD45 was found within lipid rafts on AML blasts. By providing clear and detailed evidence, our study demonstrates that lipid rafts play a crucial role in both murine and human AML maintenance. Finally, these findings may lead to the development of

new drugs, including *Pyrido [4,3-b]quinoxaline (PyQ)* for the treatment of hematological malignancies, via the pharmacological modulation of CD45 positioning among lipid rafts.

Genetic defects of CD45 in mice [34] and humans [35] cause severe combined immunodeficiency while no perturbation of myelopoiesis is observed, which demonstrates the essential role of CD45 in the immune system, especially for the activation and development of lymphocytes. Using CD45 deficient mice, we clearly showed the crucial role played by CD45 in the leukemogenic transformation process since mice transplanted with CD45KO cells never developed AML. It has been reported that CD45 regulates homing and engraftment of normal and leukemic cells [20, 36]. In our study, using lentiviral shRNA on HOXA9-MEIS1 blasts to knock down CD45, we observed that these resulting cells had lost their capacity to induce leukemia in secondary transplantation settings, even after inoculation of the cells into bone marrow, thus highlighting the pivotal role of CD45 in the maintenance of leukemia *in vivo*. Various studies suggest that AML stem cells arise from myeloid progenitors that adopt self-renewal properties. GM-CSF- $R\alpha$  is certainly expressed in this myeloid progenitor subpopulation in mice [37], but the biological significance of this receptor in the leukemic stem cell population is not yet well established. Here, we demonstrated that among the population of HOXA9-MEIS1 blasts, cells harboring a high level of CD45 (CD45<sup>hi</sup>) displayed enhanced activation of the GM-CSF/Stat3 pathway. Following transplantation of CD45<sup>hi</sup> cells into secondary recipient mice, we discovered that, to a large extent, these cells were more leukemogenic. We can therefore conclude that the CD45/GM-CSF pathway plays a more critical role in the regulation of cancer stem cells than was previously thought.

In the past 20 years, numerous strategies have been employed to inhibit either the GM-CSF receptor [9, 10, 38, 39] or the downstream signaling, which includes Lyn kinase or Stat transcription factors [11, 12]. In this study, we revealed that *Pyrido [4,3-b]quinoxaline* can perturb the plasma membrane, and disrupts the dynamic positioning of CD45 within lipid raft microdomains. Using mouse and human AML samples, we demonstrated that this delocalization of CD45 inhibits the GM-CSF pathway, which is essential for the growth and survival of leukemic cells. We therefore provide new evidence that lipid rafts play a pivotal role in AML maintenance, and that the pharmacological modulation of lipid raft functions may lead to the development of new drugs for the treatment of leukemia.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

The Ethics Committee for Animal Welfare of the University of Bourgogne and the French Ministry of Higher Education and Research approved all animal experiments (references 01333.02 and 01318.02). Detailed protocol for animal studies and transplantation is provided in Supplemental experimental procedure. Human HOXA9 and MEIS1 (MSCV-IRES-GFP) retroviral vectors were transfected into Phoenix Eco cells and supernatants were harvested for infection of magnetically lineage-depleted (Lin<sup>-</sup>) cells isolated from bone marrow (BM) of C57BL/6 Wild type or CD45KO mice (depletion using a kit from Miltenyi). CD45KO Exon 9 mice were obtained from Pauline Johnson's laboratory (University of British Columbia, Vancouver, Canada). The CD45KO mice [34] were backcrossed for nine generations onto the C57BL/6 background. Transduced cells were transplanted into the tail vein of lethally irradiated (900cGy) in 7-12-wk-old C57BL/6 females. To test *PyQ* effect *in vivo* 5×10<sup>4</sup> GFP<sup>+</sup> leukemic cells were transplanted together with 5×10<sup>4</sup> Lin<sup>-</sup> cells isolated from B6SJL congenic (Ly.1) mice and 1×10<sup>5</sup> cells from support total BM (Ly.2). *PyQ* (~3mg/Kg) was injected into the peritoneum, 10 and 13 days post-transplantation. 5×10<sup>4</sup> CD45<sup>hi</sup> or CD45<sup>lo</sup> cells were mixed with 1×10<sup>5</sup> support BM cells and injected into the femur of lethally irradiated recipients. CD45 shRNA lentiviral particles (sc-35001-V, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) were used to knock down CD45, after 18h of treatment with puromycin, 5×10<sup>4</sup> cells were injected in BM.

### Human samples

Fresh cord blood samples were obtained from the Etablissement Français du Sang (Besançon, France). After Ficoll separation, CD34<sup>+</sup> cells were isolated using the CD34 MicroBead Kit (Miltenyi). Patients were included, after giving their informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki. The present study was approved by the Local Ethic Committee of Dijon hospital. Detailed protocol for human studies is provided in Supplemental experimental procedure. AML diagnosis was based on the World Health Organization (WHO) criteria. Following Ficoll separation, white blood cells (WBC) were treated 3 days with *PyQ*. Kept frozen by the Biological Resource Center Ferdinand Cabanne at Dijon (BB-0033-00044), samples were analyzed for further investigations. AML sample was transplanted into the tail vein of lethally irradiated (300cGy) immunodeficient mice (NSG). *PyQ* (~3mg/Kg) was injected into the tail vein, 10 and 13 days post-transplantation. Recombinant human GM-CSF (Miltenyi) was injected at 500ng per mouse.

### Chemical library

More than 7,400 chemical compounds from the French library (UMR176 CNRS, Institut Curie, Paris, France, <http://curie.fr/recherche/plateforme-chimiotheque>) were tested at 10ng/mL. Toxicities on HOXA9-MEIS1 leukemic and Lin<sup>-</sup> cells were evaluated, by GFP<sup>+</sup> and Propidium Iodide quantifications (BD Biosciences) respectively, using a 96-well-plate cytometer 18 hours after treatment (Guava EasyCyte PLUS, Millipore). The *PyQ* used in this study was A2.

### Flow cytometry and sorting

We followed previously described protocol [40]. Viability of HOXA9-MEIS1 AML cells was analyzed by GFP quantification using flow cytometry. Apoptosis was measured using an Annexin-V detection kit (BD Biosciences). Cell viability was analyzed using DAPI or Propidium Iodide (BD Biosciences). The effect of *Pyrido* [4,3-*b*]quinoxalines on the cell cycle was assessed by flow cytometry with anti-BrdU antibody, using the cell proliferation kit (BD Biosciences). AF488- and AF647-conjugated Cholera Toxin subunit B (Life Technologies) was used to stain lipid rafts. For immunostaining, we purified HSCs (LSK-CD34<sup>-</sup>) and the different progenitors (CMP, GMP) from Lin<sup>-</sup> cells, following previously described protocol [40]. To analyze effect of *PyQ* on stem cells *in vivo*, (SLAM population) and progenitors (ST, MPP, CLP, CMP, GMP, MEP), we followed previously described protocol [40]. For murine cells, we used CD45.1-PE-Cy5.5 (110712, BioLegend), Stat3 (pS727)-AF647 (558099, BD Biosciences), CD45-APC-Cy7 (109824, BioLegend), CD45-APC-Cy7 (560694, BD Biosciences). For human cells, we used CD45-APC-Cy7 (557833, BD Biosciences), CD45-APC (555485, BD Biosciences), CD33-PE-Cy5.5 (B36289, Beckman Coulter), CD34-FITC (130-081-001, Miltenyi Biotech), CD34-APC (130-098-139, Miltenyi Biotech), Stat3 (pS727)-AF647 (558099, BD Biosciences). Cells were analyzed on a FACS LSRII and Canto10 flow cytometer (BD Biosciences) and sorted on a FACS Aria cell sorter (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

### *In vitro* culture

HOXA9-MEIS1 cells and human AML samples were maintained in SFEM (StemCell Technologies). Recombinant murine GM-CSF (Miltenyi) was tested at 25ng/mL. HOXA9-MEIS1 cells were grown on MS-5 stromal feeder cells, the co-culture was treated with *PyQ* for 3 days, trypsinized and feeder cells were isolated from leukemic cells by binding on 6-well plates. The

recombinant human GM-CSF (Miltenyi) was tested on THP1 cells. Murine recombinant GM-CSF (Miltenyi) was used on HOXA9-MEIS1 cells. Recombinant murine GM-CSF and other murine cytokines (all from Miltenyi) were tested at 25ng/mL and administered 30min before the treatment with *PyQ*. CFU assay was performed on MethoCult medium (MethoCult, M3434).

## Cell lines

Hematopoietic and non-hematopoietic cell lines were reciprocally cultured in RPMI 1640 and DMEM (Pan Biotech), supplemented with 20% fetal bovine serum (Pan Biotech). Cell viability was analyzed using the XTT Cell Proliferation Kit (Roche Applied Science), four days after treatment with *PyQ*. CD45 shRNA lentiviral particles (sc-29251-V) and control particles (sc-108080) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) were used to knock down the CD45 on THP1.

## Immunostaining

Human and murine AML, CD34<sup>+</sup> cord blood and Lin<sup>-</sup> cells were stained with AF488-conjugated Cholera Toxin subunit B (Life technologies), anti-mouse or anti-human CD45 (clone F10-89-4, Millipore) and secondary anti-mouse-Alexa-Fluor-568, under non-permeabilized condition. Immunofluorescence was analyzed by microscopy (ZEISS, Imager.M2) and images were processed for colocalization studies (Fiji, NIH software).

## qPCR

Experiments were carried out using the Vii7 system (Applied Biosystems), with the following TaqMan assays. For mouse; Mm00432359 (Ccn1), Mm00487425 (c-Fos), Mm00487804 (c-Myc), Mm04243546 (Jun-B), Mm01545399 (Hprt1), Mm01290062 (GM-CSF). For human; Hs00765553 (CCND1), Hs00153408 (c-MYC), Hs02800695 (HPRT1).

## Microarrays

The GSE57083 study provided normalized gene expression data for various human cell lines. Data were extracted for either hematopoietic lines NB4, HL60, THP1, KG1 and U937 or non-hematopoietic lines HeLa, SW480, HT29 and MCF7, and the study was focused on transcripts encoding proteins found in the “plasma membrane” and associated with “receptor activity”, which represent more than 170 mRNA.

## Western blotting

The antibodies used were anti-phospho-Stat3 (S727), anti-Stat3, anti-phospho-PI3K, anti-PI3K, anti-phospho-Erk (Y204), anti-Erk, anti-phospho-Lyn (Y507), anti-Lyn, anti-phospho-Akt (S473), anti-Akt (all from Cell Signaling Technology) and anti-Actin (BD Biosciences). Gel images were analyzed with ImageJ (NIH) for quantification.

## HPLC chromatography

*PyQ* was quantified in different subcellular fractions of THP1 cells by using *high performance liquid chromatography* (HPLC). To separate the cytoplasm from the nucleus, THP1 cells were reconstituted for 1min in cold buffer containing 0.5% NP-40, 10mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl, pH 7.4. The cell lysis was then centrifuged for 1min at 500g. The pellet contains the nuclei, while the supernatant contains cytoplasm and plasma membranes. The supernatant was diluted twice with a buffer containing 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 50mM Tris-HCl, pH 8.0. After high-speed centrifugation (15,000g) for 15min, the pellet was enriched with plasma membrane fragments, while the supernatant contained the cytoplasm. DNA was precipitated with 100% ethanol, after treatment of the THP1 cells with *PyQ*.

## Statistics

All data are expressed as the mean ± SEM. Differences between two groups were assessed by Student's unpaired *t* test. Statistical analysis of survival curves was performed using the Mantel Haenszel logrank test. Statistics were performed using Prism 4 (GraphPad).

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Virginie Carmignac and Philip Bastable for critical reading of this manuscript, Laurence Dubrez for discussions, Florence Mahuteau-Betzer for providing the chemical library and Estelle Duprez for providing the MS-5 cell line.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

## GRANT SUPPORT

This study was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (R.Q.), the association Laurette Fugain (R.Q.), the Comité inter-régional Grand-Est de la Ligue contre le Cancer

(L.D.) and by the National Research Agency under the program “Investissements d’Avenir” (reference ANR-11-LABX-0021, LipSTIC Labex). L.S.P. was supported by a fellowship from the Conseil Régional de Bourgogne/INSERM and the Ligue Nationale contre le Cancer. A.B. by a French Government grant.

### Author’s Contributions

L.S.P. performed *in vitro* experiments, analyzed data, wrote Materials and Methods and Figures legends; C.H.N. and C.L.G. synthesized the chemical compounds; A.B. helped with the *in vitro* experiments. J.P.P.B. performed experiments with chromatography; A.H. performed flow cytometry cell sorting; R.F. performed experiments with the sucrose density gradient; M.L.C. provided with human samples; P.J. provided with the CD45KO mice; J.N.B. provided with human samples and discussed the data; L.D. discussed the data and made corrections to the manuscript; R.Q. designed the study, performed *in vitro* and *in vivo* experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

### Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors’ response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget.

### REFERENCES

1. Budel LM, Touw IP, Delwel R, Clark SC and Lowenberg B. Interleukin-3 and granulocyte-monocyte colony-stimulating factor receptors on human acute myelocytic leukemia cells and relationship to the proliferative response. *Blood*. 1989; 74(2):565-571.
2. Lanza F, Castagnari B, Rigolin G, Moretti S, Latorraca A, Ferrari L, Bardi A and Castoldi G. Flow cytometry measurement of GM-CSF receptors in acute leukemic blasts, and normal hemopoietic cells. *Leukemia*. 1997; 11(10):1700-1710.
3. Park LS, Waldron PE, Friend D, Sassenfeld HM, Price V, Anderson D, Cosman D, Andrews RG, Bernstein ID and Urdal DL. Interleukin-3, GM-CSF, and G-CSF receptor expression on cell lines and primary leukemia cells: receptor heterogeneity and relationship to growth factor responsiveness. *Blood*. 1989; 74(1):56-65.
4. Guan Y, Gerhard B and Hogge DE. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2003; 101(8):3142-3149.
5. Riccioni R, Diverio D, Riti V, Buffolino S, Mariani G, Boe A, Cedrone M, Ottone T, Foa R and Testa U. Interleukin (IL)-3/granulocyte macrophage-colony stimulating factor/

- IL-5 receptor alpha and beta chains are preferentially expressed in acute myeloid leukaemias with mutated FMS-related tyrosine kinase 3 receptor. *British journal of haematology*. 2009; 144(3):376-387.
6. Guthridge MA, Barry EF, Felquer FA, McClure BJ, Stomski FC, Ramshaw H and Lopez AF. The phosphoserine-585-dependent pathway of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors mediates hematopoietic cell survival through activation of NF-kappaB and induction of bcl-2. *Blood*. 2004; 103(3):820-827.
7. Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M and Estrov Z. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces antiapoptotic and proapoptotic signals in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003; 102(2):630-637.
8. Coffey PJ, Koenderman L and de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene*. 2000; 19(21):2511-2522.
9. Jakupovic I, Grandage VL, Linch DC and Khwaja A. Lack of effect of the human GM-CSF analog E21R on the survival of primary human acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 2004; 103(8):3230-3232.
10. Mathew M, Zaineb KC and Verma RS. GM-CSF-DFF40: a novel humanized immunotoxin induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Apoptosis*. 2013; 18(7):882-895.
11. Hibbs ML and Harder KW. The duplicitous nature of the Lyn tyrosine kinase in growth factor signaling. *Growth Factors*. 2006; 24(2):137-149.
12. Scapini P, Pereira S, Zhang H and Lowell CA. Multiple roles of Lyn kinase in myeloid cell signaling and function. *Immunol Rev*. 2009; 228(1):23-40.
13. Wei S, Liu JH, Epling-Burnette PK, Gamero AM, Ussery D, Pearson EW, Elkabani ME, Diaz JI and Djeu JY. Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*. 1996; 157(11):5155-5162.
14. Mustelin T, Vang T and Bottini N. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(1):43-57.
15. Hermiston ML, Xu Z, Majeti R and Weiss A. Reciprocal regulation of lymphocyte activation by tyrosine kinases and phosphatases. *J Clin Invest*. 2002; 109(1):9-14.
16. Simons K and Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000; 1(1):31-39.
17. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD and Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999; 286(5439):531-537.
18. Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM and Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J*. 1998; 17(13):3714-3725.
19. Quere R, Andradottir S, Brun AC, Zubarev RA, Karlsson

- G, Olsson K, Magnusson M, Cammenga J and Karlsson S. High levels of the adhesion molecule CD44 on leukemic cells generate acute myeloid leukemia relapse after withdrawal of the initial transforming event. *Leukemia*. 2011; 25(3):515-526.
20. Shvitiel S, Lapid K, Kalchenko V, Avigdor A, Goichberg P, Kalinkovich A, Nagler A, Kollet O and Lapidot T. CD45 regulates homing and engraftment of immature normal and leukemic human cells in transplanted immunodeficient mice. *Exp Hematol*. 2011; 39(12):1161-1170 e1161.
  21. Ratajczak MZ and Adamiak M. Membrane lipid rafts, master regulators of hematopoietic stem cell retention in bone marrow and their trafficking. *Leukemia*. 2015; 29(7):1452-1457.
  22. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Morita Y, Eto K, Ema H and Nakauchi H. Cytokine signals modulated *via* lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J*. 2006; 25(15):3515-3523.
  23. Jahn T, Leifheit E, Gooch S, Sindhu S and Weinberg K. Lipid rafts are required for Kit survival and proliferation signals. *Blood*. 2007; 110(6):1739-1747.
  24. Young RM, Holowka D and Baird B. A lipid raft environment enhances Lyn kinase activity by protecting the active site tyrosine from dephosphorylation. *J Biol Chem*. 2003; 278(23):20746-20752.
  25. Thomas ML and Brown EJ. Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunol Today*. 1999; 20(9):406-411.
  26. Hercus TR, Broughton SE, Ekert PG, Ramshaw HS, Perugini M, Grimbaldeston M, Woodcock JM, Thomas D, Pitson S, Hughes T, D'Andrea RJ, Parker MW and Lopez AF. The GM-CSF receptor family: mechanism of activation and implications for disease. *Growth Factors*. 2012; 30(2):63-75.
  27. Li FJ, Tsuyama N, Ishikawa H, Obata M, Abroun S, Liu S, Otsuyama K, Zheng X, Ma Z, Maki Y and Kawano MM. A rapid translocation of CD45RO but not CD45RA to lipid rafts in IL-6-induced proliferation in myeloma. *Blood*. 2005; 105(8):3295-3302.
  28. Zheng X, Li AS, Zheng H, Zhao D, Guan D and Zou H. Different associations of CD45 isoforms with STAT3, PKC and ERK regulate IL-6-induced proliferation in myeloma. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0119780.
  29. Griner LN, McGraw KL, Johnson JO, List AF and Reuther GW. JAK2-V617F-mediated signalling is dependent on lipid rafts and statins inhibit JAK2-V617F-dependent cell growth. *British journal of haematology*. 2013; 160(2):177-187.
  30. Nozaki Y, Mitsumori T, Yamamoto T, Kawashima I, Shobu Y, Hamanaka S, Nakajima K, Komatsu N and Kirito K. Rituximab activates Syk and AKT in CD20-positive B cell lymphoma cells dependent on cell membrane cholesterol levels. *Exp Hematol*. 2013; 41(8):687-696 e681.
  31. Fiegl M, Samudio I, Mnjayan Z, Korchin B, Fritsche H and Andreeff M. Physiological hypoxia promotes lipid raft and PI3K-dependent activation of MAPK 42/44 in leukemia cells. *Leukemia*. 2010; 24(7):1364-1367.
  32. Gmeiner WH, Jennings-Gee J, Stuart CH and Pardee TS. Thymineless death in F10-treated AML cells occurs *via* lipid raft depletion and Fas/FasL co-localization in the plasma membrane with activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Leuk Res*. 2015; 39(2):229-235.
  33. Qian H, Xia L, Ling P, Waxman S and Jing Y. CD44 ligation with A3D8 antibody induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells through binding to CD44s and clustering lipid rafts. *Cancer Biol Ther*. 2012; 13(13):1276-1283.
  34. Byth KF, Conroy LA, Howlett S, Smith AJ, May J, Alexander DR and Holmes N. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med*. 1996; 183(4):1707-1718.
  35. Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LI, Vuopala K, Poyhonen M, Uhari M, Rogers M, Speck SH, Chatila T and Thomas ML. Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med*. 2000; 6(3):343-345.
  36. Shvitiel S, Kollet O, Lapid K, Schajnovitz A, Goichberg P, Kalinkovich A, Shezen E, Tesio M, Netzer N, Petit I, Sharir A and Lapidot T. CD45 regulates retention, motility, and numbers of hematopoietic progenitors, and affects osteoclast remodeling of metaphyseal trabecules. *J Exp Med*. 2008; 205(10):2381-2395.
  37. Pronk CJ, Rossi DJ, Mansson R, Attema JL, Norrdahl GL, Chan CK, Sigvardsson M, Weissman IL and Bryder D. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(4):428-442.
  38. Frankel AE, Powell BL, Hall PD, Case LD and Kreitman RJ. Phase I trial of a novel diphtheria toxin/granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion protein (DT388GMCSF) for refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(5):1004-1013.
  39. Kreitman RJ and Pastan I. Recombinant toxins containing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and either pseudomonas exotoxin or diphtheria toxin kill gastrointestinal cancer and leukemia cells. *Blood*. 1997; 90(1):252-259.
  40. Quere R, Saint-Paul L, Carmignac V, Martin RZ, Chretien ML, Largeot A, Hammann A, Pais de Barros JP, Bastie JN and Delva L. Tif1gamma regulates the TGF-beta1 receptor and promotes physiological aging of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(29):10592-10597.

# CD45 phosphatase is crucial for human and murine acute myeloid leukemia maintenance through its localization in lipid rafts

## Supplementary Material

### Supplementary Experimental Procedure

**Kinase assay.** The International Centre for Kinase Profiling performed the kinase screening (University of Dundee, Scotland, UK).

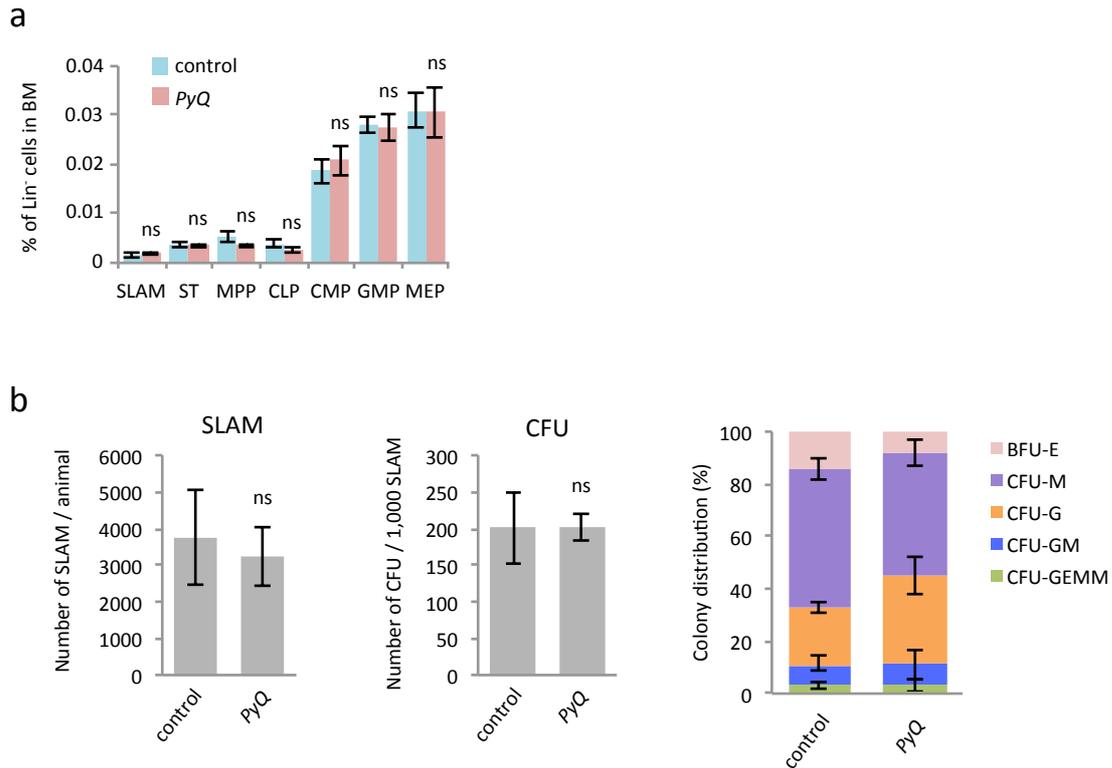
**Lipid analyses.** Artificially double-layered membranes (micelles) were synthesized by adding *La-Phosphatidylcholine* (P5888, Sigma Aldrich) to water (1:1 v/v). *PyQ* A2 was then added to the mixture, vortexed and after centrifugation, *PyQ* A2 in the different fractions was quantified by HPLC.

**Sucrose density gradient ultracentrifugation.** Cells were washed with ice-cold 1xPBS and potted with 1 mL MES buffer (Sigma-Aldrich) containing 150mM NaCl on ice. In ultra-clear Tubes 14x89mm (Beckman Coulter), 2mL of lysates were mixed with the 2ml of 90% sucrose in lysis buffer to obtain 45% sucrose and overlaid with 5 mL of 35% sucrose in buffer followed by 3 mL of 5% sucrose in buffer. After ultracentrifugation for 20 hours at 39,000 rpm, 8 fractions were collected starting from the top of the gradient. Quantification of cholesterol and sphingomyelin in fraction was performed by the Lipidomic Analytical Platform (Université de Bourgogne, Dijon, France). Fractions were analyzed by WB using anti-CD45 (clone 69/CD45, BD Biosciences), anti-Lyn and anti-Flot1 antibodies (Cell Signaling Technology).

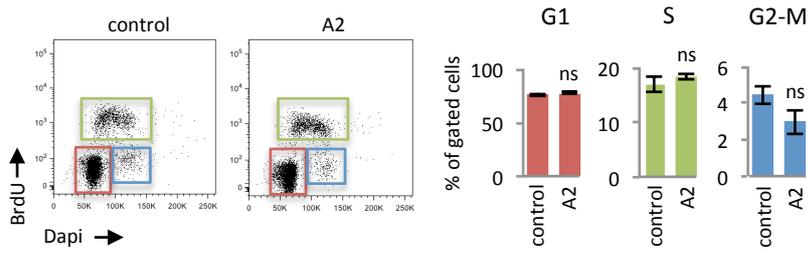
### Supplementary References

Byth, K.F., Conroy, L.A., Howlett, S., Smith, A.J., May, J., Alexander, D.R., and Holmes, N. (1996). CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med* 183, 1707-1718.

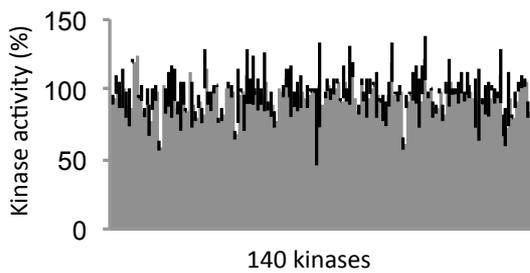
Quere, R., Saint-Paul, L., Carmignac, V., Martin, R.Z., Chretien, M.L., Largeot, A., Hammann, A., Pais de Barros, J.P., Bastie, J.N., and Delva, L. (2014). Tif1gamma regulates the TGF-beta1 receptor and promotes physiological aging of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 10592-10597.



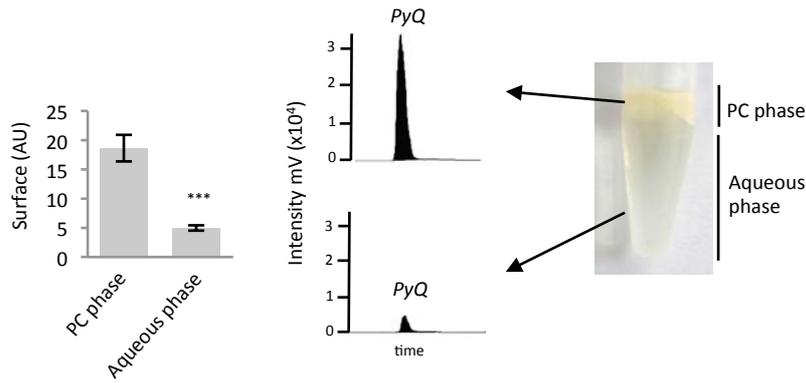
**Figure S1.** Toxicity of *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* was evaluated on primitive hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow. **(a)** *PyQ* injected in mice did not have any effect on stem cells and progenitors distribution in bone marrow. **(b)** Primitive SLAM stem cells isolated from Lin<sup>-</sup> BM of mice treated with *PyQ* show the same potency to give rise to colony-forming unit (CFU) on MethoCult medium. Mean ± SEM. ns, non-significant, P value measured by Student's unpaired t test.



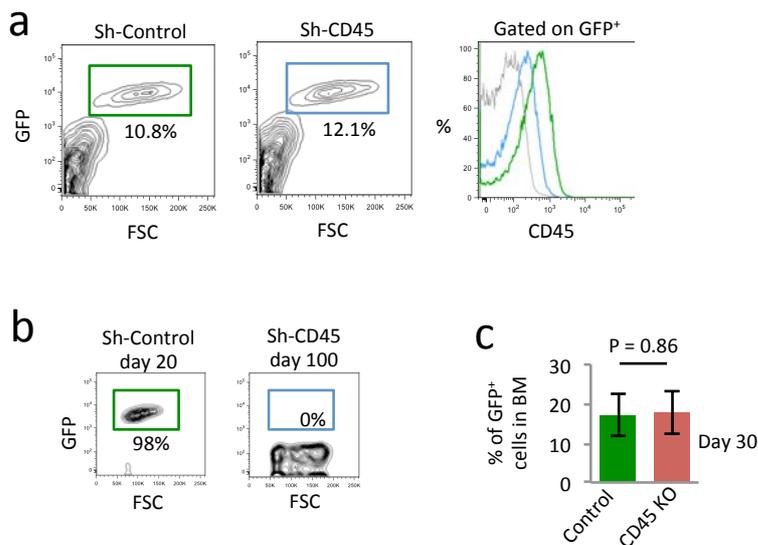
**Figure S2.** *PyQ* does not change cell cycle activity in HOXA9-MEIS1 cells. Cell cycle activity of HOXA9-MEIS1 cells exposed to 3.4 $\mu$ M *PyQ* for 6h. Data were gated on GFP<sup>+</sup> leukemic cells. Mean  $\pm$  SEM. ns, non-significant, P value measured by Student's unpaired t test.



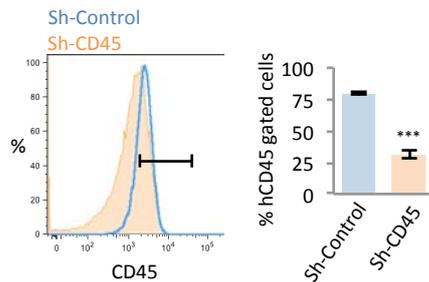
**Figure S3.** *Pyrido[4,3-b]quinoxaline* is not an inhibitor of kinases. Graphical representation of the kinase activity, n = 2 technical replicates, for 140 kinases tested with *PyQ* (3.4 $\mu$ M).



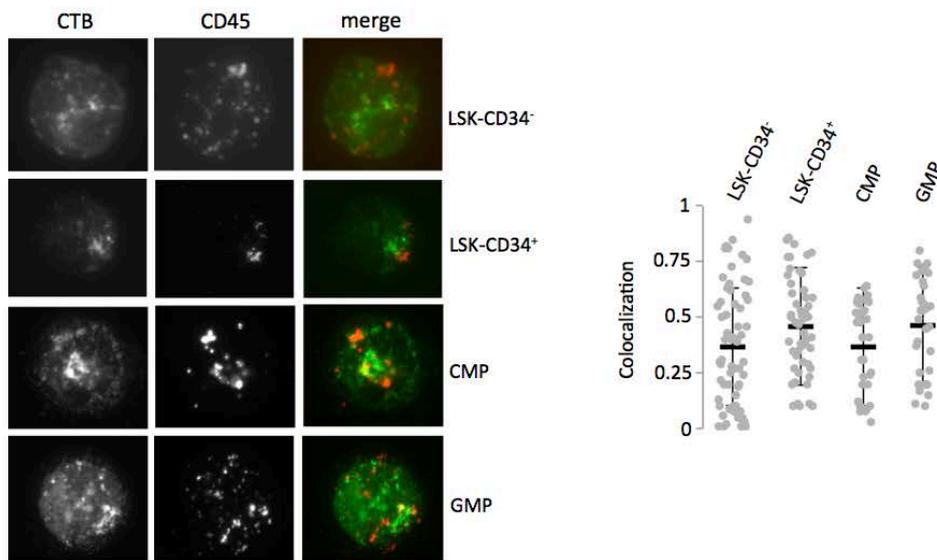
**Figure S4.** *PyQ* interacts with artificial lipid membranes (micelles) made by adding *L* $\alpha$ -phosphatidylcholine (PC) to water. *PyQ* was quantified by HPLC chromatography,  $n = 3$  technical replicates. Mean  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $P < 0.0001$ ; measured by Student's unpaired t test.



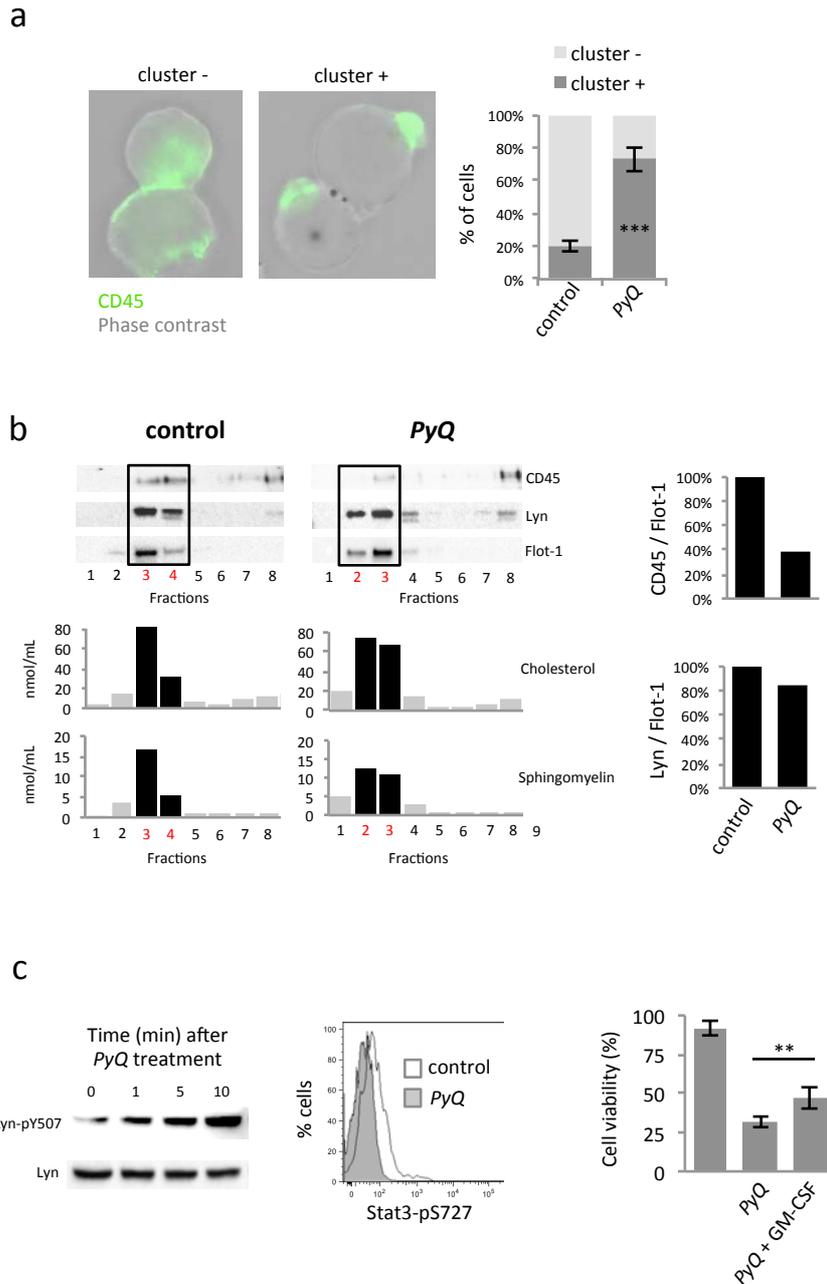
**Figure S5.** CD45 is critical for the maintenance and development of AML. **(a)** Using shRNA lentivirus, CD45 was knocked down in AML cells. CD45 down regulation was observed by cytometry on GFP<sup>+</sup> leukemic cells, after selection with puromycin. **(b)** Cells were then transplanted into lethally irradiated recipient mice. While mice from the Sh-Control group rapidly developed AML, 100 days after transplantation, surviving mice from the Sh-CD45 group were killed and no GFP<sup>+</sup> leukemic cells were detectable in BM by cytometry (related to Figure 2d). **(c)** Deficiency in CD45 expression completely prevented CD45 KO primitive hematopoietic cells from leukemic transformation. One month after the transplantation, we detected similar reconstitution in peripheral blood of Control- and CD45 KO-transplanted mice. However, deficiency in CD45 expression completely prevented CD45 KO primitive hematopoietic cells from leukemic transformation (related to Figure 2e). Control;  $n = 10$  mice, CD45 KO;  $n = 10$  mice. Mean  $\pm$  SEM. P value measured by Student's unpaired t test.



**Figure S6.** Knock down of CD45 observed by cytometry on THP1 leukemic cells, after selection with puromycin. THP1 cells were transduced with shRNA lentiviral particles (Sh-CD45 or Sh-Control). Mean  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $P < 0.0001$ ; measured by Student's unpaired t test.



**Figure S7.** The CD45 was not colocalized within lipid rafts on different populations of hematopoietic stem and progenitor cells purified from  $\text{Lin}^-$  cells. Lipid rafts were stained with the Cholera Toxin subunit B (CTB). The population of  $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+$  (LSK)  $\text{CD34}^-$  cells is enriched of HSCs. From the population of  $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+$  (LK), we isolated the common myeloid progenitors (CMP) and granulocyte monocyte progenitors (GMP). Examples of immunostaining are shown (left panel) and statistic ( $n > 20$  cells, right panel).



**Figure S8.** *Pyrido[4,3-*b*]quinoxaline* modifies the CD45 phosphatase localization and inactivates the Lyn/Stat3 pathway on THP1 cell line. **(a)** Quantification of the CD45 clusterisation induced by *PyQ* (13.6 $\mu$ M) for 15 min on THP1 cells. CD45 was either observed dispersed on the cell surface (cluster -) or clustered (cluster +). Examples of immunostaining are shown (magnification X63) and statistic ( $n > 20$  cells). **(b)** When THP1 cells were treated with *PyQ* (13.6 $\mu$ M) for 15 min, CD45 was found delocalized outside from the lipid rafts. Lysates obtained from THP1 cells were separated by sucrose density gradient centrifugation. Lipid rafts were identified by WB with anti-Flot1 and by quantification of cholesterol and sphingomyelin via HPLC. On the right is shown the quantification of the WB demonstrating that CD45 was found delocalized outside from the lipid rafts after a treatment with *PyQ*, while Lyn remained inside. **(c)** THP1 cells were treated with *PyQ* (13.6 $\mu$ M) at different time ranging from 0 to 10 min. WB indicates phosphorylation of the negative regulatory site of Lyn (Y507) (left panel). After a treatment with *PyQ*, decreased phosphorylation of Stat3

(S727) was observed by flow cytometry, 40 min after A2 treatment (middle panel). Administration of recombinant GM-CSF (50ng/mL) in the culture medium reduced efficiency of *PyQ* (13.6 $\mu$ M) on THP1 cell viability after 3 days of treatment, n = 3 biological (right panel). Mean  $\pm$  SEM. \*\*, P < 0.001; \*\*\*, P < 0.0001; measured by Student's unpaired t test.