

## Modélisation de la transformation leucémique dans la maladie de Fanconi

### Coordinatrice du projet

**M<sup>me</sup> Dominique Bluteau, PhD, MCF, HDR**

- *Affiliation Principale*

EPHE (Ecole Pratique des Hautes Etudes); Section SVT; GRET "Génome, Cancer et Thérapies"

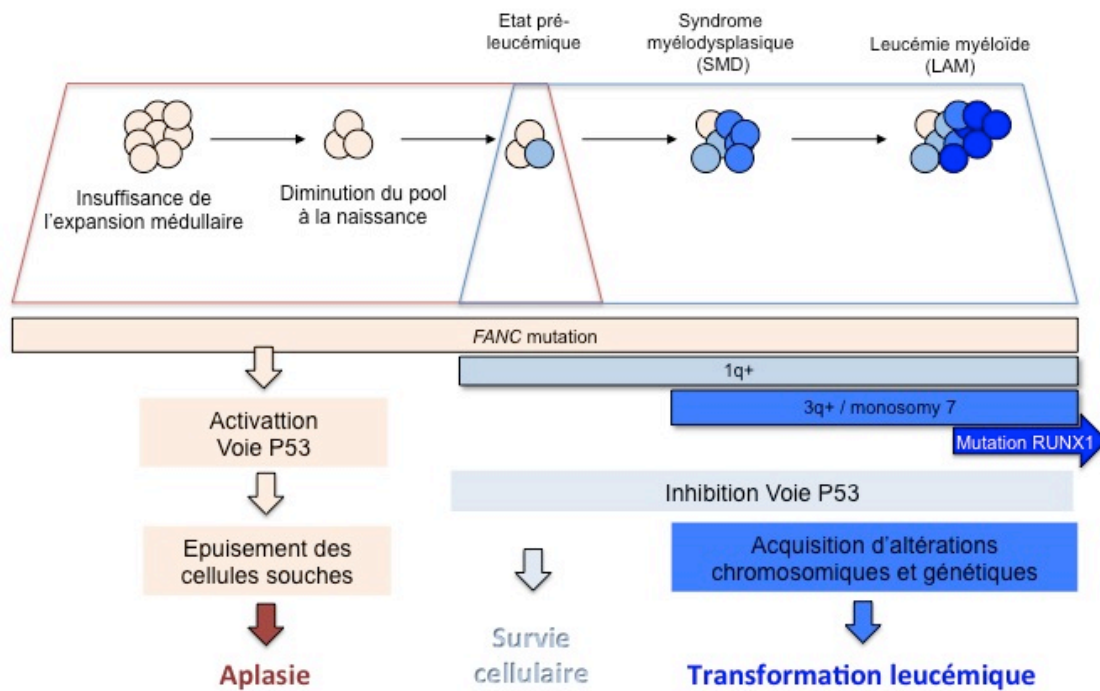
- *Structure de recherche*

UMR944, bâtiment Jean Bernard, hôpital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris. Equipe Génome et Cancer (J. Soulier).

### 1. Contexte scientifique

Une complication majeure de la maladie de Fanconi est le développement dans l'enfance ou chez les jeunes adultes d'un syndrome myélodysplasique ou d'une leucémie aiguë myéloïde. Les travaux de l'équipe de J. Soulier, réalisés à partir des échantillons des patients FA de la cohorte française du centre de référence, ont permis de caractériser génétiquement l'évolution clonale médullaire associée la progression tumorale<sup>1</sup>. Les anomalies génétiques sont assez différentes de celles observées dans les LAM *de novo*, ou même dans les SMD ou LAM secondaires à une exposition à la chimiothérapie ou à la radiothérapie. En effet, un profil spécifique d'anomalies chromosomiques acquises est observé dans la moelle des patients Fanconi, impliquant de façon récurrente les chromosomes 1 (1q+; 50%), 3 (3q+; 46%), et 7 (-7/7q; 26%). De plus, ces études ont souligné la récurrence des anomalies du gène *RUNX1* dans 30% des cas. En revanche aucune de ou rares altérations ont pu être identifiée dans les gènes classiquement mutés dans les SMD/LAM de la population générale tels que *TET2*, *JAK2*, *TP53*, *CBL*, *NPM* et *CEBP $\alpha$* . Ces résultats suggèrent que les mécanismes de transformation dans la maladie de Fanconi diffèrent, au moins en partie, de ceux des autres sous-types de SMD/LAM. Par des approches cellulaires et fonctionnelles, l'équipe a montré que la voie p53 était activée constitutionnellement dans les cellules FANC-déficientes<sup>2,3</sup>. Une telle activation représente probablement l'exacerbation de la réponse normale de la cellule à l'accumulation de stress et de lésions de l'ADN et constitue une

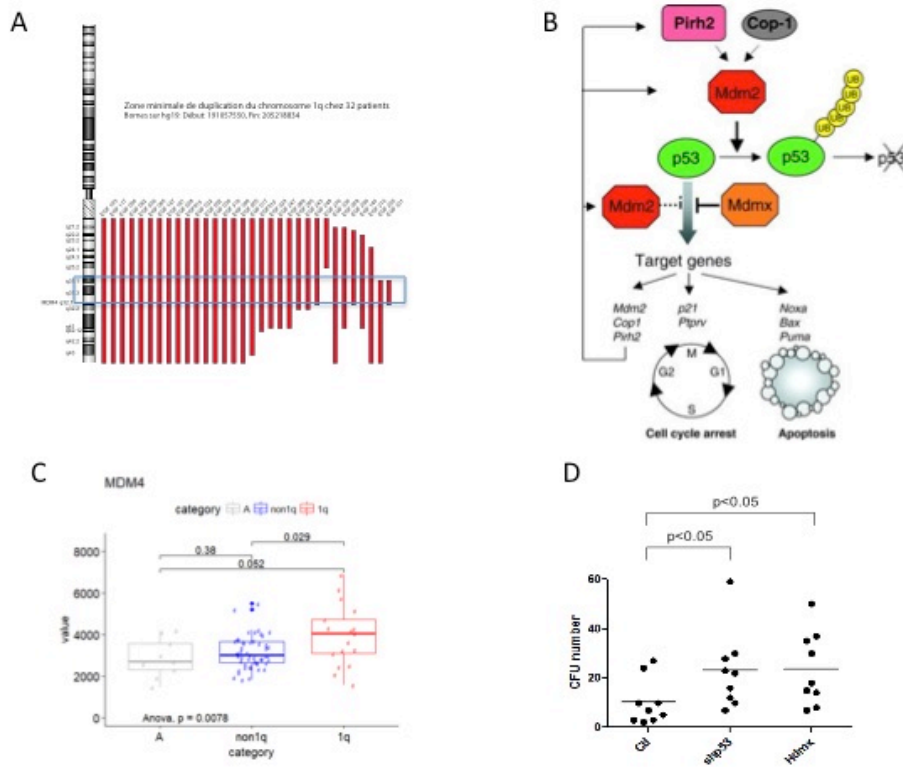
défense de l'organisme contre l'instabilité génétique et le développement de cancers<sup>4</sup>. Notre hypothèse de travail est que l'atténuation de la réponse p53 est une étape clé dans le développement des SMD et LAM à caryotypes complexes FA (Fig1).



**Fig 1 Aspects cellulaires et moléculaires de la maladie de Fanconi**

Cependant, l'analyse de patients FA aux stades SMD et LAM a montré que les mutations de *TP53* étaient peu fréquentes au cours de la transformation. Ces résultats suggèrent que le processus de transformation FA pourrait passer par d'autres voies pour inhiber la réponse tumeur suppresseur de P53. Les duplications récurrentes du bras long du chromosome 1 (1q+) sont présentes à tous les stades de progression médullaire. Il a été montré que ces duplications incluaient systématiquement le gène *MDM4/HDMX* (Fig2A, données de l'équipe non publiées). La protéine MDM4 est un régulateur négatif de P53 (Fig2B) et son rôle oncogénique a été démontré notamment dans les mélanomes<sup>5</sup>. De plus, les cellules de patients FA aux stades SMD/LAM avec un évènement 1q+ sur-expriment *MDM4/HDMX* (Fig2C ; données non publiées) et que la surexpression de MDM4 dans des cellules

CD34+ humaines de patient FA restaure la capacité progénitrice de ces cellules au même titre qu'une invalidation de l'expression de *TP53* par shRNA (Fig2D).



**Fig2**

**A** Représentation schématique de la région minimale amplifiée du bras long du chromosome 1 qui inclue *MDM4*. **B** Schéma de la voie p53 et des rôles inhibiteurs de la voie de MDM2 et MDM4. **C** Analyse de l'expression de MDM4 dans les cellules CD14+ de patients FA par RNA-seq. **D** Analyse de la capacité progénitrice de cellules CD34+ de patients FA après inhibition de *TP53* ou surexpression de *MDM4*.

## 2. Objectif du projet

L'objectif de ce projet est de déterminer, par des modèles *in vitro* et *in vivo*, le rôle fonctionnel sur l'hématopoïèse normale et pathologique des altérations somatiques récurrentes associées à la progression tumorale dans la maladie de Fanconi, en particulier la plus fréquente, la duplication du bras long du chromosome 1.

### 3. Résultats obtenus

Nous avons émis l'hypothèse que l'évolution du stade aplasie à une transformation leucémique passe par une étape « pré-leucémique » correspondant au niveau cellulaire à l'atténuation de la voie p53. Nous avons dans un premier temps étudié un modèle de souris possédant une invalidation (KO) du gène *Fancg* et du gène *Trp53* qui permet la production de la protéine P53. Les souris possédant ce double KO meurent dans les premières semaines de vie. Au niveau hématologique, la moelle osseuse présente un phénotype cellulaire proche d'une pathologie lymphoïde de type lymphome B. A partir de ces résultats, nous pensons que l'absence totale de P53 est trop délétère. De plus, l'équipe a pu mettre en évidence chez l'homme que les altérations directes du gène p53 étaient rares. Nous avons émis l'hypothèse que seul les cellules présentant une atténuation du signal transmis par p53 présentaient un avantage de survie lorsque les cellules étaient invalidées au niveau d'un gène FA et qu'une surexpression de MDM4 pouvait être à l'origine de cette atténuation. Plusieurs modèles de surexpression de MDM4 existent dans la littérature. Les transgènes utilisés dans ces modèles présentent le cDNA de *Mdm4* sous le contrôle de promoteurs ubiquitaires forts qui entraînent la surexpression très élevée de MDM4. Ces modèles ne nous ont pas semblé relevant dans le cadre de notre étude. Nous avons donc établi un nouveau modèle en intégrant un transgène correspondant à un BAC incluant l'ensemble de la séquence codante de *Mdm4* et de ses régions régulatrices (Fig3A). Nous avons obtenus, après transgénèse et criblage par PCR, 5 fondateurs possédant au moins une copie du transgène. Par analyse de l'expression nous avons évalué le niveau d'expression transcriptionnelle de *Mdm4* dans les PBMCs des fondateurs et initiés les croisements pour établir des lignées indépendantes à partir de ces fondateurs. A l'issue des premiers croisements seul les fondateurs A0 et C0 se sont avérés fertiles.

#### 3.1 Etablissement d'un nouveau modèle murin *Fancg*<sup>-/-Tg(Mdm4)</sup>

Nous avons initié l'établissement de plusieurs modèles murins. A partir d'un modèle de souris invalidé pour le gène *Fancg* (*Fancg*<sup>-/-</sup> ou KO) (dans le fond génétique C57/BL6), et des deux modèles transgéniques pour *Mdm4* (*Fancg*<sup>+/+;TgMdm4</sup>) (dans le fond génétique C57/BL6) pour établir et analyser des modèles combinés *Fancg*<sup>-/-;TgMdm4</sup> (KOTg) et nous permettre de comprendre le rôle de chaque altérations dans les différentes étapes de la pathologie.

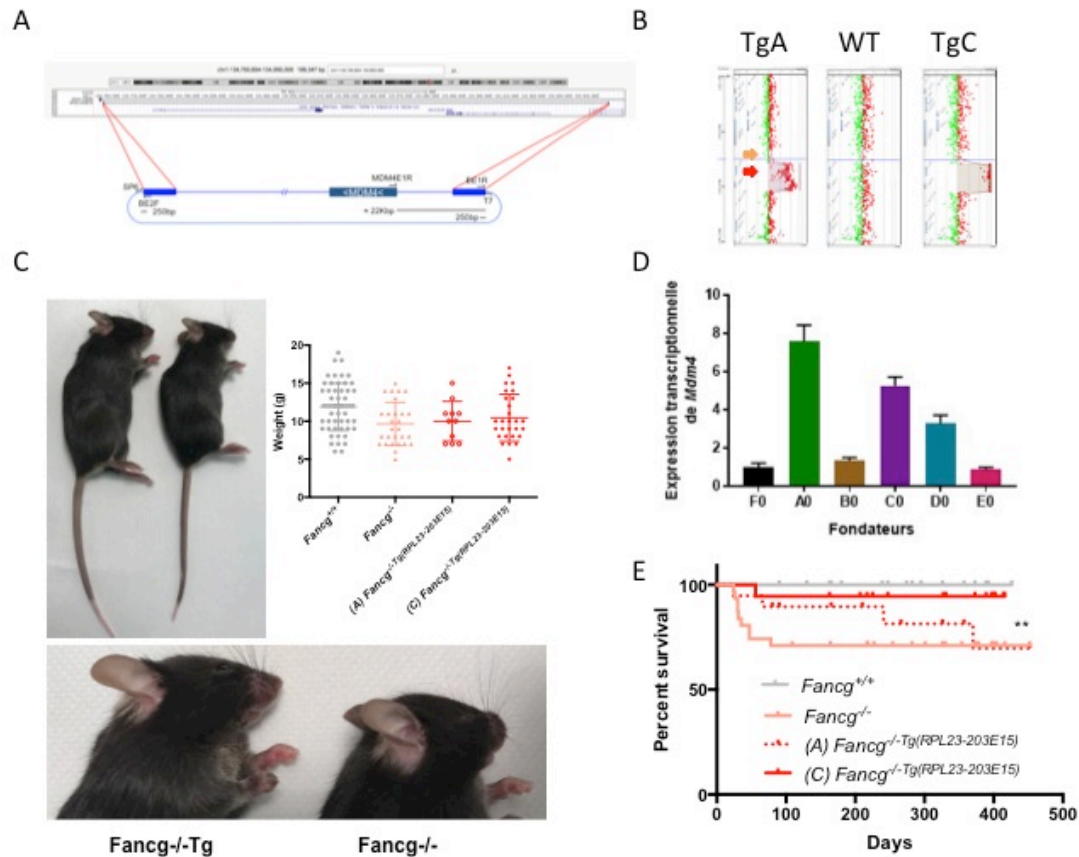
Nous avons testé par CGH arrays la stabilité du nombre de copie des transgènes dans les lignées KOTgA et KOTgC. Dès la 3ème génération, nous avons pu déterminer que le nombre de copie du transgène était de 2 et de 4 respectivement et qu'il était stable au cours des générations. Dans les PBMCs, le niveau d'expression de *Mdm4* est augmenté de 7 fois environ et est comparable dans les 2 modèles. L'analyse de l'expression de *Mdm4* dans les différentes populations hématopoïétiques montre une surexpression plus importante dans les KOTgC comparativement au KOTgA. Comme attendu, le ratio d'expression entre les populations hématopoïétiques est parfaitement conservé montrant que les transgènes ont conservés une régulation endogène pour *Mdm4*.

### **3.2 La surexpression de MDM4 diminue les anomalies du développement et la mort précoce des souris *Fancg*<sup>-/-</sup>.**

Comme dans la pathologie humaine, certains modèles murins KO pour un gène FA présentent des altérations du développement. Dans le modèle que nous utilisons, nous avons observés une mort périnatale, des défaut de croissance et des défauts de développement de la boîte crânienne et des yeux. Nous avons mis en évidence que la surexpression de MDM4 augmente la survie des souris KO et atténue fortement le phénotype de ces souris (Fig3C et 3D).

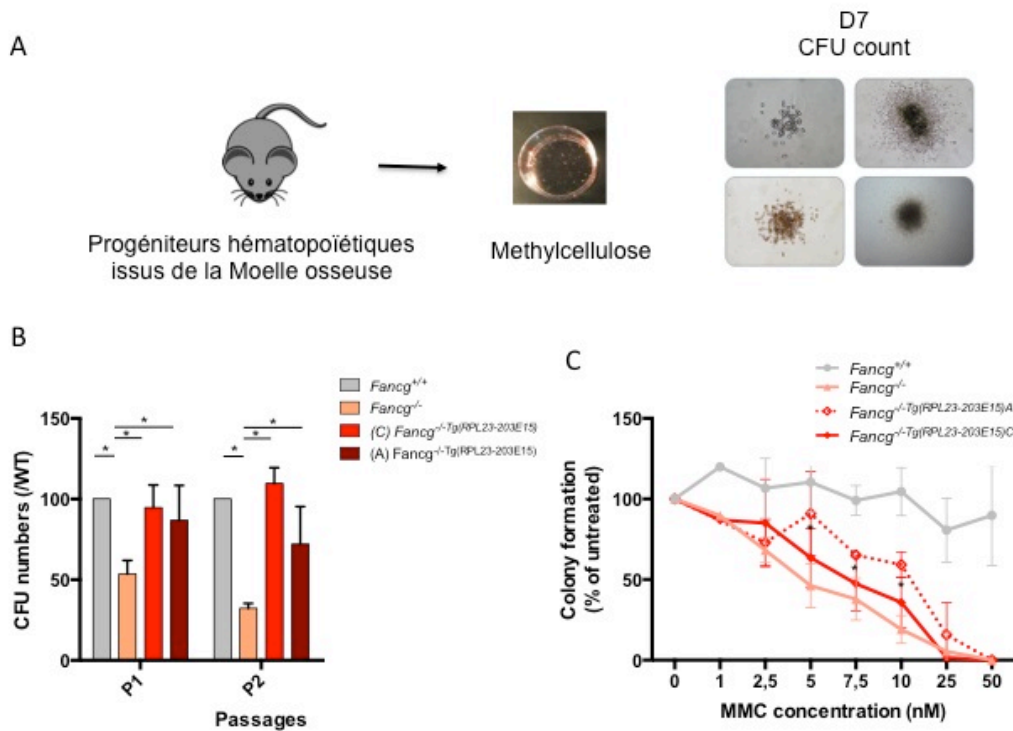
### **3.3 La surexpression de MDM4 diminue la sensibilité des progéniteurs hématopoïétiques à la mitomycine et restaure la capacité des progéniteurs hématopoïétiques des souris *Fancg*<sup>-/-</sup> *in vitro*.**

Nous avons ensuite testé l'impact de la surexpression de MDM4 dans des progéniteurs hématopoïétiques *Fancg*<sup>-/-</sup> sur leurs capacités clonogéniques et leurs hypersensibilités aux agents cassants tels que la Mitomycine. Nous avons montré pour les deux modèles KOTgA et KOTgC que la surexpression de MDM4 compense au moins en partie l'hypersensibilité des cellules KO à la MMC (Fig4C) et restaure la capacité clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques FA (Fig4B).



**Fig 3**

**A** Schéma du transgène (BAC) incluant la séquence codante et non codante du gène *Mdm4* et ses régions régulatrices en 5' et 3'. **B** CGH arrays des souris fondateurs control (WT), et transgéniques (TgA et TgC). **C** Exemple et quantification des anomalies du développement observés dans le modèle de souris *Fancg*<sup>-/-</sup> et absent (ou atténué) dans les modèles *Fancg*<sup>-/-</sup>;Tg*Mdm4*. **D** Analyse de l'expression par Q-PCR de *Mdm4* dans des cellules du sang périphérique (PBMCs) des souris control (F0) et des fondateurs des lignées transgéniques (A0, B0, C0, D0, E0). **E** Analyse de la survie des souris des modèles WT, *Fancg*<sup>-/-</sup> et *Fancg*<sup>-/-</sup>;Tg*Mdm4*.

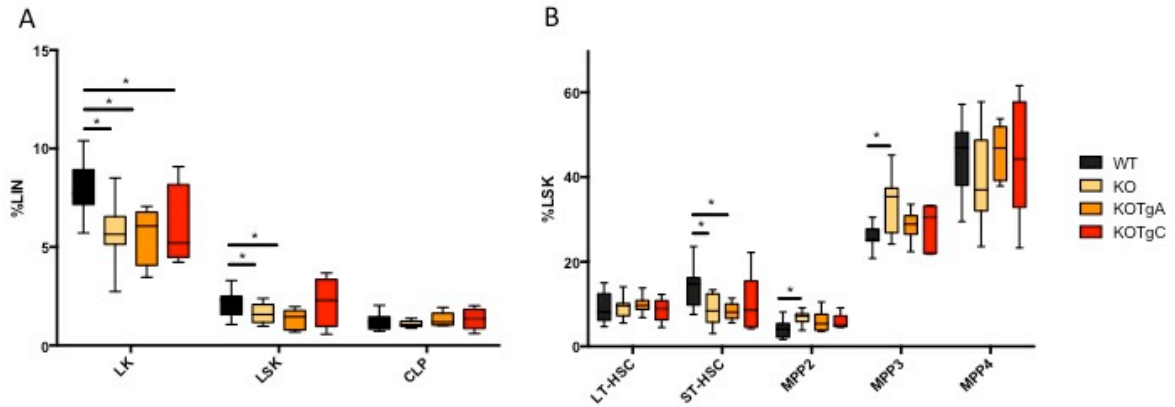


**Fig 4**

**A** Schéma expérimental, **B** Analyse de la capacité clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques de cellules de souris sauvages (WT), invalidées pour *Fancg* (KO), invalidées pour *Fancg* et surexprimant MDM4 (TgA et TgC), **C** Analyse de l'effet de doses croissantes de Mitomycine (MMC) sur la capacité des progéniteurs hématopoïétiques.

### 3.4 La surexpression de MDM4 restaure partiellement l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques des souris *Fancg*<sup>-/-</sup> *in vivo*.

Pour déterminer l'impact *in vivo* de la surexpression de MDM4 sur les cellules souches hématopoïétiques, nous avons analysé le pourcentage des différentes populations présentes dans la moelle osseuse des souris. Cette analyse nous a permis de confirmer que dans ce modèle de souris KO, le pourcentage de cellules souches (LSK) et de progéniteurs (LK) était diminué comparativement aux souris control (WT). Nous avons également observé que le modèle KOTgA présentent la même diminution des populations LSK et LK que le modèle KO. En revanche, le modèle KOTgC semble au moins en partie atténuer la diminution de la population LSK (Fig5A).



**Fig 5**

**A** Pourcentage des populations de cellules souches (LSK) progéniteurs myéloïdes (LK) et lymphoïdes (CLP). **B** Pourcentage des populations de cellules souches dans la population LSK.

L'analyse des sous-populations au sein des LSK a mis en évidence le phénotype « inflammatoire » des LSK dans le modèle KO. Ce phénotype précédemment décrit par l'équipe d' E. Passégué<sup>5</sup> est caractérisé par une diminution<sup>5</sup> de la population ST-HSC et une augmentation des populations MPP2 et MPP3 (Fig5B). Ce phénotype pourrait expliquer l'épuisement du pool de cellules souches les plus immatures à l'origine de tout les lignages hématopoïétiques.

De manière intéressante, nous avons observé que la surexpression de MDM4 atténue ce phénotype LSK (Fig5B) soutenant notre hypothèse (Fig6).

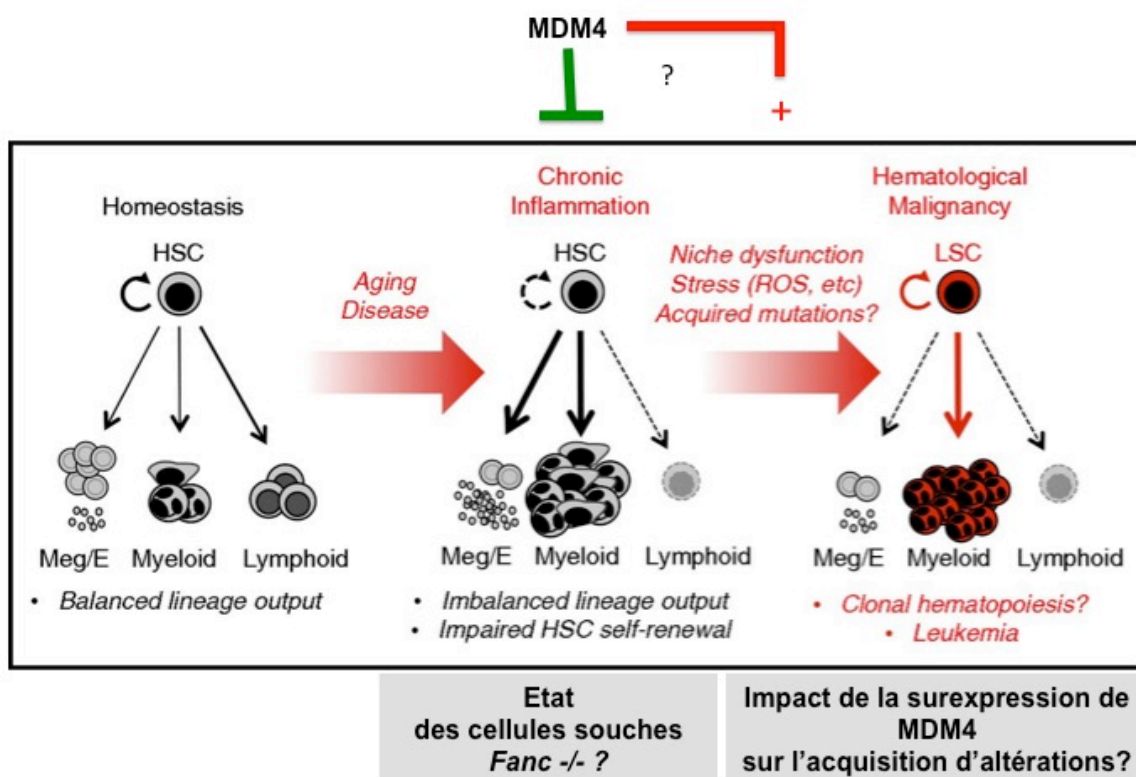
### 3.5 Identification de gènes candidats dérégulés dans les LSK KO

Pour identifier les gènes dérégulés dans les LSK KO, nous avons trié par cytométrie en flux cette population à partir de 4 souris KO, 4 souris WT et 4 souris KOTgC. Ces populations ont ensuite été analysées par RNA-seq. Une analyse préliminaire, nous a permis de mettre en évidence une cinquantaine de gènes up ou down-régulés dans les LSK KO comparativement aux LSK WT (Fig7A). Ces

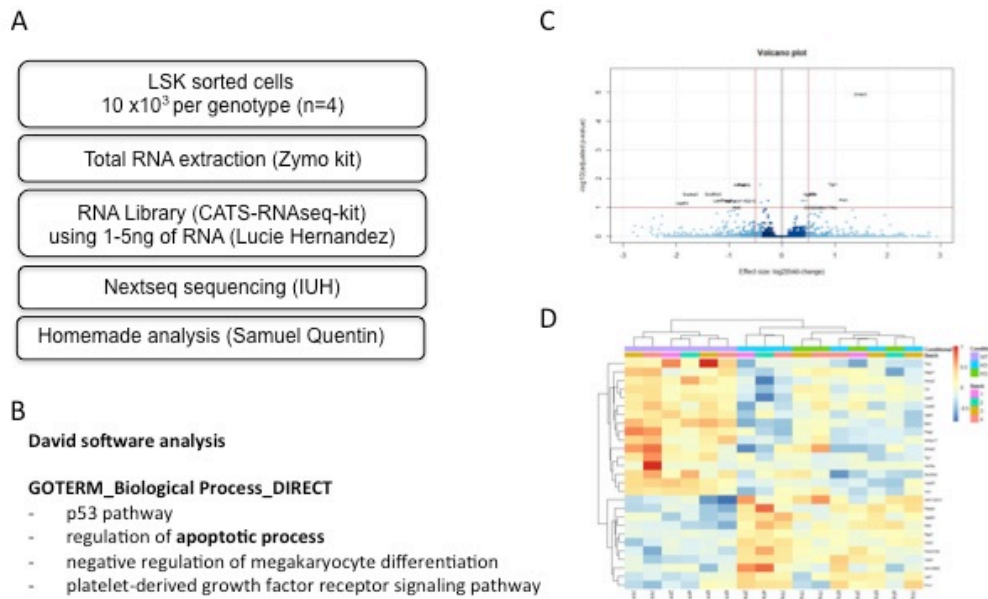


dérégulations sont de faible amplitude montrant qu'il ne s'agit pas de forte perturbation du réseau transcriptionnel. Une première analyse a mis en évidence qu'une partie de ces gènes sont des cibles de p53 et que leur surexpression est atténuée en présence de la surexpression de MDM4 (Fig7B,C,D).

Parmi ces gènes, deux semblent particulièrement intéressants à étudier dans la suite de ces travaux.



**Fig6 MDM4 inhibe l'état inflammatoire des cellules souches hématopoïétiques FA.** (Pietras EM. Blood. 2017 Oct 12;130(15):1693-1698.)



**Fig7**

**A** Stratégie expérimentale ; **B** Liste des voies altérées dans les LSK KO ; **C** Volcano Plot LSK KO vs LSK WT ; **D** Clustering à partir de la liste de gènes différentiellement exprimés entre les LSK KO et LSK WT.

## 5. Conclusion

L'établissement du modèle KOTg a permis de mettre en évidence que la surexpression de MDM4 atténue les altérations du développement observés dans le modèle KO. Ces résultats confortent l'hypothèse d'une activation de la voie p53 anormale au cours du développement dans un contexte FA et que l'inhibition de cette activation a un effet positif sur la survie cellulaire.

A partir de l'étude approfondie des populations hématopoïétiques souches du modèle KO et KOTg nous avons pu montrer qu'à l'état basal :

- Ces populations sont dans un état « inflammatoire » et que la surexpression de MDM4 restaure en partie un phénotype cellulaire au sein des cellules LSK normal.

- L'état « inflammatoire » semble associé à une activation de gènes cibles de la voie p53 atténués par la surexpression de MDM4. La fonction et le rôle de ces cibles restent à évaluer.

Ce nouveau modèle devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires entraînant l'épuisement des cellules souches et les perturbations du développement, mais également de comprendre les étapes de la transformation leucémique dans la maladie de Fanconi. Son étude devrait, à terme, permettre de mieux la prévenir, la détecter et de tester des traitements potentiels pour limiter l'apparition de l'aplasie médullaire et les risques de SMD/LAM post-greffe.

## **6. Justification financière**

Le financement initial de ce projet était accordé pour 3 ans (2018-2020). Mon départ de l'équipe de M Soulier au 31 décembre 2018 m'a obligé à mettre un terme à ce financement qui m'avait été confié pour ce projet sous convention avec l'université Paris7.

Maître de conférence à l'EPHE, mon établissement vient de valider ma nouvelle affectation auprès de l'unité UMR8200 situé à l'Institut Gustave Roussy. Au sein de cette structure de recherche, je vais rejoindre deux chercheurs impliqués depuis de nombreuses années dans l'étude des mécanismes moléculaires altérés dans la maladie de Fanconi (M. Filippo Rosseli et Mme Valeria Naïm). Ainsi, j'ai l'opportunité de continuer de contribuer à la compréhension de la maladie de Fanconi dans ce nouvel environnement scientifique.

Le financement accordé par l'AFMF, a permis de mettre en œuvre ce nouveau projet en finançant le salaire d'une ingénieure spécialisée dans l'étude des modèles murins (Mme Fedronie) pendant 1 an (2018). En 2018, Il a également financé une partie des consommables et des réactifs nécessaires à la réalisation des analyses et des tries cellulaires en cytométrie en flux ainsi que les consommables nécessaires à la réalisation des expériences de RNA-seq. En 2019, les dépenses engagées permettront la finalisation des expériences de RNA-seq initiées avant mon départ et le stockage des données brutes obtenues tout au long du projet. (Bilan financier en Annexe)

1. Quentin S, et al.. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*. 2011 Apr 14;117(15):e161-70.
2. Ceccaldi, R. et al. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 11, 36-49 (2012)-57.
3. Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 17(6):337-49 (2016).
4. Bartkova, J., et al., DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005. 434(7035): p. 864-70.
5. Pietras EM et al. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*. 2015 Jul 2;17(1):35-46.