

Institut National de Recherche Scientifique Centre Armand-Frappier
Université Clermont Auvergne

VANGL2 EN SITUATION DE STRESS HÉMATOLOGIQUE ET EN CANCÉROLOGIE

Par

Roxanne A. Gauthier

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)

Maîtrise en Sciences expérimentales de la santé de l'INRS

Master en Ingénierie de la santé profil Diagnostic biomédical de l'Université Clermont Auvergne

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Simona Stäger Institut National de la Recherche Scientifique Centre Armand-Frappier
Examineur externe	Paula Michea Veloso Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille
Directeur de recherche	Krista Heinonen Institut National de la Recherche Scientifique Centre Armand-Frappier
Co-directeur de recherche	Mahchid Bamdad Université Clermont Auvergne

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier tous les membres du jury pour le temps qu'ils accorderont à l'évaluation de ce mémoire.

Je remercie également ma directrice de recherche Krista Heinonen de m'avoir accueillie dans son équipe. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné cette merveilleuse opportunité. Merci de m'avoir guidée tout au long de mon parcours. Merci pour la confiance que tu m'as accordée.

Je remercie Sarah Bouali, ma mentore à l'INRS, qui m'a formée dès mon arrivée. Merci pour tes nombreux conseils et tout ce que tu m'as appris.

Un immense merci à Roxann Hétu-Harbour pour sa patience avec moi et pour les très nombreuses prises de sang qu'elle a effectuées sur mes souris. Merci pour tout ton temps et toute ton aide au cours de ces années. Ta présence nous manque.

Merci à mon copain, Hassan-Ismaël Besbes, d'avoir pris le temps de m'écrire un code personnalisé pour l'analyse des données du FACS qui m'a sauvé des heures et des heures de travail. Sans toi, je n'aurais jamais pu compléter ma maîtrise à temps. Merci pour tout ton support moral qui m'a été plus qu'essentiel.

Je remercie Jessy Tremblay, le responsable de la plateforme de la cytométrie en flux de l'INRS, pour son aide et ses précieux conseils.

Je remercie tous les employés du Laboratoire national de biologie expérimentale pour les soins accordés à mes souris.

Je remercie également les autres étudiants qui m'ont accompagnée à l'INRS. Merci à Trieu-Hai Nguyen pour ses conseils avec mes souris, pour les astuces qu'il m'a montrées et pour toujours avoir été prêt à m'aider en cas de besoin. Merci aux autres étudiantes, Chayma Soudani et Margo Boizard, pour votre bonne humeur dans le bureau et pour m'avoir soutenue lors de mes très longues journées.

Je remercie mes co-directrices de mon cursus universitaire en France, Mahchid Bamdad et Emmanuelle Mounetou, de m'avoir sélectionnée pour ce double diplôme et m'avoir ainsi donné l'opportunité de venir étudier en France.

Je remercie Jean-Paul Borg de m'avoir accueillie dans son équipe, me permettant de découvrir la recherche en cancérologie. Merci d'avoir vu mon potentiel et de m'avoir ainsi fait confiance.

Un immense merci à Alexandra Walton, ma superviseuse de stage, qui a su m'accompagner et qui a tout fait pour que je puisse avoir une formidable expérience au CRCM. Merci de m'avoir tant appris.

Merci à Sylvie Marchetto de m'avoir accueillie dès mon arrivée au CRCM et de m'avoir initiée aux bases de la culture cellulaire.

Merci à Avais pour ces cellules et ses conseils tout au long de mon stage en France. Sans toi, j'aurais été perdue au laboratoire. Merci pour ton enthousiasme si contagieux.

Merci à Rania pour ces cellules et son expertise sur les MCF7. Merci également pour toute ton aide avec le microscope à fluorescence.

Je remercie tous les autres stagiaires, Zinedine, Louis, Giulia, de l'équipe Polarisation cellulaire, signalisation et cancer du CRCM pour vos conseils et votre bonne humeur. Merci d'avoir partagé tous ces moments avec moi. Un merci tout spécial à Lola Orlando, d'avoir brièvement été ma co-stagiaire et de m'avoir aidée dans les manipulations. Sans toi, mes journées auraient été particulièrement longues.

Merci à l'équipe de D.Devenport, Princeton, USA de nous avoir envoyé leurs plasmides Celsr1/2-GFP qui nous ont été si utiles lors de mon stage en France.

Merci à mes parents pour tout leur support moral qu'ils m'ont procuré lors de cette maîtrise et merci à ma meilleure amie, Amélie, de m'avoir encouragée à donner le meilleur de moi-même.

AVANT-PROPOS

La rédaction de ce mémoire s'inscrit dans le cadre de l'accord de bi-diplomation entre la maîtrise en Sciences expérimentales de la santé de l'INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologies (Québec, Canada) et le Master d'Ingénierie de la santé, parcours diagnostic biomédical de l'Université Clermont Auvergne (France). Les résultats présentés ci-après sont donc le fruit de deux recherches distinctes portant toutes les deux sur VANGL2.

VANGL2 est une protéine membranaire faisant partie de la voie de signalisation WNT/PCP. L'expression de *Vangl2* ou VANGL2 est essentielle à la survie de l'embryon. Il permet une organisation de l'orientation des cellules d'un même tissu et plusieurs phénotypes anormaux et maladies ont été associés à la mutation de ce gène. Un des plus connus, est le phénotype *Loop tail*, où les souris *Vangl2*^{Lp/Lp} ont une queue torsadée. Cependant, bien que plusieurs études se sont concentrées sur VANGL2 dans les cellules épithéliales, son rôle dans d'autres contextes reste encore à déterminer.

Plus particulièrement, le rôle de VANGL2 dans les cellules hématopoïétiques n'a, jusqu'à présent, jamais été étudié, à notre connaissance, par un autre laboratoire que celui de Krista Heinonen, PhD. C'est donc ainsi que j'ai commencé à travailler sur VANGL2 murin. La première partie de ce mémoire relate mes expériences effectuées à l'INRS sous la supervision du P^{re} Heinonen. Pour une durée totalisant un an, j'ai travaillé à déterminer quel est le rôle de VANGL2 dans la reprise de l'hématopoïèse à la suite d'une irradiation sous-létale (Partie I).

Également, lors de mes études effectuées en France, j'ai effectué un stage de plusieurs mois au Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille sous la supervision d'Alexandra Walton, PhD. Lors de ce stage, j'ai travaillé sur plus d'un projet qui concernaient VANGL2, mais je me suis particulièrement concentrée sur le rôle du complexe CELSR2-VANGL2 dans les cancers du sein triple négatifs (Partie II).

RÉSUMÉS

PARTIE I

Les voies de signalisation WNT sont essentielles pour plusieurs fonctions des cellules souches hématopoïétiques et progénitrices (HSPC) lors de l'hématopoïèse. Une des voies de signalisation Wnt permet la polarisation planaire des cellules (PCP). Un des éléments de la voie Wnt/PCP, la protéine *Van Gogh-like 2* (VANGL2), est fortement exprimé sur les HSPC et les mégacaryocytes. Nous avons précédemment démontré que VANGL2 est nécessaire pour le maintien des HSPC lors de greffes successives dans les souris. Notre recherche consiste maintenant à déterminer le rôle de VANGL2 dans son environnement natif lors d'une reprise hématopoïétique et dans les progéniteurs myéloïdes. Notre hypothèse est qu'en absence de VANGL2, la reprise de l'hématopoïèse sera perturbée, accompagnée d'une diminution de plaquettes. Des souris de type sauvage et *Vangl2^{ΔΔ}* furent irradiées à 4,5 Gy, afin d'induire un stress génotoxique détruisant les cellules matures. Les cellules de la moelle osseuse et de la rate furent récoltées 11 ou 21 jours post-irradiation, en plus de prises de sang régulières, le tout analysé par cytométrie en flux. Nous démontrons qu'en absence de VANGL2, un dérèglement âge-dépendant de la prolifération des HSPC mène à une perte de leur réserve à long-terme, accompagné d'une hausse des progéniteurs érythro-mégacaryocytaires dans les organes hématopoïétiques 11 jours après l'irradiation. Notre recherche offre de nouvelles connaissances sur la différenciation des HSPC lors de stress aigus.

Mots-clés : Cellules souches hématopoïétiques ; Hématopoïèse ; VANGL2 ; Voie de signalisation WNT/PCP ; mégacaryocytes ; plaquettes ; thrombocytes

PARTIE II

La connaissance du mode d'action de la voie WNT/PCP et de son implication dans l'oncogenèse reste encore superficielle. Le récepteur de la voie WNT/PCP VANGL2 est surexprimé dans les cancers du sein triple négatif, un sous-type de cancer du sein très agressif. L'équipe de Jean-Paul Borg a récemment identifié CELSR2, un co-récepteur de la famille des récepteurs couplé aux protéines G, dont la surexpression avec VANGL2 assombrit le pronostic des patientes. Le mode d'activation de CELSR2 est actuellement peu documenté. L'objectif de ce stage était de débiter la caractérisation de CELSR2 de façon dépendante ou indépendante de VANGL2. Cette étude a permis de constater la localisation membranaire de CELSR2 dans les MCF7, de comparer l'expression protéique de CELSR2 dans différentes cellules cancéreuses mammaires et d'évaluer l'influence du niveau d'expression de CELSR2 sur VANGL2 et inversement. Un effet sur l'organisation des jonctions à la suite de la diminution d'expression de CELSR2 a également été mis en évidence. Les résultats de cette étude place l'équipe d'accueil dans une excellente situation pour évaluer le rôle de CELSR2 et de l'interaction VANGL2/CELSR2 dans la cancérogenèse mammaire grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Mots-clés : CELSR2 ; VANGL2 ; Voie de signalisation WNT/PCP ; Cancer du sein triple négatif ; cancérogenèse, TNBC

ABSTRACTS

PART I

WNT signaling pathways are essential for many functions of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) during hematopoiesis. One of these pathways enables the planar cell polarity (PCP) of cells. While several components of the WNT/PCP pathway are involved in regulating hematopoietic cells, one of them, the protein Van Gogh-like 2 (VANGL2), is poorly studied in hematopoietic cells even though it's highly expressed in HSPC and megakaryocytes. We previously demonstrated that VANGL2 is essential for sustaining HSPC during serial transplantations in mice. Our current research aims to determine the role of VANGL2 in its native environment during hematopoietic recovery and in myeloid progenitors. We hypothesized that in the absence of VANGL2, hematopoietic recovery would be incomplete or abnormal, accompanied by a decrease in platelet production. We irradiated wild type and *Vangl2^{ΔΔ}* mice at 4.5 Gy to induce genotoxic stress, destroying mature cells. To monitor hematopoietic recovery, we collected bone marrow and splenic cells 11 or 21 days post-irradiation and conducted regular blood draws. The cellular populations of these organs were analyzed using flow cytometry. We demonstrate that in the absence of VANGL2, there is an age-dependent disruption in HSPC proliferation, eventually leading to a loss of HSPC pool on the long-term. Furthermore, there's an increase in erythromegakaryocytic progenitors 11 days post-irradiation. Our research provides new insights into the differentiation of HSPC during acute stress.

Keywords : hematopoietic stem cells; hematopoiesis; VANGL2, WNT/PCP pathway; megakaryocytes; platelets; thrombocytes

PART II

Knowledge of WNT/PCP pathway's activation and its involvement in oncogenesis remains superficial. The WNT/PCP pathway receptor VANGL2 is overexpressed in triple negative breast cancer, an extremely aggressive breast cancer subtype. Jean-Paul Borg's team recently identified CELSR2, a co-receptor of the G protein-coupled receptor family, whose overexpression with VANGL2 worsens the prognosis of patients. The mode of activation of CELSR2 is currently poorly documented. The objective of this internship was to begin CELSR2's characterization dependently and independently of VANGL2. In this study, it was possible to observe CELSR2's membrane localization in the MCF7 lineage, to compare CELSR2's protein expression in different breast cancer cells and to evaluate the influence of CELSR2's level of expression on VANGL2 and vice versa. An effect on the organization of junctions following the decrease in expression of CELSR2 has also been demonstrated. The results of this study put the team in an excellent position to assess the role of CELSR2 and the VANGL2/CELSR2 interaction in breast carcinogenesis using *in vitro* and *in vivo* models.

Keywords : VANGL2; CELSR2; WNT/PCP pathway; Cancerogenesis; Triple negative breast cancer, TNBC

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	III
AVANT-PROPOS	V
RÉSUMÉS.....	VII
ABSTRACTS	IX
TABLE DES MATIÈRES.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES TABLEAUX	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIX
PARTIE I VANGL2 EST ESSENTIEL LORS DE LA REPRISE HÉMATOPOIÉTIQUE À LA SUITE D'UNE IRRADIATION SOUS-LÉTALE	1
1 INTRODUCTION	5
1.1 HEMATOPOÏÈSE	5
1.1.1 <i>Hématopoïèse embryonnaire et fœtale</i>	8
1.1.2 <i>Hématopoïèse adulte</i>	9
1.2 NICHE HEMATOPOÏÉTIQUE.....	9
1.2.1 <i>Niche endostéale</i>	10
1.2.2 <i>Niche périvasculaire</i>	11
1.2.3 <i>Autres éléments importants pour le maintien des CSH</i>	12
1.2.4 <i>Hématopoïèse extra-médullaire, thymopoïèse et hématopoïèse d'urgence</i>	13
1.3 MÉGACARYOPOÏÈSE	15
1.4 LES VOIES DE SIGNALISATION WNT	16
1.4.1 <i>La signalisation canonique WNT/β-caténine</i>	17
1.4.2 <i>La signalisation WNT/Ca^{2+}</i>	18
1.4.3 <i>La signalisation WNT/PCP</i>	19
1.5 LA VOIE WNT/PCP DANS LES CELLULES HEMATOPOÏÉTIQUES	24
1.6 OBJECTIF ET HYPOTHÈSE	27

2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	29
2.1	ÉTHIQUE ANIMALE	29
2.2	CYTOMETRIE EN FLUX.....	29
2.3	CULTURE CELLULAIRE	30
2.4	TESTS STATISTIQUES.....	30
3	RÉSULTATS	33
3.1	EN ABSENCE DE VANGL2, LES HSPC ONT UN DEREGLEMENT DE LEUR PROLIFERATION ET PERDENT LEUR CAPACITE DE SE MAINTENIR DANS LA MOELLE OSSEUSE EN CAS DE STRESS GENOTOXIQUE	33
3.2	LES RATES <i>VANGL2^{Δ/Δ}</i> ONT DES NODULES A LA SUITE D'UN STRESS TOXIQUE	40
3.3	L'ABSENCE DE VANGL2 CHEZ LES CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES IMPACTE LES PROGÉNITEURS ÉRYTHRO-MÉGACARYOCITAIRES LORS DE LA REPRISE HÉMATOPOÏÉTIQUE	41
3.4	RUNX1B N'EST PAS RESPONSABLE DE LA DÉRÉGULATION DES HSPC <i>VANGL2^{Δ/Δ}</i>	47
3.5	RECONSTITUTION PARTIELLE DES POPULATIONS DE CELLULES MATURES CHEZ LES SOURIS <i>VANGL2^{Δ/Δ}</i> À LA SUITE D'UNE IRRADIATION SOUS-LÉTALE.....	49
4	DISCUSSION	55
5	CONCLUSION.....	63
PARTIE II ÉTUDE DU COMPLEXE CELSR2-VANGL2 DANS LES CANCERS DU SEIN TRIPLE NÉGATIFS		65
6	INTRODUCTION	69
6.1	OBJECTIFS ET HYPOTHESE	72
7	MATÉRIEL ET MÉTHODE	73
7.1	CULTURES CELLULAIRES.....	73
7.1.1	<i>MCF7 et HEK293T</i>	73
7.1.2	<i>SUM149</i>	73
7.2	TRANSFECTION	73
7.3	MICROSCOPIE D'IMMUNOFLUORESCENCE	73

7.4	WESTERN BLOT.....	74
7.5	MIDIPREP	74
8	RESULTATS	75
8.1	VALIDATION DES OUTILS QUI PERMETTRONT D'ETUDIER L'INTERACTION CELSR2 VANGL1/2 DANS LA CANCEROGENESE MAMMAIRE.....	75
8.2	ÉTUDE DE LA LOCALISATION DE CELSR2	78
8.3	ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE CELSR2 DANS DIFFERENTES LIGNEES CANCEREUSES MAMMAIRES ET DE L'INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE CELSR2 SUR VANGL1/2 ET INVERSEMENT	79
8.4	IMPACT DE LA PERTE D'EXPRESSION DE CELSR2 SUR LA FORMATION DES JONCTIONS ADHERENTES	80
9	DISCUSSION	83
10	CONCLUSION.....	87
11	BIBLIOGRAPHIE	89
12	ANNEXE I	103
13	ANNEXE II	107

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	DIFFERENCIATION DES CELLULES PROGENITRICES ET LEUR BIAIS.....	7
FIGURE 1.2	DIVISION ASYMETRIQUE POLARISEE DES CSH.....	8
FIGURE 1.3	REPRESENTATION DE LA SIGNALISATION WNT/B-CATENINE	18
FIGURE 1.4	REPRESENTATION DES PROTEINES DE LA VOIE WNT/PCP DANS LES CELLULES EPITHELIALES	23
FIGURE 3.1	LIGNE DU TEMPS DES PRELEVEMENTS D'ORGANES DES SOURIS IRRADIEES	33
FIGURE 3.2	STRATEGIE DE SELECTION DES HSPC DANS LA MOELLE OSSEUSE	34
FIGURE 3.3	ANALYSE DES HSPC <i>VANGL2^{Δ/Δ}</i> DE SOURIS 3 MOIS	36
FIGURE 3.4	DEREGLEMENT DES HSPC <i>VANGL2^{Δ/Δ}</i> DE SOURIS DE 5 MOIS.....	37
FIGURE 3.5	STRATEGIE DE SELECTION DES COLONIES MYELOÏDES.....	38
FIGURE 3.6	L'ABSENCE DE <i>VANGL2</i> AUGMENTE LA CELLULARITE DES COLONIES <i>IN VITRO</i>	39
FIGURE 3.7	HEMATOPOÏESE EXTRA-MEDULLAIRE CHEZ LES JEUNES SOURIS <i>VANGL2^{Δ/Δ}</i>	41
FIGURE 3.8	STRATEGIE DE SELECTION DES PROGENITEURS MYELOÏDES DANS LA MOELLE OSSEUSE	43
FIGURE 3.9	STRATEGIE DE SELECTION DES PROGENITEURS MYELOÏDES SPLENIQUES	44
FIGURE 3.10	VARIATION DES PROGENITEURS MYELOÏDES DANS LA MOELLE OSSEUSE	45
FIGURE 3.11	VARIATION DES PROGENITEURS MYELOÏDES SPLENIQUES AU JOUR 21	46
FIGURE 3.12	L'EXPRESSION DE <i>RUNX1B</i> EST INCHANGEE EN ABSENCE DE <i>VANGL2</i>	48
FIGURE 3.13	STRATEGIE DE SELECTION DES CELLULES MATURES MYELOÏDES	50
FIGURE 3.14	STRATEGIE DE SELECTION DES CELLULES MATURES LYMPHOÏDES	51
FIGURE 3.15	RETABLISSEMENT PARTIEL DES CELLULES MATURES DANS LA RATE ET LA MO	53
FIGURE 3.16	RECONSTITUTION DU SANG PERIPHERIQUE	54
FIGURE 6.1	ORGANISATION DE LA VOIE Wnt/PCP	71
FIGURE 8.1	TEST DE LA SPECIFICITE DE L'ANTICORPS A- <i>CELSR2</i> PAR WESTERN BLOT	76

FIGURE 8.2	TEST DE L'EFFICACITE DE L'ANTICORPS COMMERCIAL A-CELSR2 EN IMMUNOFLUORESCENCE.....	77
FIGURE 8.3	EXPRESSION DES PLASMIDES CELSR1-GFP ET CELSR2-GFP MURINS DANS LES CELLULES HEK293T	78
FIGURE 8.4	LOCALISATION DE CELSR2-GFP MURIN DANS LES CELLULES MCF7	78
FIGURE 8.5	EXPRESSION PROTEIQUE DE CELSR2 ET DE VANGL2 DANS LES SUM149 ET DANS LES MCF7.....	79
FIGURE 8.6	ANALYSE DE L'EFFET DE LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE CELSR2 SUR LA LOCALISATION DE E-CADHERINE ET DE VANGL1 DANS LES MCF7.....	81
FIGURE 12.1	ANALYSE DES PREMEGE A LA SUITE DE L'IRRADIATION.....	103
FIGURE 12.2	ANALYSE DU SANG PERIPHERIQUE DES SOURIS NON-IRRADIEES.....	104
FIGURE 12.3	DONNEES PRELIMINAIRES SUR LES HSPC DANS LA RATE	105
FIGURE 13.1	CULTURE BACTERIENNE SUR DE L'AGAR-KAMAMYCINE DE DH5A TRANSFORMES AVEC LES PLASMIDES DE CELSR1-GFP MURIN ET CELSR2-GFP MURIN	107
FIGURE 13.2	CELLULES HEK293T A LA SUITE DE LA TRANSFECTION DES PLASMIDES CELSR1/2-GFP MURINS.....	107

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	MARQUEURS CELLULAIRES DES HSPC.....	6
TABLEAU 2.1	LISTE DES ANTICORPS UTILISES EN CYTOMETRIE EN FLUX.....	31
TABLEAU 6.1	ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DES PROTEINES CO-IMMUNOPRECIPITEES AVEC GFP-VANGL2 PAR GFP-TRAP ET IDENTIFIEES COMME INTERACTEUR CONNU (VANGL1) ET NOUVEAU (CELSR2)	71
TABLEAU 6.2	EXPRESSION DE L'ARNM EVALUEE PAR DEPMAP POUR VANGLS ET CELSRs DANS LES LIGNEES DE CANCERS MAMMAIRES ETUDIEES (DEPMAP)	72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviation	Nom	Nom en français
β -TrCP	β -transducin-repeat-containing protein	Protéine contenant des répétitions de β -transducine
AGM	Aorta-Gonad-Mesonephros	Aorte-Gonades-Mésonephros
AML	Acute Myeloid Leukemia	Leucémie myéloïde aiguë
ANGP	Angiopoietin	Angiopoïétine
ANGPTL	Angiopoietin-Like Protein	Protéine similaire à l'angiopoïétine
APC	Adenomatous Polyposis Coli	Polypose Adénomateuse du Coli
ATF	Activating Transcription Factor	Facteur de transcription activateur
BAX	Bcl-2 Associated X Protein	Protéine associée à Bcl-2 X
BCL	B-Cell Lymphoma	Lymphome des cellules B
BFU	Burst-Forming Unit	Unité formant des bourgeons
BMP	Bone Morphogenetic Protein	Protéine morphogénétique osseuse
BSA	Bovine Serum Albumin	Albumine de sérum bovin
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	Adénosine monophosphate cyclique
CBP	CREB-Binding Protein	Protéine de liaison à CREB
CDC	Cell Division Cycle	Division de cycle cellulaire
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	Kinase dépendante des cyclines
CELSR	Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor	Récepteur de type EGF LAG Seven-Pass de la famille des cadhérines
CFU	Colony-Forming Unit	Unité formant une colonie
CK-1	Casein kinase	Caséine kinase 1
c-KIT	Stem Cell Factor Receptor	Récepteur du facteur de croissance des cellules souches
CLP	Common Lymphoid Progenitor	Progéniteur lymphoïde commun

CMP	Common Myeloid Progenitor	Progéniteur myéloïde commun
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein	Protéine de liaison à l'élément de réponse cAMP
CSF	Colony-Stimulating Factor	Facteur de stimulation des colonies
CSH	Hematopoietic stem cell (HSC)	Cellule souche hématopoiétique
CT-CSH	Short-term hematopoietic stem cell	CSH à court-terme
CTRL	Control	Contrôle
DAG	Diacylglycerol	Diacylglycérol
DEP	Dishevelled, Egl-10 et Pleckstrin	<i>Représente les protéines dans lequel le domaine a été identifié initialement</i>
DVL	Dishevelled	Dishevelled
ECT	Epithelial Cell Transforming oncogene	l'oncogène de Transformation des cellules épithéliales
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor	Facteur de croissance épidermique
ELK	ETS Domain-Containing Protein	Protéine contenant un domaine ETS
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation	Dégradation de protéines associées au réticulum endoplasmique
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	Kinase régulée par un signal extracellulaire
FBS	Fetal Bovine Serum	Sérum de veau fœtal
FGF	Fibroblast Growth Factor	Facteur de croissance des fibroblastes
MFI	Mean Fluorescence Intensity	Intensité de fluorescence moyenne
FZD	Frizzled	Frizzled
GAP	GTPase-Activating Protein	Protéine activatrice de GTPase
GATA	GATA Binding Protein	Protéine de liaison GATA

GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor	Facteur d'échange de nucléotides de guanine
GMP	Guanosine Monophosphate	Monophosphate de guanosine
GPCR	G Protein-Coupled Receptor	Récepteur couplé à une protéine G
GSK	Glycogen Synthase Kinase	Kinase de la glycogène synthase
GTP	Guanosine Triphosphate	Triphosphate de guanosine
HDAC	Histone Deacetylase	Histone désacétylase
HEK293T	Human Embryonic Kidney Cells	Cellules rénales embryonnaires humaines
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor	Récepteur du facteur de croissance épidermique humain
HSPC	Hematopoietic Stem and Progenitor Cells	Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase	Kinase c-Jun N-terminale
LAG	Lymphocyte-Activation Gene	Gène d'activation des lymphocytes
LEF	Lymphoid Enhancer-Binding Factor	Facteur de liaison à l'amplificateur lymphoïde
LMPP	Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor	Progéniteur multipotent préparé pour les cellules lymphoïdes
LRP	Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein	Protéine apparentée au récepteur des lipoprotéines de basse densité
LSK	Lin- SCA-1+ c-KIT+	Lin- SCA-1+ c-KIT+
LT-CSH	Long-term hematopoietic stem cell	CSH à long-terme
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	Kinase activée par les mitogènes
MCF7	Breast cancer cell line with estrogen, progesterone and glucocorticoid receptors	Lignée cellulaire de cancer du sein avec récepteurs d'oestrogène, de progestérone et de glucocorticoïdes
MEP	Megakaryocyte-Erythroid Progenitor	Progéniteur mégacaryocytaire-érythroïde

MFI	Mean Fluorescence Intensity	Intensité moyenne de fluorescence
CaMKII	Calmodulin-dependent protein kinase II	kinase calmoduline-dépendante II
MKL	Megakaryoblastic Leukemia	Leucémie mégacaryoblastique
MkP	Megakaryocyte Progenitor	Progéniteur de mégacaryocytes
MPC	Myeloid Progenitor Cells	Cellules myéloïdes progénitrices
MPL	Thrombopoietin Receptor	Récepteur de la thrombopoïétine
MPP	Multipotent Progenitor	Progéniteur multipotent
MSC	Mesenchymal Stem Cell	Cellule souche mésenchymateuse
MTG	Myeloid Translocation Gene	Gène de translocation myéloïde
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-Cells	Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NOS	Nitric Oxide Synthase	Synthase de l'oxyde nitrique
PBS	Phosphate-Buffered Saline	Solution saline tamponnée au phosphate
PCAF	p300/CBP-Associated Factor	Facteur associé à p300/CBP
PCP	Planar Cell Polarity	Polarité cellulaire plane
PDZ	Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor et Zonula occludens-1 protein	<i>Représente les protéines dans lequel le domaine a été identifié initialement</i>
PEI	Polyethyleneimine	Polyéthylèneimine
PFA	Paraformaldehyde	Paraformaldéhyde
PIP	Phosphatidylinositol Phosphate	Phosphatidylinositol phosphate
PKC	Protein Kinase C	Kinase C protéique
PLC	Phospholipase C	Phospholipase C
PLT	Platelet	Plaquette

PreMegE	Pre-Megakaryocytic and pre-erythroid progenitors	Cellules pré-mégacaryocytes et pré-érythroïdes
PTK	Protein Tyrosine Kinase	Kinase tyrosine protéique
RAC	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate	Substrat de la toxine botulique apparenté à Ras C3
RACK	Receptor for Activated C Kinase	Récepteur pour la kinase C activée
RCPG	G Protein-Coupled Receptors	Récepteurs couplés aux protéines G
RHO	Ras Homolog	Homologue de Ras
RHOA	Ras Homolog Family Member A	Membre de la famille Ras A
ROCK	Rho-Associated Coiled-Coil Kinase	Kinase associée à Rho en bobine enroulée
ROR	Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor	Récepteur tyrosine kinase-like orphelin
ROS	Reactive Oxygen Species	Espèces réactives de l'oxygène
RUNX	Runt-Related Transcription Factor	Facteur de transcription apparenté à Runt
RYK	Receptor-Like Tyrosine Kinase	Récepteur apparenté à la tyrosine kinase
SCA-1	Stem Cell Antigen-1	Antigène-1 des cellules souches
SCF	Stem Cell Factor	Facteur de croissance des cellules souches
SCRIB	Scribble	Scribble
SRF	Serum Response Factor	Facteur de réponse sérique
SUM149	Triple-negative inflammatory breast cancer cell line	Lignée cellulaire du cancer du sein triple négatif de type inflammatoire
TCF	T-Cell Factor	Facteur des cellules T
TGF	Transforming Growth Factor	Facteur de croissance transformant

TIE	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains	Kinase à tyrosine avec des domaines d'homologie à l'immunoglobuline et au EGF
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer	Cancer du sein triple négatif
TNF	Tumor Necrosis Factor	Facteur de nécrose tumorale
TPO	Thrombopoietin	Thrombopoïétine
WIF	Wnt Inhibitory Factor	Facteur inhibiteur Wnt
WNT	Wingless-Integration	Wingless-Integration

PARTIE I
VANGL2 EST ESSENTIEL LORS DE LA REPRISE HÉMATOPOIÉTIQUE À
LA SUITE D'UNE IRRADIATION SOUS-LÉTALE

Centre Armand-Frappier
Santé Biotechnologie

VANGL2 EST ESSENTIEL LORS DE LA REPRISE HÉMATOPOIÉTIQUE À LA SUITE D'UNE IRRADIATION SOUS-LÉTALE

Par
Roxanne A. Gauthier

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
Maîtrise en sciences expérimentales de la santé de l'INRS

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Simona Stäger Institut National de la Recherche Scientifique Centre Armand-Frappier
Examineur externe	Paula Michea Veloso Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille
Directeur de recherche	Krista Heinonen Institut National de la Recherche Scientifique Centre Armand-Frappier
Co-directeur de recherche	Mahchid Bamdad Université de Clermont Auvergne

1 INTRODUCTION

1.1 Hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus responsable de la production continue des cellules sanguines. Ce mécanisme dynamique se déroule principalement dans la moelle osseuse, où les cellules souches hématopoïétiques (CSH) résident et se différencient en diverses lignées cellulaires spécialisées. Parmi ces lignées, on retrouve la lignée myéloïde qui permet de produire les érythrocytes, les mégacaryocytes et les plaquettes, les granulocytes et les monocytes et la lignée lymphoïde qui produit les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules *natural killer*. Les lignées myéloïde et lymphoïde sont toutes deux en mesure de produire des cellules dendritiques.

Cependant, la majorité des CSH ont la particularité de demeurer principalement dans une phase inactive du cycle cellulaire. Ceci est représenté par la phase G₀, où les cellules sont quiescentes. Il n'y a aucune réplication, aucune division et aucune synthèse d'ADN. Cet état quiescent des CSH est atteint après la naissance (Bowie *et al.*, 2006) et permet de prévenir l'épuisement cellulaire et une sénescence prématurée (Pietras *et al.*, 2011). Ces CSH quiescentes à long terme (LT-CSH) ont une haute capacité d'auto-renouvellement et composent ainsi la majorité de la réserve de CSH. Elles peuvent maintenir leur état de quiescence pendant plusieurs mois et complètent rarement un cycle de division cellulaire (Laurenti & Gottgens, 2018; Pietras *et al.*, 2011), mais lors de stress, le passage de la phase G₀ à G₁ peut être facilité afin de les activer plus rapidement et augmenter la production de cellules hématopoïétiques (Pietras *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2008). À l'état physiologique, la majorité des cellules sanguines sont produites par une minorité de CSH qui ont une capacité de division élevée, mais une faible capacité d'auto-renouvellement. Demeurant dans la phase de quiescence pour une période de temps plus courte, ces progéniteurs sont désignés comme étant les CSH à court terme (CT-CSH) (Pietras *et al.*, 2011).

Durant l'hématopoïèse, les CSH vont d'abord se différencier en progéniteurs multipotents (*Multipotent progenitor cells*) (MPP). Les MPP n'ont aucune capacité d'auto-renouvellement (Cheng *et al.*, 2020; Pietras *et al.*, 2015). Toutes les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC) sont caractérisées par leur absence de marqueurs cellulaires matures (Lin⁻) et par la présence de l'antigène 1 des cellules souches (*stem cell antigen 1*) (SCA-1) et de c-KIT/CD117, qui est le récepteur du facteur de cellules souches (*stem cell factor*) (SCF). Ainsi, les CSH et les MPP sont tous Lin⁻SCA-1⁺c-KIT⁺ (LSK). Malgré tout, les MPP possèdent une certaine hétérogénéité au niveau de leurs marqueurs de surfaces représentant un biais dans leur

différenciation (Tableau 1.1), bien qu'ils soient en mesure de produire toutes les cellules hématopoïétiques matures (Pietras *et al.*, 2015). Ainsi, les MPP2 et les MPP3 ont tendance à se différencier en cellules progénitrices myéloïdes (CMP), alors que les MPP4 ont plutôt tendance à se différencier en cellules progénitrices lymphoïdes (CLP) (Cheng *et al.*, 2020; Pietras *et al.*, 2015). Vu le biais des MPP4 vers la lignée lymphoïde, ils sont parfois désignés comme des progéniteurs lymphoïdes multipotents (LMPP) (Cheng *et al.*, 2020; Pietras *et al.*, 2015), tout en étant en mesure de produire des cellules myéloïdes lors de stress (Pietras *et al.*, 2015).

Tableau 1.1 Marqueurs cellulaires des HSPC

HSPC	Marqueurs cellulaires
LT-CSH	CD150 ⁺ CD34 ⁻ Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD135 ⁻ CD48 ⁻
CT-CSH (MPP1)	CD150 ⁻ CD34 ⁺ Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD135 ⁻ CD48 ⁻
MPP2	CD150 ⁺ CD34 ⁻ Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD135 ⁻ CD48 ⁺
MPP3	CD150 ⁻ CD34 ⁻ Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD135 ⁻ CD48 ⁺
MPP4 (LMPP)	CD150 ⁻ CD34 ⁺ Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ CD135 ⁺ CD48 ⁺

Sources : (Engelhardt *et al.*, 2002; Oguro *et al.*, 2013; Pietras *et al.*, 2015)

Bien que les MPP2 et les MPP3 se différencient tous deux en CMP, de récentes études suggèrent que les CMP se seraient pas un type de cellule précis, mais plutôt un compartiment hétérogène qui regroupe différents progéniteurs myéloïdes qui ont eux-mêmes un biais de différenciation. On y retrouve donc les cellules Pré-progénitrices des granulocytes et monocytes (Pre-GMP) et les cellules pré-mégacaryocytes et pré-érythroïdes (PreMegE) (Drissen *et al.*, 2016; Solomon *et al.*, 2020). Les PreMegE font elles-mêmes parties du compartiment des progéniteurs des mégacaryocytes et des érythrocytes (MEP) (Solomon *et al.*, 2020). Les PreMegE se différencient ensuite en progéniteur de mégacaryocytes (MkP) ou en cellule formant des colonies érythrocytaires (CFU-E). Une étude a d'ailleurs démontré que les PreMegE exprimant le récepteur CD34 à leur surface ont tendance à devenir des MkP (Draper *et al.*, 2016).

Comme mentionné précédemment, les LT-CSH sont supposées être les cellules hématopoïétiques les plus indifférenciées. Pourtant, certaines d'entre elles possèdent des caractéristiques rappelant les mégacaryocytes. Ces LT-CSH expriment, entre autres, le récepteur CD41 à la surface de leur cellule et le facteur de von Willebrand (Gekas & Graf, 2013; Sanjuan-Pla *et al.*, 2013). Certaines études se sont penchées sur ce sous-groupe de LT-CSH et ont démontré qu'elles sont en mesure de contourner la pyramide de différenciation habituelle illustrée à la Figure 1.1 et auraient le potentiel de se différencier directement en MkP (Nishikii *et al.*, 2017;

Psaila & Mead, 2019). Cette proportion de LT-CSH avec un biais pour les MkP augmenterait avec l'âge (Gekas & Graf, 2013; Sanjuan-Pla *et al.*, 2013).

Lors de leur division à la phase M du cycle cellulaire, les CSH peuvent produire soit deux MPP, deux nouvelles CSH identiques à la CSH-mère ou plus généralement, à l'état physiologique, elles se diviseront en une MPP et une nouvelle CSH identique à la CSH-mère, requérant une division asymétrique de la cellule (Figure 1.2). Ceci permet simultanément la production constante de cellules sanguines et le maintien de la réserve de CSH (Pham *et al.*, 2014).

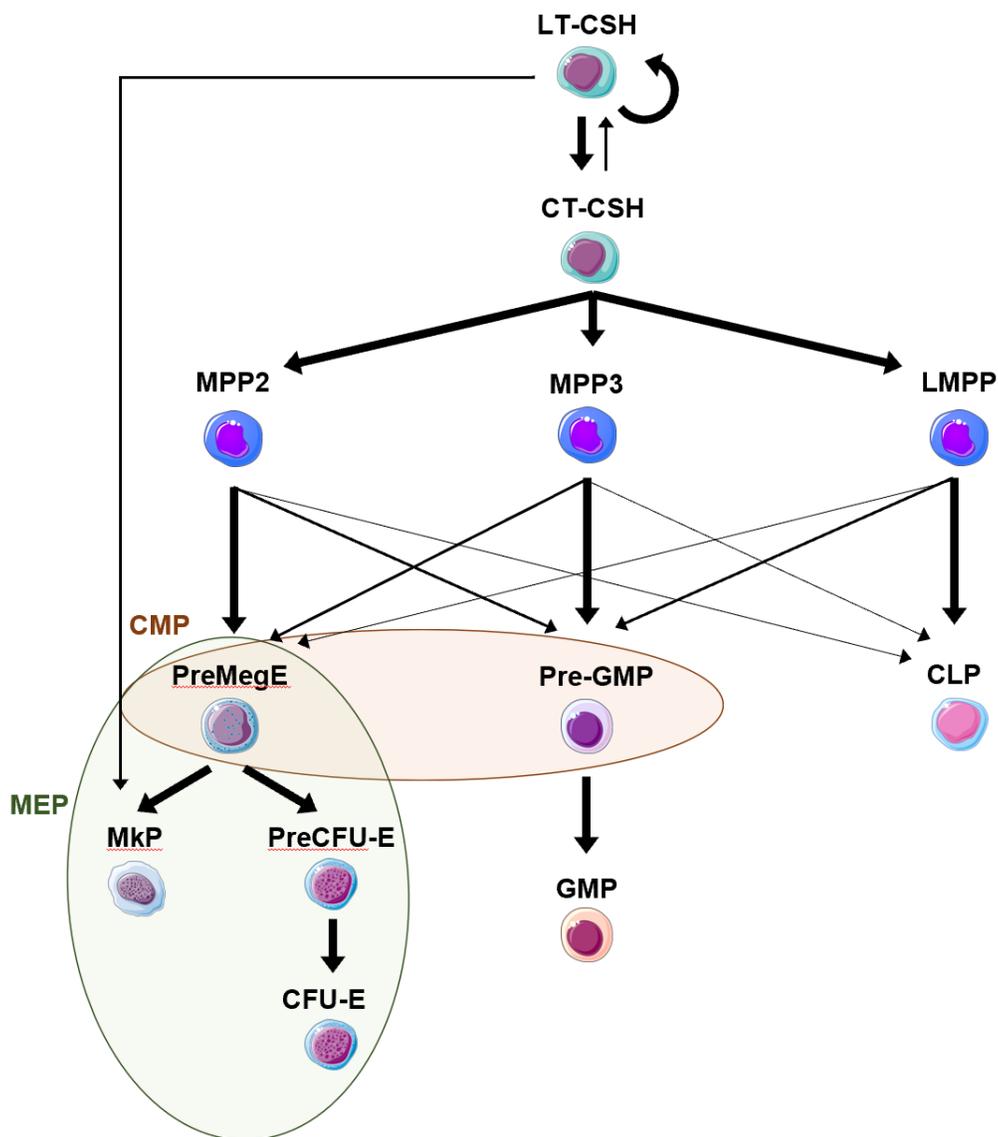


Figure 1.1 Différenciation des cellules progénitrices et leur biais.

L'épaisseur des flèches indique la susceptibilité des cellules progénitrices à suivre cette direction dans leur différenciation, adapté de Pietras *et al.*, 2015. Figure créée à l'aide de smart.servier.com.

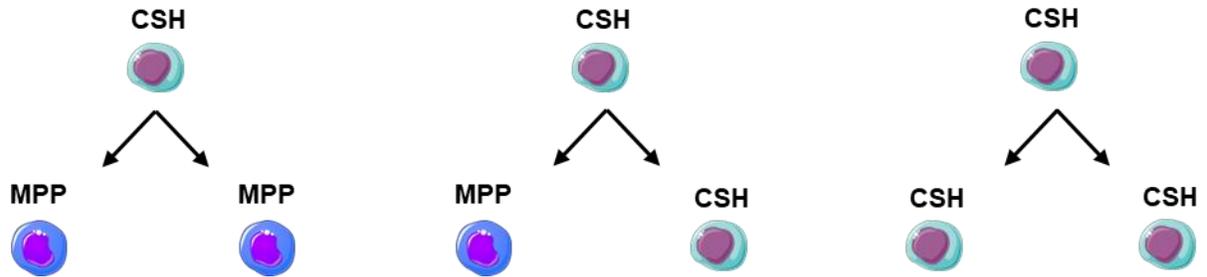


Figure 1.2 Division asymétrique polarisée des CSH.

Au centre, il est possible de voir la division des CSH à l'état homéostatique. Une CSH produit une nouvelle CSH et une MPP qui devient une cellule différenciée du sang. À gauche, le modèle de division permet de produire des cellules du sang plus rapidement. À droite, le modèle de division permet une prolifération des CSH. Figure créée à l'aide de smart.servier.com

1.1.1 Hématopoïèse embryonnaire et fœtale

L'hématopoïèse débute lors de l'embryogenèse dans le sac vitellin et peut être divisée en deux vagues. La première vague se produit autour du 7^e jour du développement embryonnaire de la souris ou du 17^e jour du développement embryonnaire humain. Cette hématopoïèse primitive permet la production d'érythrocytes, de mégacaryocytes et de pré-macrophages qui n'ont pas d'intermédiaire monocytique (Julien *et al.*, 2016; Mack *et al.*, 2021; Yamane, 2018). Les cellules hématopoïétiques ne proviennent pas de la différenciation de CSH comme chez l'adulte, mais plutôt d'hémangioblastes dérivés de cellules mésodermiques indifférenciées qui se situent dans le mésoderme extra-embryonnaire (Julien *et al.*, 2016). La deuxième vague se produit entre le 8^e et le 11^e jour embryonnaire de la souris ou entre la 3^e et 5^e semaine post-fécondation chez l'humain dans la région embryonnaire aorte-gonades-mésonephros (AGM). Des CSH immatures sont produites dans l'AGM et subissent une série de modifications permettant une spécification hématopoïétique. Ces CSH vont ensuite migrer vers le foie fœtal où elles deviendront des CSH matures capables de se différencier en toutes les cellules hématopoïétiques matures et qui possèdent une capacité de reconstitution d'un hôte irradié. Une fois dans le foie fœtal, la population de CSH matures va rapidement prendre de l'expansion. Ceci constitue l'hématopoïèse définitive (Ciriza *et al.*, 2013; Mack *et al.*, 2021). L'hématopoïèse fœtale se poursuit ainsi majoritairement dans le foie fœtal, bien qu'il soit possible de détecter des CSH actives dans la rate fœtale au 15^e jour embryonnaire de la souris. Les CSH matures sont éventuellement recrutées vers la moelle osseuse par CXCL12 (*stromal-derived factor 1*), le ligand du récepteur CXCR4 exprimé à leur surface, et c'est au 17^e jour embryonnaire de la souris que l'hématopoïèse débute dans la moelle (Christensen *et al.*, 2004; Ciriza *et al.*, 2013), ou à la 12^e semaine post-conception chez l'humain (Charbord *et al.*, 1996).

Lors de l'hématopoïèse fœtale, les CSH du foie fœtal et de la moelle osseuse sont principalement actives et en état de prolifération afin de permettre une production sanguine qui convient aux besoins grandissant du fœtus. L'état actif des CSH est maintenu après la naissance pendant 3 à 4 semaines chez les souris avant de brusquement devenir quiescent (Bowie *et al.*, 2006). Chez l'humain, cette transition vers la quiescence se produit lors des deux premières années de vie (Rufer *et al.*, 1999).

1.1.2 Hématopoïèse adulte

Les CSH adultes se retrouvent dans la moelle osseuse et sont facilement distinguables des CSH fœtales par leur état de quiescence. Cet état de quiescence permet de prévenir la sénescence par l'épuisement, mais également de protéger les CSH de différents dommages. On parle ici de dommages causés par des espèces réactives de l'oxygène (ROS), mais également par de la radiation (Singh *et al.*, 2020). Les CSH quiescentes peuvent malgré tout accumuler des dommages à leur ADN, mais sont en mesure d'activer les mécanismes de réparation de l'ADN lors de leur entrée dans le cycle cellulaire (Beerman *et al.*, 2014).

Comme mentionné précédemment, la division des CSH se fait généralement de manière asymétrique. Cependant, différents facteurs externes peuvent influencer la présence ou l'absence de symétrie lors de la division des CSH, comme la présence d'infection ou des dommages à la niche hématopoïétique (Inra *et al.*, 2015; Oguro *et al.*, 2017), un facteur intrinsèque important à considérer est l'âge des CSH. Effectivement, de jeunes CSH favorisent une division asymétrique, alors que les CSH âgées se divisent principalement de manière symétrique, réduisant le nombre de MPP produits (Florian *et al.*, 2018). Cette perte de polarité au niveau de la division cellulaire chez les CSH âgées est également observable au niveau de la polarité phénotypique de la cellule. Cette perte de polarité est due à l'augmentation de l'activité de CDC42 (Florian *et al.*, 2018), discutée plus en détails à la section **1.5 La voie WNT/PCP dans les cellules hématopoïétiques**. Les CSH des souris âgées tendent également à avoir davantage de marqueurs de sénescence, particulièrement p16^{INK4a}, réduisant leur fréquence de division cellulaire (Pietras *et al.*, 2011). Plus encore, un biais myéloïde est observable lors du vieillissement (Nishi *et al.*, 2019).

1.2 Niche hématopoïétique

Le microenvironnement qui est requis pour une hématopoïèse fonctionnelle se situe principalement dans la moelle osseuse et se nomme niche hématopoïétique. Chez la souris, ce

microenvironnement se retrouve dans tous les os, alors qu'il se limite aux os axiaux et aux régions proximales des os longs chez l'humain adulte (Yu & Scadden, 2016).

Dans la niche hématopoïétique, il est possible de retrouver des facteurs de croissance et des interactions complexes entre les cellules qui régulent étroitement l'hématopoïèse, assurant un équilibre harmonieux entre la production, la maturation et la libération des cellules sanguines. La niche hématopoïétique de la moelle osseuse se divise en deux principales sections. À proximité de l'endostéum, on retrouve la niche endostéale et à proximité des vaisseaux sanguins dans les os, on retrouve la niche périvasculaire.

1.2.1 Niche endostéale

La niche endostéale hématopoïétique est un microenvironnement spécialisé situé à la surface de l'endostéum dans l'os trabéculaire (Askmyr *et al.*, 2009; Morrison & Scadden, 2014). Composée d'ostéoblastes, d'ostéoclastes et d'ostéocytes, la niche endostéale offre un support physique et fournit des signaux moléculaires nécessaires au maintien et à la régulation des CSH. La niche endostéale est particulièrement importante pour le maintien des CSH. La présence d'ostéoblastes est essentielle afin de maintenir les capacités d'auto-renouvellement et de quiescence des LT-CSH chez la souris (Bowers *et al.*, 2015). Plus encore, certaines études tendent à démontrer que la localisation des CSH dans la moelle osseuse pourrait être en partie influencée par l'endostéum. Effectivement, à la suite d'une transplantation de moelle osseuse, les CSH se retrouvent principalement à proximité de l'endostéum, comparativement à d'autres progéniteurs plus engagés. Les HSPC activés et davantage différenciés tendent à se rapprocher de la veine centrale (Mendelson & Frenette, 2014; Morrison & Scadden, 2014). Les ostéoblastes maintiennent les CSH à proximité dans un état de quiescence en sécrétant de la thrombopoïétine (TPO) (Emerson, 2007; Wang *et al.*, 2016). La TPO peut également favoriser l'activation des CSH afin de promouvoir leur auto-renouvellement et leur expansion en cas de stress, comme lors d'une transplantation (Fox *et al.*, 2002). Les ostéoblastes lient également les CSH en exprimant de l'angiopoïétine-1 (ANGP-1) qui se lie au récepteur tyrosine kinase TIE1 ou TIE2 des CSH. La liaison TIE2/ANGP-1 augmente la quiescence des CSH en plus de soutenir leur fonction de reconstitution de la moelle osseuse à la suite d'une irradiation (Arai *et al.*, 2004). Les ostéoblastes expriment également de l'ostéopontine qui permet de lier les CSH via leur β -intégrine. L'ostéopontine agit comme un régulateur négatif de la prolifération des CSH et permet ainsi de limiter leur expansion dans la moelle osseuse (Nilsson *et al.*, 2005; Stier *et al.*, 2005).

De plus, les ostéoblastes sécrètent divers facteurs de croissance et de signalisation qui sont essentiels à l'hématopoïèse normale, dont la protéine morphogénique osseuse 4 (BMP-4). En absence de BMP-4, le nombre de cellules LSK dans la moelle osseuse est grandement réduit et les CSH perdent leur capacité d'auto-renouvellement. La présence de BMP-4 dans la niche est également essentielle pour permettre aux CSH de reconstituer la moelle osseuse à la suite d'une irradiation (Goldman *et al.*, 2009). Ils peuvent également sécréter le facteur stimulant des colonies granulocytaires (G-CSF) afin de supporter des progéniteurs myéloïdes (Taichman & Emerson, 1994) et du CXCL12 qui est essentiel pour la maturation des lymphocytes B (Galan-Diez & Kousteni, 2017; Yu & Scadden, 2016).

1.2.2 Niche périvasculaire

La majorité des LT-CSH sont adjacentes à des sinusoides ou des artérioles (Morrison & Scadden, 2014), soulevant l'hypothèse que ceux-ci jouent un rôle dans le maintien des fonctions des CSH. On parle alors de la niche périvasculaire qui regroupe principalement les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et les cellules mésenchymateuses stromales (*Mesenchymal stem cells*) (MSC) qui se trouvent à leur surface.

Les MSC et les cellules endothéliales expriment SCF (Morrison & Scadden, 2014), qui est le ligand du récepteur c-KIT/CD117 exprimé à la surface des CSH, et qui est essentiel pour la survie, la prolifération et la différenciation des CSH (Ding *et al.*, 2012). Plus encore une interaction directe du SCF membranaire des MSC et des cellules endothéliales avec les CSH est nécessaire pour permettre leur maintien dans la niche. Les MSC qui expriment fortement SCF se retrouvent principalement sur les sinusoides, alors que les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins l'expriment à un plus faible niveau (Morrison & Scadden, 2014). Les MSC et les cellules endothéliales expriment également CXCL12. Comparativement au CXCL12 exprimé par les ostéoblastes qui impacte principalement la formation de lymphocytes B, celui retrouvé à la surface des MSC est essentiel pour le maintien de la réserve de CSH et pour leur localisation dans la moelle osseuse, tout comme celui exprimé par les cellules endothéliales, mais ce-dernier à un moindre niveau (Greenbaum *et al.*, 2013). Les cellules endothéliales ont également la particularité d'exprimer des protéines de type angiopoïétine (*angiopoietin-like proteins*) (ANGPTL). Contrairement aux ANGP, les ANGPTL ne lient pas TIE-1 ou TIE-2. Parmi ces différentes protéines, l'ANGPTL2 exprimé par les cellules endothéliales de la niche hématopoïétique est essentiel pour maintenir la quiescence des CSH (Yu *et al.*, 2022b).

1.2.3 Autres éléments importants pour le maintien des CSH

Outre les cellules associées à la formation osseuse et aux vaisseaux sanguins dans la moelle, plusieurs autres cellules et facteurs solubles sont importants pour le maintien de la niche hématopoïétique et influencent les fonctions des CSH.

Premièrement, les neurones sympathiques qui innervent la moelle osseuse influencent grandement la niche hématopoïétique et les HSPC. En relâchant de la noradrénaline, ils sont en mesure d'inhiber l'expression de CXCL12, dont l'importance a été discutée précédemment (Fielding & Mendez-Ferrer, 2020). Selon un cycle circadien, ces neurones relâchent également de la norépinéphrine le matin et le soir ce qui augmente le niveau de facteur de nécrose tumorale (TNF). Lors de la stimulation du matin, le TNF permet de favoriser la prolifération et la différenciation des HSPC, alors que la stimulation du soir favorise plutôt la quiescence des HSPC (Golan *et al.*, 2018).

Deuxièmement, les mégacaryocytes sont également en mesure de réguler la quiescence des CSH et jouent ainsi un rôle dans la niche hématopoïétique. Les mégacaryocytes sont situés à très grande proximité des CSH, parfois même en contact direct (Bruns *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014) étant donné qu'ils se situent eux aussi près des sinusoides. Grâce à leur sécrétion de CXCL4 (Bruns *et al.*, 2014) et de TGF- β 1 (Zhao *et al.*, 2014), les mégacaryocytes sont en mesure de limiter la prolifération cellulaire des CSH en les maintenant dans la phase G0. Les cellules de Schwann non-myélinisées sont également en mesure d'activer du TGF- β inactif, contribuant ici aussi à la quiescence des CSH (Yamazaki *et al.*, 2011). Cependant, en cas d'ablation hématopoïétique et de dommages à la niche endostéale, les mégacaryocytes ont la capacité d'augmenter leur sécrétion du facteur de croissance de fibroblaste 1 (*fibroblast growth factor*) (FGF) qui permet de régénérer l'endostéum et d'augmenter la prolifération des HSPC via NF κ B (Yoon *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2012). Le FGF-1 est alors sécrété en plus grande quantité que le TGF- β 1. Ceci indique une capacité de régulation dynamique des CSH par les mégacaryocytes (Zhao *et al.*, 2014). Plus encore, grâce au récepteur de la TPO nommé MPL, les mégacaryocytes et les plaquettes sont en mesure de contrôler la concentration de TPO dans la moelle osseuse. (de Graaf & Metcalf, 2011).

Les adipocytes sont également un élément important de la niche hématopoïétique. Effectivement, la quantité d'adipocytes dans la moelle osseuse augmente à la suite d'une irradiation afin de stimuler l'hématopoïèse en sécrétant du SCF, permettant ainsi la reconstitution de la moelle osseuse (Zhou *et al.*, 2017). L'adiponectine, également sécrétée par les adipocytes, promeut la prolifération des CSH (DiMascio *et al.*, 2007). Cependant, l'accumulation d'adipocytes dans la

moelle osseuse impacte plutôt négativement l'hématopoïèse. Cette accumulation d'adipocytes peut se produire lors du vieillissement ou de l'obésité, mais est également naturellement présente dans la queue des vertébrés (Hu *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2017). La différenciation des MSC en adipocytes dans la moelle osseuse est régulée positivement par l'expression de *Pax3* et négativement par l'expression de *Bmi-1* (Hu *et al.*, 2019).

Parmi les facteurs solubles de la niche hématopoïétique, on retrouve également les protéines WNT. Les protéines WNT peuvent être extrinsèques aux cellules hématopoïétiques ou intrinsèques, comme c'est le cas pour la sécrétion autocrine de WNT4 par les HSPC afin de promouvoir leur auto-renouvellement chez la souris (Hetu-Arbour *et al.*, 2021). L'importance des protéines WNT dans l'hématopoïèse est davantage détaillée dans la section **1.5 La voie WNT/PCP dans les cellules hématopoïétiques**.

1.2.4 Hématopoïèse extra-médullaire, thymopoïèse et hématopoïèse d'urgence

Bien que la niche hématopoïétique se retrouve principalement dans la moelle osseuse, ce n'est pas le seul organe hématopoïétique. Lorsque l'hématopoïèse a lieu à l'extérieur de la moelle osseuse, on parle alors d'hématopoïèse extra-médullaire. L'hématopoïèse extra-médullaire se situe généralement dans le thymus et la rate.

Le thymus permet la maturation des thymocytes en lymphocytes T et est essentiel afin de terminer leur lymphopoïèse. Tout d'abord, les cellules endothéliales, épithéliales et stromales mésenchymateuses du thymus expriment SCF qui est essentiel à la progression des thymocytes dans le thymus et à leur maturation (Buono *et al.*, 2016). Les cellules épithéliales et les fibroblastes provenant des cellules stromales mésenchymateuses du thymus expriment également du CCL19 et du CCL21, qui permettent de réguler la position et la migration des thymocytes dans le thymus lors de leur maturation via le récepteur CCR7 des thymocytes (Gray *et al.*, 2007; Witt & Robey, 2004). En cas de dommages causés par de la chimiothérapie, les fibroblastes issues des MSC du thymus sécrètent les facteurs de croissance IL-6 et FGF-7, afin de promouvoir la prolifération des cellules épithéliales thymiques et la régénération du thymus (Gray *et al.*, 2007). Plus encore, les cellules endothéliales du thymus sont en mesure de sécréter du BMP-4 à la suite de dommages au thymus causés par la radiation. Le BMP-4 sécrété permet la régénération des cellules épithéliales du thymus et est donc essentiel au rétablissement de cet organe (Wertheimer *et al.*, 2018).

Dans la rate, l'hématopoïèse se produit dans la pulpe rouge, où se retrouvent des sinusoides dont les cellules endothéliales expriment SCF. Il est également possible d'y retrouver des cellules

stromales exprimant CXCL12 (Inra *et al.*, 2015). À l'état homéostatique, l'hématopoïèse de la rate suit principalement une différenciation myéloïde et permet une production unique de cellules dendritiques qui ressemblent à celles obtenues dans des cultures de longue durée (O'Neill *et al.*, 2011). Cette production particulière de cellules dendritiques et une tendance accrue pour la différenciation myéloïde indiquent que le microenvironnement hématopoïétique de la rate pourrait différer de celui retrouvé dans la moelle osseuse (Kim, 2010; O'Neill *et al.*, 2011). Plus encore, les CSH résidant dans la rate sont majoritairement à la phase G1 du cycle cellulaire, leur conférant ainsi la particularité d'être « pré-activées ». Bien que la transition G1/S est inhibée à l'état homéostatique et régulée par le gène de translocation myéloïde 16 (MTG16), le fait d'être majoritairement à l'état G1 leur permet tout de même de faciliter l'enclenchement d'une réponse d'urgence en cas de stress (Coppin *et al.*, 2018). Ceci fait de la rate le site principal de l'hématopoïèse extra-médullaire d'urgence (Crane *et al.*, 2017; Kim, 2010; O'Neill *et al.*, 2011).

L'hématopoïèse extra-médullaire prend donc de l'ampleur lors de certains stress, par exemple lors la destruction partielle de la moelle osseuse, en cas d'infection ou simplement lors d'insuffisance hématopoïétique, comme lors d'une grossesse (Inra *et al.*, 2015; Oguro *et al.*, 2017). La radiation est une cause connue de la destruction de la moelle osseuse (Neelis *et al.*, 1998; Till & McCulloch, 1961). À la suite d'une irradiation, les CSH se situent davantage à proximité de l'endostéum (Morrison & Scadden, 2014; Pinho & Frenette, 2019) et des artérioles (Crane *et al.*, 2017), probablement dû à la destruction des sinusoides.

Le système hématopoïétique est le plus sensible à l'irradiation et chez les rongeurs, les premiers signes du syndrome hématopoïétique de radiation aiguë peuvent apparaître dès des doses de 3 Gy (Shao *et al.*, 2014). Les symptômes sont cependant transitoires à cette faible dose et sont principalement dus à la mort cellulaire des cellules endommagées. Ceci provoque principalement une myélo-suppression temporaire et une augmentation de la prolifération et de la différenciation des HSPC (Mauch *et al.*, 1995). Les doses supérieures à 3,5 Gy peuvent provoquer une myélo-suppression persistante et une insuffisance hématopoïétique (Henry & Arcangeli, 2021; Kaplan *et al.*, 2011; Mauch *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2006b). Effectivement, contrairement aux faibles doses, de hautes doses peuvent engendrer des dommages à l'ADN, dont des cassures doubles brins qui sont davantage à risques de réparations non-fonctionnelles, pouvant engendrer la mort cellulaire, mais aussi la sénescence, une différenciation altérée ou des transformations tumorales (Henry & Arcangeli, 2021). Il a été observé que l'irradiation totale à des doses modérées ou élevées provoque effectivement des séquelles persistantes chez les CSH, particulièrement une réduction de leur réserve dans la moelle osseuse et un déficit dans leur auto-renouvellement. Une des

causes de ces altérations persistantes est la présence accrue de ROS maintenue plusieurs semaines après l'irradiation (Henry & Arcangeli, 2021). L'irradiation peut également provoquer des dommages permanents à la niche hématopoïétique, ce qui influencera la différenciation des HSPC par la suite (Dominici *et al.*, 2009).

De plus, la thrombocytopénie à la suite de l'irradiation peut se révéler mortelle. Effectivement, la radiation peut également provoquer de l'inflammation généralisée et il a été démontré que l'absence de plaquettes en cas d'inflammation mène à une hémorragie (Goerge *et al.*, 2008). L'exposition à des rayons X est d'ailleurs associée à des hémorragies généralisées (Jackson *et al.*, 1952). De plus, il a été proposé que la thrombocytopénie suivant l'irradiation est un excellent facteur prédictif de la survie du sujet exposé, bien que la neutropénie soit le facteur généralement considéré comme déterminant de la survie (DiCarlo *et al.*, 2011; Stickney *et al.*, 2007). Ainsi, la reprise de la thrombopoïèse et de la mégacaryopoïèse est essentielle à la survie lors de dommages sévères à la moelle osseuse causés par la radiation.

1.3 Mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est le processus de maturation des mégacaryocytes jusqu'à la production de plaquettes. Comme l'ensemble des cellules hématopoïétiques, les mégacaryocytes proviennent de la différenciation et de la maturation d'une CSH. Ils ont cependant la particularité d'accumuler de l'ADN dans leur noyau via une forme avortée de la mitose nommée endomitose. Lors de ce phénomène, la cellule débute la mitose et réplique ses chromosomes à la phase S. La cellule continue ensuite le processus de la mitose jusqu'à l'anaphase, où les chromatides sœurs seront séparés, mais ne migreront pas à des pôles séparés de la cellule qui n'entamera jamais la télophase ni la cytotélerèse (Nagata *et al.*, 1997). Ainsi, cette cellule ne se divisera jamais en deux cellules filles, résultant plutôt en une cellule diploïde. L'arrêt prématuré de la division cellulaire serait dû à une anomalie de la signalisation de RHO/ROCK qui empêcherait la réalisation du processus de cytotélerèse (Lordier *et al.*, 2008). Plus encore, le mécanisme qui provoque l'avortement de la cytotélerèse diffère selon la ploïdie des mégacaryocytes. Lors des premières répétitions du cycle cellulaire, le facteur d'échange de nucléotides de guanine (*guanine nucleotide exchange factor*) (GEF) GEF-H1 est inhibé, empêchant l'activation de RHOA. Lorsque la ploïdie des mégacaryocytes est supérieure à 4N, le GEF inhibé est plutôt l'*epithelial cell transforming 2* (ECT2), inhibant encore une fois l'activation de RHOA (Gao *et al.*, 2012). L'endomitose sera répétée à de nombreuses reprises, formant ainsi des mégacaryocytes allant jusqu'à 128N et dès 8N ils sont susceptibles de participer à la production de plaquettes. Lors de leur maturation dans

la moelle osseuse, les mégacaryocytes grossissent à chaque répétition d'endomitose et expandent leur cytoplasme qui formera des invaginations dans la cellule. Lorsque les mégacaryocytes entrent en contact avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, de longues extensions cytoplasmiques provenant de ces invaginations se formeront. Ces extensions, en forme de gros filament, sont appelées pro-plaquettes et sont en mesure de pénétrer dans les sinusoides vasculaires où elles vont se fragmenter sous l'effet du flux sanguin en plaquettes (Machlus & Italiano, 2013).

La formation des pro-plaquettes est un phénomène finement régulé. Une stimulation par de la TPO permet d'activer la signalisation RHOA/CDC42 qui favorisera la relocalisation du complexe formé de *megakaryoblastic leukemia 1* (MKL1) et de *serum response factor* (SRF) vers le noyau. MKL1/SRF permet alors l'expression de gènes relatifs à la formation des pro-plaquettes (Gilles *et al.*, 2009; Heib *et al.*, 2021; Smith *et al.*, 2013). D'autres facteurs de transcription sont également essentiels à la formation des pro-plaquettes. Le facteur de transcription érythroïde GATA-1 permet d'induire l'expression de la sous-unité p45 du facteur nucléaire érythroïde 2 (*nuclear factor-erythroid 2*) (NF-E2) (Italiano & Hartwig, 2013; Lecine *et al.*, 1998). NF-E2 permet à son tour la transcription de *Tubb1* qui code pour la β 1-Tubuline, qui se situe dans les pro-plaquettes lors de la phase terminale de la mégacaryopoïèse et est nécessaire à leur formation (Lecine *et al.*, 2000).

Une étude a également démontré que la formation des pro-plaquettes est régulée par les ligands WNT. Effectivement, WNT3a stimule la maturation des mégacaryocytes et amplifie la formation des pro-plaquettes, alors que WNT5a inhibe la formation des pro-plaquettes en plus de réduire l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la maturation des mégacaryocytes (Macaulay *et al.*, 2013). Vue l'importance de la signalisation de WNT dans l'hématopoïèse, les prochaines sections se concentreront sur les différentes voies de signalisation qui impliquent cette famille de protéines.

1.4 Les voies de signalisation WNT

Les protéines WNT sont des ligands extracellulaires morphogènes et proviennent d'un proto-oncogène. Le nom « Wnt » provient d'une combinaison de deux noms qui avaient été donnés pour le même gène. Certains scientifiques avaient initialement découvert qu'en absence d'un gène et des protéines qu'il transcrit, les drosophiles sont dépourvues d'ailes. Ce gène a donc été nommé *Wingless* (*Wg*). Quelques années plus tard, un autre groupe de chercheurs ont « découvert » un nouveau proto-oncogène qu'ils ont nommés *Integration-1* (*Int-1*). Lorsque la communauté scientifique a réalisé que *Integration-1* et *Wingless* représentent le même gène, ils

ont combiné les noms ensemble pour produire *Wingless-Integration*, *Wg-Int*. Le gène a donc été renommé *Wnt-1*, tout comme les protéines qu'il transcrit (Kypta, 2011).

Il existe plusieurs voies de signalisation WNT. La plus connue est la voie de signalisation canonique nommée WNT/ β -caténine, qui, comme son nom l'indique, implique la stabilisation de la β -caténine. Elle implique principalement les ligands WNT2, WNT3, WNT3a, WNT4 et WNT8a. Les voies de signalisation non-canoniques de WNT sont principalement décrites comme étant β -caténine-indépendantes et impliquent les ligands WNT4, WNT5a, WNT5b, WNT6, WNT7a, et WNT11 (Chae & Bothwell, 2018). Ces voies ne mènent généralement pas à la stabilisation de la β -caténine, bien qu'il existe des exceptions qui seront discutées plus loin. Ainsi, leur activation mène plutôt à l'inhibition de la voie canonique. Les voies non-canoniques regroupent deux sous-catégories : la voie WNT calcium-dépendante (WNT/ Ca^{2+}) et la voie de la polarité cellulaire planaire (PCP).

1.4.1 La signalisation canonique WNT/ β -caténine

La β -caténine murine est une protéine codée par le gène *Ctnnb1* et est impliquée dans la voie de signalisation canonique de WNT. La voie WNT/ β -caténine permet l'accumulation de la β -caténine dans la cellule avant son entrée dans le noyau (Figure 1.3). En absence de WNT, la β -caténine est phosphorylée et ubiquitinée par un complexe de destruction puis dégradée par le protéasome. Le complexe de destruction est composé de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), de la polyose adénomateuse du coli (APC), de la caséine kinase 1 α (CK1 α) et d'axine. Le complexe de destruction se lie à la β -caténine, puis GSK3 et CK1 α phosphorylent la β -caténine. Cette phosphorylation favorise son interaction avec la *β -transducin-repeat-containing protein* (β -TrCP) qui ubiquitine la β -caténine. Cependant, lorsque WNT se lie aux co-récepteurs Frizzled (FZD) et LRP5/6 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein*) qui se situent à la membrane plasmique, LRP5/6 sera phosphorylé. Cette phosphorylation attire Dishevelled (DVL) qui se liera à FZD. DVL recrute l'axine du complexe de destruction, le relocalisant ainsi à la membrane, empêchant ainsi le complexe de destruction d'ubiquitiner la β -caténine (Liu *et al.*, 2022; Moon, 2005). Plus encore, la protéine p300 est également en mesure d'acétyle LRP5/6 afin d'amplifier sa signalisation et favoriser le recrutement de DVL et axine. La β -caténine qui s'accumule dans le cytoplasme sera par la suite acétylée par une protéine liant les CREB (*CREB-binding protein*) (CBP), p300 et le facteur d'association CBP/p300 (PCAF) ce qui induira sa translocation au noyau (You *et al.*, 2022). Une fois dans le noyau, la β -caténine délogera les histones déacétylases (HDAC) qui sont liées au complexe de transcription formé du facteur de cellule T (*T cell factor*) (TCF) ou au facteur d'amplification lymphoïde (*Lymphoid enhancer factor*) (LEF). Les protéines HDAC inhibent

l'acétylation des histones 3/4 et agissent comme des répresseurs de la transcription (Ng & Littman, 2016). La liaison subséquente de la β -caténine à TCF/LEF permet de recruter CBP et p300 qui acétyleront les histones 3/4 permettant ainsi au TCF/LEF de transcrire les gènes cibles de la β -caténine (Hecht *et al.*, 2000).

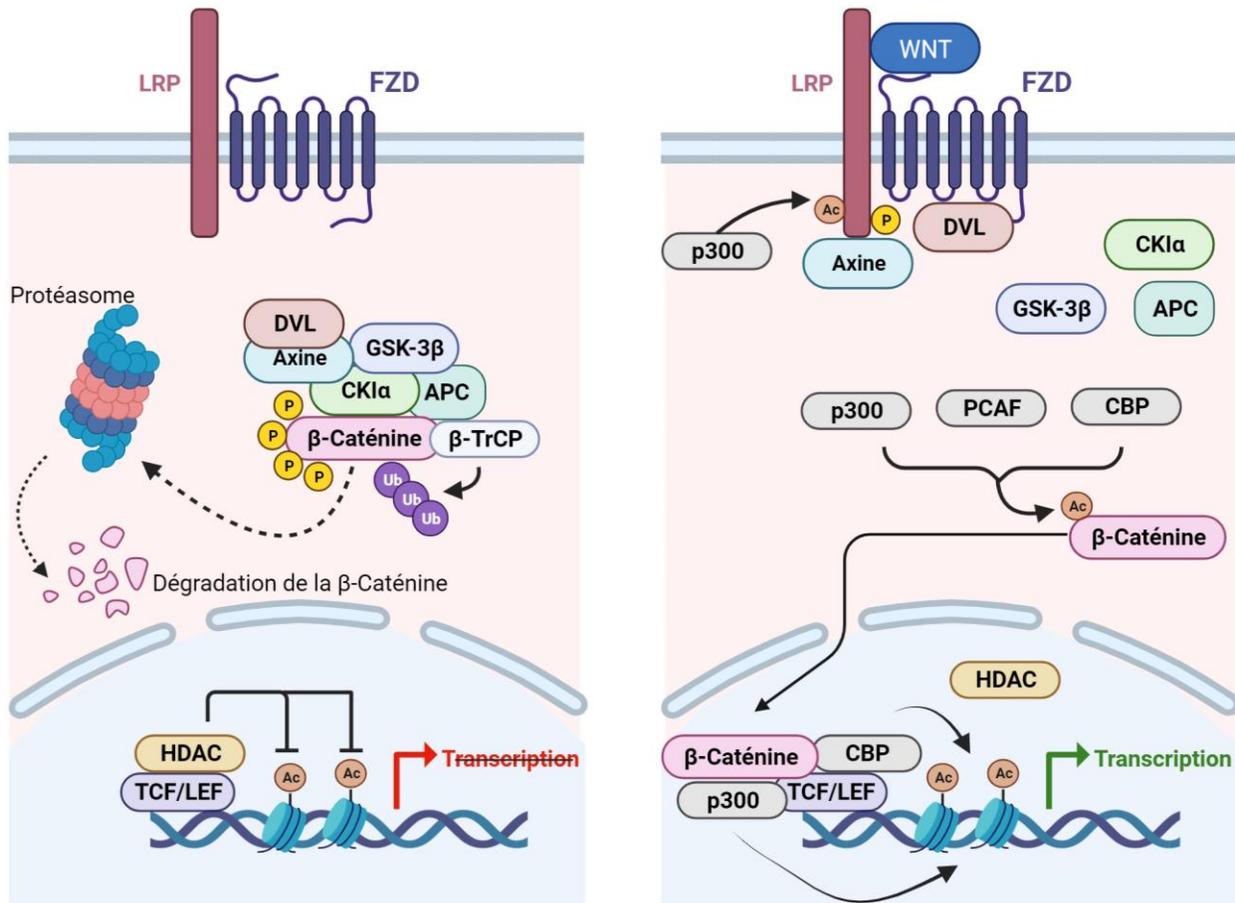


Figure 1.3 Représentation de la signalisation WNT/ β -caténine

La partie de gauche de la figure schématise la destruction de la β -caténine en absence des ligands WNT. La β -caténine est phosphorylée et ubiquitinée par le complexe de dégradation et sers ensuite lysée par le protéasome. La partie de droite schématise l'accumulation de la β -caténine lorsque les ligands WNT se lient aux corécepteurs LRP et FZD. Le complexe de dégradation est inhibé et, une fois stabilisée par l'acétylation, la β -caténine est transloquée au noyau. Figure créée à l'aide de BioRender.com Premium.

1.4.2 La signalisation WNT/ Ca^{2+}

La voie de signalisation WNT/ Ca^{2+} est une voie de signalisation non-canonique qui active des voies de signalisation intracellulaires impliquant le calcium. Lorsque le ligand WNT se lie à son récepteur de surface, FZD, une cascade de signalisation est enclenchée et une phospholipase C

(PLC) membranaire est activée. La PLC catalyse la dégradation du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol trisphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). L'IP3 libéré se lie ensuite à des récepteurs situés sur le réticulum endoplasmique, ce qui provoque une libération de Ca^{2+} qui y est stocké. Cette augmentation de Ca^{2+} entraîne l'activation de la kinase calmoduline-dépendante II (CaMKII) et la calcineurine. La CaMKII phosphoryle et active différents facteurs de transcription, dont NF κ B et peut réguler des processus cellulaires tels que la différenciation et la survie cellulaire. La calcineurine, quant à elle, active le facteur de transcription NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), qui intervient dans la régulation de l'expression génique. L'augmentation de Ca^{2+} facilite également la liaison de DAG à la protéine kinase C (PKC), permettant ainsi son activation. La PKC est à son tour en mesure d'activer les facteurs de transcription NF κ B et CREB (*cAMP response element-binding protein*) (De, 2011; Rogan *et al.*, 2019). La PKC est également en mesure d'activer la CDC42, une protéine de la division cellulaire, qui est également impliquée dans la voie WNT de la polarité cellulaire planaire (WNT/PCP) (Berwick & Harvey, 2013; Wen *et al.*, 2020).

1.4.3 La signalisation WNT/PCP

La position des cellules épithéliales est hautement régulée vue leur cytosquelette asymétrique. Plusieurs processus sont essentiels afin de conserver une polarisation organisée de ces cellules afin qu'elles maintiennent la forme tissulaire requise et leurs fonctions. Il existe deux types de polarisation des cellules : la polarisation selon l'axe apico-basal et perpendiculaire et la polarisation planaire cellulaire (PCP) (Devenport, 2014). Dans la voie WNT/PCP, les ligands WNT les plus communs sont WNT5a et WNT11.

La PCP a d'abord été découverte chez la drosophile grâce à des mutations sur Frizzled (Fzd), un récepteur membranaire, et Dishevelled (Dvl), un médiateur intracellulaire de Fzd, qui perturbèrent l'orientation des poils et des veines sur leurs ailes (Gubb & Garcia-Bellido, 1982; Wong & Adler, 1993). DVL est un médiateur intracellulaire hautement exprimé dans les cellules hématopoïétiques (Choi *et al.*, 2019), suggérant une forte activité des voies WNT étant donné que DVL est impliqué dans les voies canonique et non-canoniques. Sa localisation à la membrane est essentielle pour l'activation de la voie PCP à la suite de la liaison d'un ligand WNT à un récepteur FZD chez les vertébrés (Peradziryi *et al.*, 2011).

Bien que la PCP a été découverte chez la drosophile, les ligands Wnt ne semblent cependant pas être essentiels chez la drosophile, alors qu'ils le sont pour les vertébrés (Ewen-Campen *et al.*, 2020; Roszko *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2020). De plus récentes études chez les vertébrés ont montré

que des mutations dans FZD et d'autres composants primordiaux de la PCP induisent des défauts au niveau du tube neural et des anomalies au niveau de la position des poils. Un fait intéressant est que la perte d'un élément de la voie PCP induite par un *knock out* (KO) ou un *knock down* mène souvent au même phénotype que si cet élément était surexprimé (Feng *et al.*, 2021; Hayes *et al.*, 2013). Ainsi, toutes les composantes de la voie PCP sont finement régulées et celle-ci implique plusieurs récepteurs membranaires et protéines intracellulaires discutés ci-dessous et représentés à la figure 1.4.

FZD est un récepteur couplé aux protéines G atypique. Une fois activé dans la voie WNT/PCP, FZD se lie à DVL sur ses domaines PDZ (*Post synaptic density protein*, *Drosophila disc large tumor suppressor* et *Zonula occludens-1 protein*) et DEP (*Dishevelled*, *Egl-10* et *Pleckstrin*) (Rothbacher *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2003). L'activation de DVL mène à une cascade de signalisation qui se termine avec l'activation d'une Jun N-terminale kinase (JNK) ou de la voie de signalisation RHO/ROCK, indépendante de JNK, mais toutes deux impliquées dans le remodelage du cytosquelette. (Heinonen *et al.*, 2011; LaMonica *et al.*, 2009; Yamanaka *et al.*, 2002).

La protéine tyrosine kinase 7 (PTK7), un récepteur transmembranaire avec sept domaines extracellulaires de type immunoglobuline, est en mesure de former un complexe avec FZD et DVL grâce à l'interaction de son domaine kinase conservé et le domaine PDZ de DVL (Peradziryi *et al.*, 2011; Shnitsar & Borchers, 2008). PTK7 est également en mesure de recruter DVL à la membrane. Pour se faire, le domaine kinase de PTK7 doit préalablement lier RAC1 qui recrute à son tour PKC δ 1. Le complexe PTK7-RAC1-PKC δ 1 est alors en mesure de recruter DVL à la membrane, bien que le processus exact demeure encore à élucider. Le recrutement de DVL à la membrane via RAC1 n'est pas essentiel à la signalisation du complexe PTK7-FZD7-DVL, mais pourrait être redondant à un autre mécanisme de recrutement (Wehner *et al.*, 2011). PTK7 n'est donc pas essentiel pour la localisation de DVL à la membrane (Lee *et al.*, 2012). La cascade de signalisation intracellulaire de PTK7 n'est pas encore entièrement connue. Cependant, les ligands WNT ne sont pas essentiels pour le recrutement de DVL à PTK7. Plutôt, il a été émis comme hypothèse que PTK7 se lierait aux ligands WNT canoniques afin de faire compétition à la voie WNT/ β -caténine et ainsi favoriser la liaison des ligands WNT non-canoniques aux récepteurs de la voie WNT/PCP (Peradziryi *et al.*, 2012). Ainsi, PTK7 est un élément primordial de la PCP chez les vertébrés, mais pas chez la drosophile. Il a été démontré qu'un défaut de PTK7 chez les vertébrés mène à la perte de la PCP, résultant en des anomalies de l'embryon, dont des défauts

du tube neural, et restreint l'inhibition de la β -caténine (Hayes *et al.*, 2013; Peradziryi *et al.*, 2011). PTK7 est hautement exprimé dans les HSPC et dans les mégacaryocytes (Choi *et al.*, 2019).

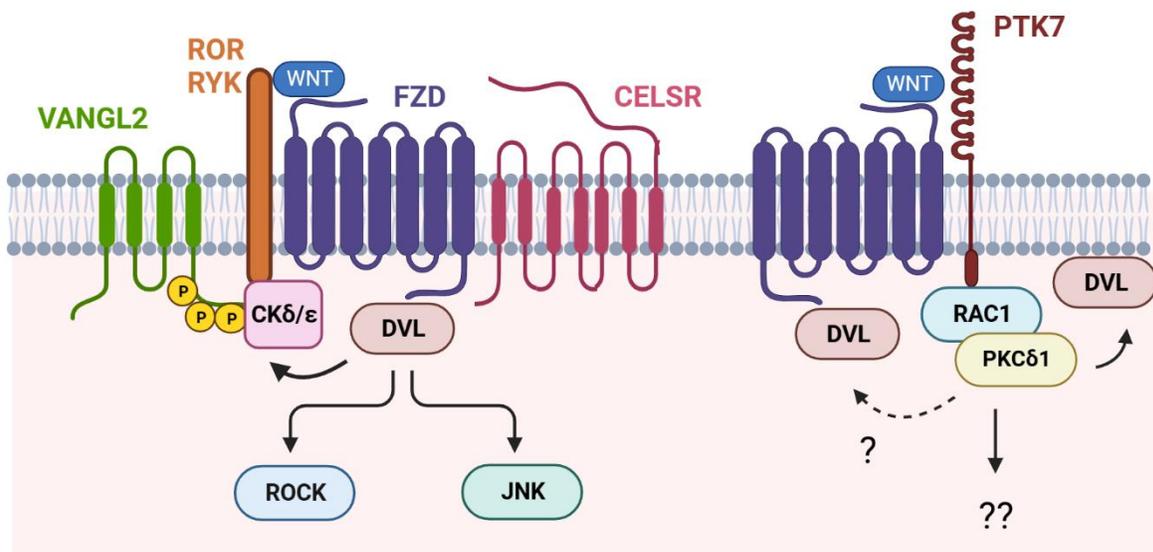
La protéine membranaire Vang Gogh (Vang) (également nommée Strabismus Stbm) a également été identifiée chez la drosophile. Les mutations de *Vang* se résultent en une désorganisation de l'ommatidie¹ et des poils sur leurs ailes (Kelly *et al.*, 2016). Chez les vertébrés, il existe deux orthologues à *Vang*. Chez les souris, des mutations de *Vang-like* (*Vangl*) 2 ou son KO conditionnel causent une queue en tire-bouchon caractéristique surnommée *loop tail* (Guyot *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2012), une désorganisation de la fourrure, qui contiendra souvent des motifs de spirales (Cetera *et al.*, 2017), et une désorganisation des cellules ciliées cochléaires et vestibulaires (Montcouquiol *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2012). *Vangl2* KO est létal pour l'embryon dû à la fermeture incomplète du tube neural (Zhang *et al.*, 2022). Dans les cas de *Vangl1* KO ou de mutations, l'embryon demeure viable, mais aura un phénotype semblable à celui observé chez des *Vangl2* mutants, mais à un moindre degré. Il est, entre autres, possible d'observer des défauts du tube neural chez l'humain (Kibar *et al.*, 2007) et une altération de l'organisation des cellules ciliées cochléaires chez la souris (Torban *et al.*, 2008). Pour être exporté à la membrane plasmique, VANGL2 doit être phosphorylé par CK1 δ/ϵ . Sans cette phosphorylation au réticulum endoplasmique, VANGL2 tend à être dégradé par le complexe ERAD (Feng *et al.*, 2021). La phosphorylation de Vang/VANGL est par ailleurs essentielle pour leurs fonctions (Kelly *et al.*, 2016). Bien qu'il n'y ait aucun ligand extracellulaire connu capable de se lier directement à VANGL1/2, les protéines VANGL sont en mesure de former des complexes avec FZD (Montcouquiol *et al.*, 2003; Yang & Mlodzik, 2015), ROR2 (Feng *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2011) et RYK (Andre *et al.*, 2012) à la membrane. Ces complexes sont en mesure de recruter CK1 δ/ϵ qui sera en mesure de phosphoryler davantage VANGL1/2, établissant un gradient de manière antérieur-postérieur (Gao *et al.*, 2011; Koushyar *et al.*, 2022). DVL, recruté à la membrane, permet également d'amplifier l'interaction entre VANGL2 et CK1 δ/ϵ (Yang *et al.*, 2017). Cependant, VANGL1 et 2 sont dépourvus de site enzymatique et catalytique et ne sont présentement pas reconnus comme des récepteurs de ligand extracellulaire (Brunt *et al.*, 2021). Leur mécanisme d'action exact est encore inconnu.

Le récepteur relié à la famille des tyrosines kinase (RYK) est également un élément très important de la voie WNT/PCP vu son interaction avec WNT11 (Macheda *et al.*, 2012). Les particularités de ce récepteur sont son domaine kinase inactif et son domaine à facteur d'inhibition WNT (WIF) de

¹ Les ommatidies sont les unités visuelles qui composent les yeux des insectes. Elles leur permettent de voir dans de multiples directions à la fois.

liaison qui est requis pour son interaction avec les ligands WNT (Macheda *et al.*, 2012). *In vitro*, le domaine PDZ de RYK interagit avec VANGL2, comme démontré par co-immunoprécipitation, et activera RHOA, une protéine de signalisation en aval de VANGL2 (Macheda *et al.*, 2012). RYK est fortement exprimé dans les mégacaryocytes, les mastocytes et les macrophages (Choi *et al.*, 2019).

Un autre récepteur de la voie WNT/PCP qui est fortement exprimé dans les cellules hématopoïétiques est CELSR (Cadherin EGF LAG seven pass G type receptor), l'orthologue de flamingo (*fmi*) découvert chez la drosophile. L'absence de *fmi* provoque une désorganisation de l'ommatidie des yeux des mouches (Das *et al.*, 2002). Chez les vertébrés, il existe trois orthologues à ce récepteur, tous exprimés à différents niveaux dans les cellules hématopoïétiques. Par exemple, chez les souris, CELSR1 est fortement exprimé dans les HSPC, dans les cellules T, dans les basophiles et dans les cellules dendritiques. CELSR2, quant à lui, est fortement exprimé dans les mégacaryocytes, mais également dans les HSPC et dans les cellules T. CELSR3 est principalement exprimé dans les GMP et dans les cellules matures myéloïdes et des granulocytes (Choi *et al.*, 2019). CELSR1 est capable d'interagir avec VANGL2 et FZD6 afin de former un complexe aux jonctions antéro-postérieures des cellules, VANGL2 étant sur le côté postérieur et FZD6 au côté antérieur de ce complexe (Stahley *et al.*, 2021). Lors de la formation de ce dernier, pour lequel CELSR1 est essentiel (Stahley *et al.*, 2021), VANGL2 se liera à FZD6 par sa région extracellulaire riche en cystéine (Wu & Mlodzik, 2008).



Réorganisation du cytosquelette

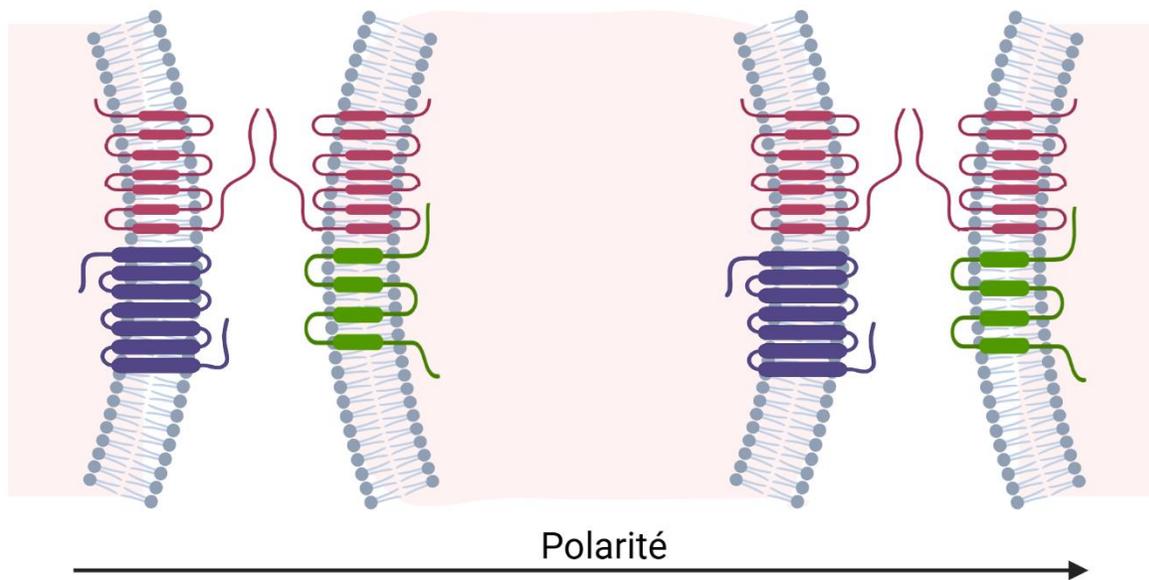


Figure 1.4 Représentation des protéines de la voie WNT/PCP dans les cellules épithéliales

La partie supérieure de la figure représente l'interaction des protéines de la PCP avant son activation. Lors de la liaison d'un ligand WNT approprié, la voie WNT/PCP est entamée menant à la réorganisation du cytosquelette et à la polarisation des cellules épithéliales. La polarisation est observable dans la partie inférieure de la figure. Figure créée à l'aide de BioRender.com Premium.

1.5 La voie WNT/PCP dans les cellules hématopoïétiques

Comme mentionné précédemment, l'activation de la voie WNT/PCP par un récepteur FZD mène généralement à l'activation de la voie JNK ou de la voie RHO/ROCK (Heinonen *et al.*, 2011; LaMonica *et al.*, 2009; Yamanaka *et al.*, 2002). Très peu est connu sur la voie ROCK dans les cellules hématopoïétiques et une revue complète a été publiée sur le sujet (Mali *et al.*, 2014).

JNK possède trois isoformes (Davis, 2000) et est capable de phosphoryler et de réguler l'activité de plusieurs facteurs de transcription comme c-Jun, ATF2 et ELK-1 (Gupta *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1995) et des facteurs non-transcriptionnels, comme ceux de la famille BCL2 (Liu & Lin, 2005), qui peuvent être pro et anti-apoptotiques (Liu & Lin, 2005; Pinal *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2004). JNK est localisé dans le centrosome et est activé lors de la transition de phases G1/S (MacCorkle-Chosnek *et al.*, 2001). C'est également un point de contrôle clé pour la transition G2/M (Cosolo *et al.*, 2019; Gutierrez *et al.*, 2010).

L'activation de JNK peut se faire par des MAPK (Davis, 2000) ou par des GTPases, comme celles de la famille Rho : RHO, RAC et CDC42 qui permettent l'organisation et la polarisation des cytosquelettes eucaryotes et qui ont été identifiées comme agissant dans la cascade de signalisation suivant FZD (Schlessinger *et al.*, 2009). Il est également établi que la capacité de JNK à réorganiser le cytosquelette est requise pour la polarisation des cellules neurales, ce qui est essentielle à leur survie (Barnat *et al.*, 2010; Somorjai *et al.*, 2021).

En ce qui concerne les cellules hématopoïétiques, la signalisation JNK y est souvent activée (Yu *et al.*, 2004). La signalisation JNK est souvent considérée comme une réponse à la suite d'un stress (Cosolo *et al.*, 2019; Gutierrez *et al.*, 2010; Kiefer *et al.*, 1996) et est capable d'allonger la phase G2 en cas de dommages à l'ADN en réduisant l'activité CDC25 (Cosolo *et al.*, 2019; Gutierrez *et al.*, 2010), qui activerait normalement CDK1 (Liu *et al.*, 2018). *Cdc25* est une cible de la β -caténine, dont l'inhibition mène à la réduction de l'expression de CDC25 (Martinez-Font *et al.*, 2020). Une expression anormale de CDC25 dans les cellules hématopoïétiques est souvent reliées à des tumeurs malignes myéloïdes (Brenner *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018), consistant avec le fait que la suractivation de la voie WNT/ β -caténine peut mener à des cancers (Yu *et al.*, 2022a).

Bien que WNT4 est parfois impliqué dans la voie canonique, il est également en mesure de lier FZD6, connu pour être principalement un récepteur de la voie non-canonique, et peut activer JNK2 dans les HSPC. La perte de JNK2 chez les souris diminue la survie des LSK dans la moelle osseuse en augmentant l'apoptose (Heinonen *et al.*, 2011). FZD6 est également capable de réguler le regroupement de CDC42 et ainsi la signalisation CDC42/JNK afin de promouvoir le

renouvellement des CSH et leur multiplication post-stress (Abidin *et al.*, 2015). *In vitro*, l'inhibition de JNK promeut l'expansion des CSH et amplifie leurs capacités d'être greffées (Xiao *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2022). En fait, l'inhibition de la voie JNK empêche les CSH d'entrer dans la phase G1 du cycle cellulaire et promeut ainsi la quiescence et l'auto-renouvellement (Xie *et al.*, 2022). Il est intéressant de noter que FZD6 peut simultanément inhiber et stimuler la voie JNK. Son rôle dans les HSPC est donc contexte-dépendant. Davantage de recherches sont nécessaires afin d'identifier quel est le facteur déterminant.

Dans les CSH humaines et murines, l'activité de CDC42 régule le vieillissement des cellules souches dans la moelle osseuse et augmente avec l'âge (Amoah *et al.*, 2022; Florian *et al.*, 2012). Une augmentation de CDC42 mène à une dérégulation du phénotype sanguin : apparition d'anémie, augmentation d'apoptose JNK dans les HSPC et diminution des capacités d'être greffées (Wang *et al.*, 2006a). Les jeunes souris ayant eu une augmentation de l'activité de CDC42 dans tous leurs tissus ont davantage de LT-CSH dans leur moelle et produisent significativement davantage de cellules myéloïdes, comme ce qui pourrait être observé chez des souris âgées (Cho *et al.*, 2008; Florian *et al.*, 2012). L'augmentation de l'activité de CDC42 mène également à une dépolarisation des CSH, ce qui est normalement associé à l'âge. L'inhibition de CDC42 dans des CSH âgées permet de retirer le biais myéloïde, redonne un phénotype polarisé aux cellules et augmente leur niveau d'acétylation AcH4K16, comme ce qui est observable chez de jeunes CSH (Florian *et al.*, 2012). Des résultats similaires ont été obtenus avec des CSH humaines (Amoah *et al.*, 2022). De façon intéressante, une étude a démontré que la suppression de *Cdc42* dans les CSH mène à une perte de quiescence dans la moelle osseuse *in vivo*. Le nombre de LT-CSH diminue alors que le nombre de CT-CSH augmente. De plus, il y a alors significativement davantage de LSK dans la phase S due à la répression de *Cdkn1a*, qui code pour p21^{cip1}, et à l'augmentation de *c-Myc*. Ce dérèglement du cycle cellulaire était également accompagné d'une réduction de la capacité de greffon des CSH (Yang *et al.*, 2007).

Dans la voie WNT/PCP, la suractivation de WNT5a chez les souris entraîne les CSH de la moelle osseuse à produire davantage de LMPP que des souris contrôles. Alors que l'absence de WNT5a mène à l'inhibition du facteur pro-apoptotique BAX et augmente l'expression de BCL-2 (Liang *et al.*, 2007), la surexpression de WNT5 *in vitro* dans les thymocytes doubles positifs inhibe l'activité de BCL-2 (Famili *et al.*, 2015), qui intervient entre les phases G0 et G1 et entre les phases G2 et M (Bonney-Berard *et al.*, 2004), induisant ainsi davantage d'apoptose dans les thymocytes (Famili *et al.*, 2015). Les cellules LSK cultivées avec WNT5a ont également significativement davantage de cellules apoptotiques et présentent une expansion réduite (Nemeth *et al.*, 2007).

De plus, les cellules LSK des organes lymphoïdes primaires et de la rate de ces souris WNT5a produisent davantage de cellules myéloïdes que de lymphocytes B (Famili *et al.*, 2015). L'augmentation observée de LMPP dans la moelle osseuse pourrait être une tentative de compenser la production réduite de lymphocytes. La surexpression de WNT5a *in vitro* sur des cellules LSK en culture augmente également la proportion de cellules dans la phase G0 et diminue celle des cellules dont le cycle cellulaire est actif (Nemeth *et al.*, 2007). Dans les LSK cultivées, la surexpression de WNT5a mène également à l'augmentation de l'expression de l'ARNm *Cdkn1b* (Nemeth *et al.*, 2007), qui code pour la protéine inhibitrice du cycle cellulaire p27. Cette protéine médie la transition entre les phases G0/G1 et les phases G1/S grâce à son activité pro-apoptotique (Abbastabar *et al.*, 2018; Razavipour *et al.*, 2020). L'ensemble de ces données indique que WNT5a, un ligand WNT non-canonique, joue un rôle inhibiteur dans le cycle cellulaire des CSH et impacte également leur différenciation, bien que la voie de signalisation exacte reste encore à déterminer.

Dans les cellules hématopoïétiques, PTK7 est majoritairement exprimé sur les cellules progénitrices comparativement aux cellules matures, surtout sur les cellules progénitrices myéloïdes (MPC) (Lhoumeau *et al.*, 2016; Prebet *et al.*, 2010). Une absence de PTK7 dans les HSPC augmente la proportion de cellules dans la phase de quiescence G0 et réduit le nombre de colonies obtenues lors d'une mise en culture (Lhoumeau *et al.*, 2016). Dans la voie WNT/PCP, PTK7 est essentiel afin de maintenir la réserve de CSH dans la moelle osseuse (Lhoumeau *et al.*, 2016). Bien que PTK7 ne semble pas être impliqué dans la survie des CSH normales (Lhoumeau *et al.*, 2016), une étude a démontré que sa surexpression dans les leucémies myéloïdes aiguës inhibe l'activité des caspases 3/7, conférant un plus haut taux de survie aux cellules cancéreuses en diminuant leur apoptose à la suite de traitement à la doxorubicine (Prebet *et al.*, 2010). Ensemble, ces résultats indiquent que PTK7, lorsqu'impliqué dans la voie WNT/PCP, est associé à des signaux prolifératifs.

Bien que de nombreux travaux ont été effectués sur VANGL2 dans les cellules épithéliales et neurales, très peu d'études se sont consacrées sur son rôle dans les cellules hématopoïétiques. La plus importante à ce sujet a démontré que VANGL2 est essentiel afin de maintenir la réserve murine de CSH et son renouvellement à la suite d'une greffe. Plus encore, les souris ayant un KO conditionnel de VANGL2 dans leurs cellules hématopoïétiques présentent un biais de production pour les cellules myéloïdes, altérant le ratio cellulaire myéloïde/lymphoïde et potentiellement la division asymétrique des CSH. Dans ces conditions, les CSH présentaient une expression augmentée pour l'inhibiteur du cycle cellulaire p16^{INK4a} (Bouali *et al.*, 2022), qui est un marqueur

de sénescence. À noter que la production de cellules myéloïdes est généralement augmentée à la suite de dommages hématopoïétiques (Faltusova *et al.*, 2020; Pietras *et al.*, 2015), mais également avec l'âge (Cho *et al.*, 2008). Cependant, on ne sait toujours pas si le biais vers la lignée myéloïde est un effet direct de l'absence du récepteur de la PCP ou s'il est indirectement dû à la perte d'un rôle protecteur de VANGL2.

1.6 Objectif et hypothèse

Comme mentionné dans la section précédente, la voie WNT/PCP est importante pour le maintien, l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH (Bouali *et al.*, 2022; Heinonen *et al.*, 2011; Lhoumeau *et al.*, 2016; Nemeth *et al.*, 2007). Pourtant, bien que VANGL2 est un élément de la voie WNT/PCP, très peu de recherches ont été effectuées sur cette protéine dans les cellules hématopoïétiques. Les précédents travaux de notre laboratoire suggèrent que VANGL2 protège les CSH contre la sénescence. Plus encore, en son absence, les CSH perdent leur capacité d'être greffées en série (Bouali *et al.*, 2022). Cependant, cette étude comportait quelques biais, dont la migration des CSH vers la moelle osseuse, la compétition donneur-receveur et elle ne permettait pas d'étudier l'érythropoïèse ni la thrombopoïèse. Pourtant, VANGL2 est fortement exprimé dans les HSPC, mais également dans les mégacaryocytes.

Le but de ma recherche est donc de déterminer le rôle de VANGL2 dans la reprise de l'hématopoïèse à la suite d'une irradiation sous-létale. L'irradiation causant des dommages à l'ADN des HSPC, il peut y avoir une réparation fonctionnelle ou non, mais également une réparation partielle. Celle-ci pourrait induire des mutations à l'ADN impactant la différenciation des CSH (Meng *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2014). VANGL2 n'a pas été étudié dans de tels stress génotoxiques. L'hypothèse de recherche est qu'en absence de VANGL2, la reprise de l'hématopoïèse sera incomplète ou suivra un profil anormal dû à une sénescence accrue des HSPC à la suite de l'irradiation. Plus encore, comme VANGL2 est fortement exprimé dans les mégacaryocytes, nous nous attendons à une réduction de la production de plaquettes en son absence. Afin de vérifier ces hypothèses, plusieurs objectifs de recherche ont été établis :

- 1- Déterminer si VANGL2 est nécessaire pour le maintien des CSH lors de stress induits dans leur environnement natif
- 2- Étudier l'effet de VANGL2 sur les progéniteurs myéloïdes, particulièrement sur les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires
- 3- Identifier les mécanismes d'action de VANGL2

Pour cela, des souris $Vav-iCre^+ Vangl2^{lox/lox}$ ($Vangl2^{\Delta\Delta}$), qui permet une délétion conditionnelle dans les cellules hématopoïétiques, et leurs contrôles de type sauvage (*Wild Type* WT) issus de la même portée ont été irradiés à 4,5 Gy (Gu *et al.*, 2020). Par la suite, des prises de sang ont régulièrement été effectuées afin de suivre la progression de la reprise de l'hématopoïèse. De plus, la rate et la moelle osseuse ont été extraites 11 jours ou 21 jours après l'irradiation. Les populations cellulaires de ces organes ont été analysées par cytométrie en flux afin de déterminer si un profil cellulaire prédomine après l'irradiation.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Éthique animale

Des souris B6.Cg-*Commd10*^{Tg(Vav1-icre)A2Kio/J} (*Vav-Cre*) et B6;129-*Vangl2*^{tm2.1Mdea/J} (*Vangl2*^{lox/lox}) furent procurées à partir de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Des souris males *Vav-Cre*+ *Vangl2*^{lox/lox} ou *Vav-Cre*+ *Vangl2*^{lox/+} ont été croisées avec des souris femelles de génotype *Vangl2*^{lox/+} ou *Vangl2*^{lox/lox} afin d'obtenir des souriceaux dont le gène *Vangl2* est absent des HSPC (*Vav-Cre*+ *Vangl2*^{lox/lox}) (*Vangl2*^{Δ/Δ}) et des souris contrôles (*Vav-Cre*- *Vangl2*^{lox/+} ou *Vav-Cre*- *Vangl2*^{lox/lox}) (WT). Les souris ont été irradiées à 4,5 Gy (Gu *et al.*, 2020) par l'appareil RS 2000 *small animal X-ray irradiator* (RadSource Technologies, Suwanee, GA). Toutes les souris ont été élevées dans un environnement stérile de niveau 1 à l'animalerie de l'Institut national de la recherche scientifique (INRS) - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie (Laboratoire national de biologie expérimentale). Toutes les procédures ont été effectuées en respectant les normes du Conseil canadien de la protection des animaux et ont été approuvées par le Comité institutionnel de la protection des animaux de l'INRS (protocoles 2101-02 et 2104-03).

2.2 Cytométrie en flux

Pour l'obtention de la moelle osseuse (MO), le tibia et le fémur ont été prélevés comme décrit précédemment (Bouali *et al.*, 2022) et rincés avec du tampon FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) (PBS 1x ; 0,5 mM EDTA; BSA 0,1% m/v) en utilisant une seringue 25G. Pour la rate, elle a été retirée puis préservée dans du tampon FACS avant d'être broyée avec le piston d'une seringue de 10 mL afin d'en recueillir les cellules. Les cellules ont été recueillies dans un tube contenant du tampon FACS puis les échantillons de la rate et de la MO ont été comptés à l'hématimètre. Les échantillons de la rate et de la MO ont ensuite été centrifugés à 200 xg pendant 5 minutes à 4°C puis re-suspendus à 1×10⁸ cellules/mL dans des tubes de cytométrie. Pour le sang périphérique, deux ou trois gouttes ont été prélevées des souris par la veine mandibulaire. Pour le sang lysé, 30 µL de sang a été pipeté dans un tube à cytomètre et lysé grâce à une solution hypotonique (14 mM NH₄Cl ; 17 mM Tris-HCl, pH 7.6) jusqu'à ce que l'échantillon soit presque transparent. La réaction a été arrêtée avec 4 volumes de tampon FACS froid. L'échantillon a été centrifugé à 200 xg pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été lavé avec 3 mL de tampon FACS et centrifugé à 200 xg pendant 5 minutes à 4°C et le surnageant a été décanté. Pour le sang non lysé, le sang a été dilué (1 : 10) dans du tampon FACS avant le marquage de surface. Afin de bloquer les liaisons non-spécifiques, un volume de Fc block dilué (5 µg/mL)

équivalent à celui des échantillons a été ajouté, à l'exception du sang lysé et des colonies où 1 μL de Fc block concentré a été utilisé, avant d'effectuer le marquage de surface pendant 30 minutes au noir sur glace (Tableau 2.1). Le tout a ensuite été lavé. Si nécessaire, l'anticorps secondaire a été ajouté et le tout incubé pour 20 minutes au noir sur glace avant d'être lavé. Pour le marquage intracellulaire, les cellules ont d'abord été marquées avec les anticorps de surface, puis fixées et perméabilisées à l'aide de la trousse de marquage Foxp3 pour les protéines nucléaires selon les directives du fabricant (eBioscience, San Diego, CA). Les échantillons ont été bloqués avec du sérum de rat à 2 % pendant 5 minutes avant le marquage intracellulaire avec RUNX1b pendant la nuit à 4°C. L'acquisition des échantillons au cytomètre en flux a été effectuée grâce à l'appareil BD LSRFortessa *four laser flow cytometer* (BD Biosciences, Mountain View, CA). Les échantillons ont par la suite été analysés en utilisant le programme FACS DiVa (v. 8.1) (BD Biosciences, Mountain View, CA). Le volume final des échantillons de sang non-lysé et de colonies a été approximé avec une pipette de 1000 μL avant l'acquisition. L'acquisition pour ces échantillons a été réalisée à vitesse constante.

2.3 Culture cellulaire

Les suspensions cellulaires de la MO ont été préparées dans de l'IMDM (Life Technologies) contenant 10% Premium FBS (Wisent Bio Products, Saint-Bruno, QC, Canada). En utilisant une seringue dont l'aiguille est émoussée, les cellules ont été mises en culture dans des plats Pétri non-adhérents de 35 mm à une densité de 20 000 cellules par plat Pétri dans un milieu de méthylcellulose optimisé pour la croissance multi-lignée érythro-myéloïde (MethoCult™ GF M3434; Stem Cell Technologies). Des duplicatas ont été effectués pour chaque animal. Les cultures ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Les CFU-E et les BFU-E ont été comptées après 7 jours et les colonies myéloïdes ont été comptées après 14 jours d'incubation. Les cellules ont ensuite été recueillies 15 jours après leur mise en culture et analysées au cytomètre en flux. Les colonies ont été identifiées par leur morphologie sous un microscope inversé tel que détaillé par Stem Cell Technologies.

2.4 Tests statistiques

Afin de déterminer si les résultats obtenus présentent une différence statistiquement significative, un test de t de Student bidirectionnel a été effectué à moins d'indication contraire. Les tests statistiques ont été effectués sur GraphPad Prism 9. Aucun test statistique n'a été effectué sur les groupes possédant un n inférieur à 3. Les résultats sont présentés comme étant moyenne \pm SEM.

Tableau 2.1 Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux

Analyse	Anticorps	Fluorochrome	[µg/mL]	Compagnie	Analyse	Anticorps	Fluorochrome	[µg/mL]	Compagnie
MPC de la MO et de la rate	CD41	FITC	1,667	BD Biosciences	HSPC de la MO	Fc Block	Purifié	2,500	BD Biosciences
	CD34	PE	6,250	BD Biosciences		CD48	eFluor 450	0,500	eBioscience
	CD16/32	PerCPCy5.5	0,500	BD Biosciences		CD117 (c-KIT)	PE	0,500	BD Biosciences
	CD117 (c-KIT)	APC R700	1,000	BD Biosciences		SCA-1 (Ly-6A/E)	PECy7	0,250	BD Biosciences
	SCA-1 (Ly-6A/E)	PECy7	0,250	BD Biosciences		CD150 (SLAM)	A647	1,250	BioLegend
	CD150 (SLAM)	A647	0,500	BioLegend		CD11b	biotin	1,250	BD Biosciences
	CD105	eFluor 450	1,250	eBioscience		Ter119	biotin	0,625	BD Biosciences
	Ter119	biotin	0,625	BD Biosciences		CD3ε	biotin	1,250	BD Biosciences
	CD3ε	biotin	1,250	BD Biosciences		B220	biotin	1,250	BD Biosciences
	B220	biotin	1,250	BD Biosciences		GR1 (Ly-6C/G)	biotin	1,250	BD Biosciences
	GR1 (Ly-6C/G)	biotin	1,250	BD Biosciences		CD135	PerCP-eFluor 710	0,500	eBioscience
	CD11b	biotin	1,250	BD Biosciences		Streptavidin	V500	0,313	BD Biosciences
Streptavidin	V500	0,313	BD Biosciences	Sang lysé périphérique	Fc Block	Purifié	3,333	BD Biosciences	
Cellules matures myéloïdes de la MO et de la rate	Fc Block	Purifié	2,500		BD Biosciences	CD11b	A647	0,250	BD Biosciences
	CD71	eFluor 450	0,500		eBioscience	CD19	PE	0,250	BD Biosciences
	Ter119	biotin	0,625		BD Biosciences	CD3ε	PECy7	0,500	eBioscience
	CD45	PE-CF594	0,500		BD Biosciences	CD11c	BV711	0,250	BD Biosciences
	CD41	PE	0,500		BD Biosciences	GR1	APCCy7	0,250	BD Biosciences
	CD11b	A647	0,250	BD Biosciences	Sang non-lysé périphérique	FC block	Purifié	2,500	BD Biosciences
	GR1 (Ly-6C/G)	APCCy7	0,250	BD Biosciences		CD71	eFluor 450	0,500	eBioscience
Streptavidin	FITC	1,250	BD Biosciences	Ter119		biotin	0,625	BD Biosciences	
Cellules matures lymphoïdes de la MO et de la rate	Fc Block	Purifié	2,500	BD Biosciences		CD45	PE-CF594	0,500	BD Biosciences
	CD11c	bv711	0,250	BD Biosciences	CD41	PE	0,500	BD Biosciences	
	CD19	PE	0,250	BD Biosciences	Streptavidin	FITC	1,250	BD Biosciences	
	CD3ε	PECy7	0,500	eBioscience	Colonies	Fc Block	Purifié	3,333	BD Biosciences
	CD11b	A647	0,250	BD Biosciences		CD117 (c-KIT)	PE	0,250	BD Biosciences
	IgD	APC	0,250	BD Biosciences		CD11c	PECy7	0,500	BD Biosciences
	CD4	APCCy7	0,500	BD Biosciences		CD11b	A647	0,250	BD Biosciences
	CD8a	eFluor 450	0,250	BD Biosciences		GR1 (Ly-6C/G)	APCCy7	0,250	BD Biosciences
Intra-cellulaire	RUNX1b	A488	13,333	Bioss	CD71	eFluor 450	0,500	eBioscience	

3 RÉSULTATS

Les précédents travaux sur VANGL2 dans l'hématopoïèse ont démontré que l'impact de *Vangl2* varie selon l'âge des souris et est surtout observable chez les souris femelles (Bouali *et al.*, 2022). Nous avons donc irradié des souris femelles de différents groupes d'âge. Afin de nous assurer d'être en mesure de visualiser d'éventuelles perturbations dans les progéniteurs myéloïdes, nous avons choisi des groupes d'âge avec des écarts de 2-3 mois, ce qui correspond à un peu plus du double de la durée de vie d'un globule rouge murin (Van Putten & Croon, 1958), qui est la cellule myéloïde avec la plus longue durée de vie. Nous avons donc choisi des souris de 3 mois (jeunes) et de 5 mois (adultes) de manière similaire à ce qui avait déjà été effectué lors de l'étude de l'impact de VANGL2 murin dans les transplantations de MO (Bouali *et al.*, 2022). Nous avons également sélectionné des souris de 8 mois et plus (vieilles). Des prises de sang régulières ont été effectuées sur les souris, en plus de récolter la MO et la rate au jour 11 ou au jour 21 afin de suivre la reconstitution hématopoïétique à la suite de l'irradiation (Figure 3.1).

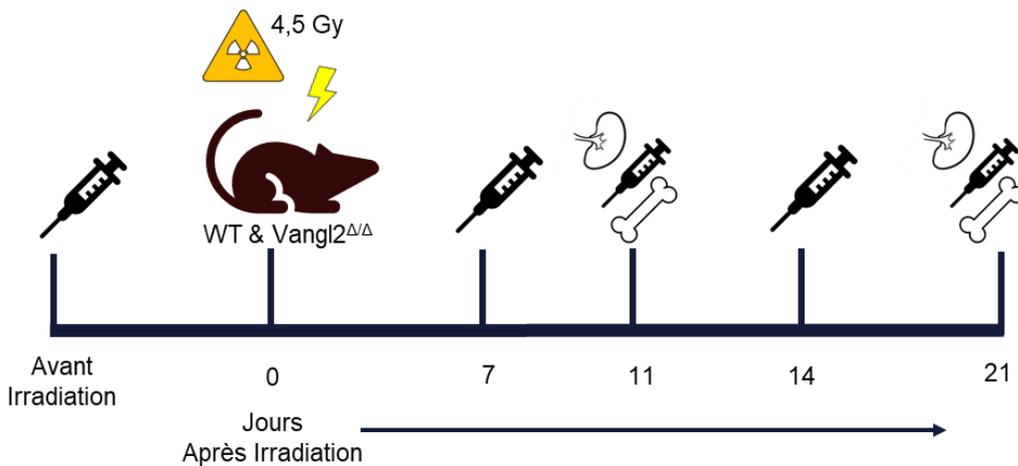


Figure 3.1 Ligne du temps des prélèvements d'organes des souris irradiées

3.1 En absence de VANGL2, les HSPC ont un dérèglement de leur prolifération et perdent leur capacité de se maintenir dans la moelle osseuse en cas de stress génotoxique

Pour commencer, nous avons vérifié si VANGL2 est nécessaire au maintien des HSPC dans leur environnement natif à la suite d'un choc génotoxique. La MO de souris WT et de souris *Vangl2^{ΔΔ}* a été récoltée après 11 jours et après 21 jours d'irradiation sous-létale et les populations cellulaires analysées par cytométrie en flux (Figure 3.2) afin de suivre la reprise hématopoïétique. Il est possible de voir qu'après 11 jours d'irradiation, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois ne semblent pas

démontrer de différence majeure par rapport aux souris contrôles WT du même âge. La cellularité de leur MO est similaire à celle des souris WT (Figure 3.3 A) et le nombre de cellules des différentes HSPC ne démontre aucune différence statistiquement significative (Figure 3.3 B-G). Cependant, il est malgré tout possible de voir que les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois ont tendance à avoir davantage de MPP2, dont le biais est érythro-mégacaryocytaires, au jour 11 et que cette tendance s'inverse au jour 21 (Figure 3.3 E).

Pour ce qui est des souris de 5 mois, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* ont une augmentation significative de la cellularité de leur MO par rapport au souris WT du même âge 11 jours après l'irradiation (Figure 3.4 A). De plus, le nombre de LT-CSH *Vangl2^{ΔΔ}* est lui aussi significativement plus élevé comparativement à ce qui est observé chez les souris WT (Figure 3.4 C). 21 jours après l'irradiation, il est cependant possible de voir que non-seulement ces augmentations ne se maintiennent pas dans le temps, mais le nombre de LT-CSH des souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois a plutôt tendance à être inférieur à celui des souris WT (Figure 3.4 C). Plus encore, 21 jours après l'irradiation, la quantité de CT-CSH, MPP2, de MPP3 et de LMPP, tout comme la quantité globale de LSK est significativement inférieure par rapport à celles des souris WT (Figure 3.4 B, D-G). Ainsi, malgré la hausse du nombre de LT-CSH 11 jours après l'irradiation, les souris de *Vangl2^{ΔΔ}* 5 mois sont incapables de reconstituer leur MO à long-terme.

L'augmentation du nombre de LT-CSH chez les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois nous a incité à vérifier si elle est accompagnée de changements prolifératifs ou de différenciation des HSPC. Les précédents travaux sur VANGL2 dans les cellules hématopoïétiques indiquent que son effet est âge-dépendant (Bouali *et al.*, 2022) et c'est également ce que nous avons observé dans les HSPC à la suite de l'irradiation sous-létale (Figure 3.3-3.4). Ainsi, afin d'amplifier cet effet âge-dépendant, nous avons utilisé des souris de 8 mois afin de vérifier la prolifération *in vitro*. Nous avons d'abord confirmé que les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de ce groupe d'âge possèdent également une tendance à avoir davantage de LT-CSH que les souris WT 11 jours après l'irradiation sous-létale (Figure 3.6 A). Les cellules de la MO de souris de 3 mois et de 8 mois ont été récoltées 11 jours après l'irradiation et mises en culture. 15 jours après la mise en culture, les colonies ont été récoltées et examinées par cytométrie en flux (Figure 3.5). Lors du décompte des colonies par microscopie, aucune différence n'a été relevée en ce qui concerne le type de colonies obtenues et le nombre total de colonies (Figure 3.6 B) entre les souris WT et les souris *Vangl2^{ΔΔ}*. Ainsi, il ne semble pas y avoir de différence en ce qui à trait la différenciation *in vitro*. Cependant, lorsqu'on observe la quantité de cellules récoltées après 15 jours de culture, il est possible de voir plusieurs variations. Les HSPC *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois ont produit significativement davantage de GR1+ que les souris WT.

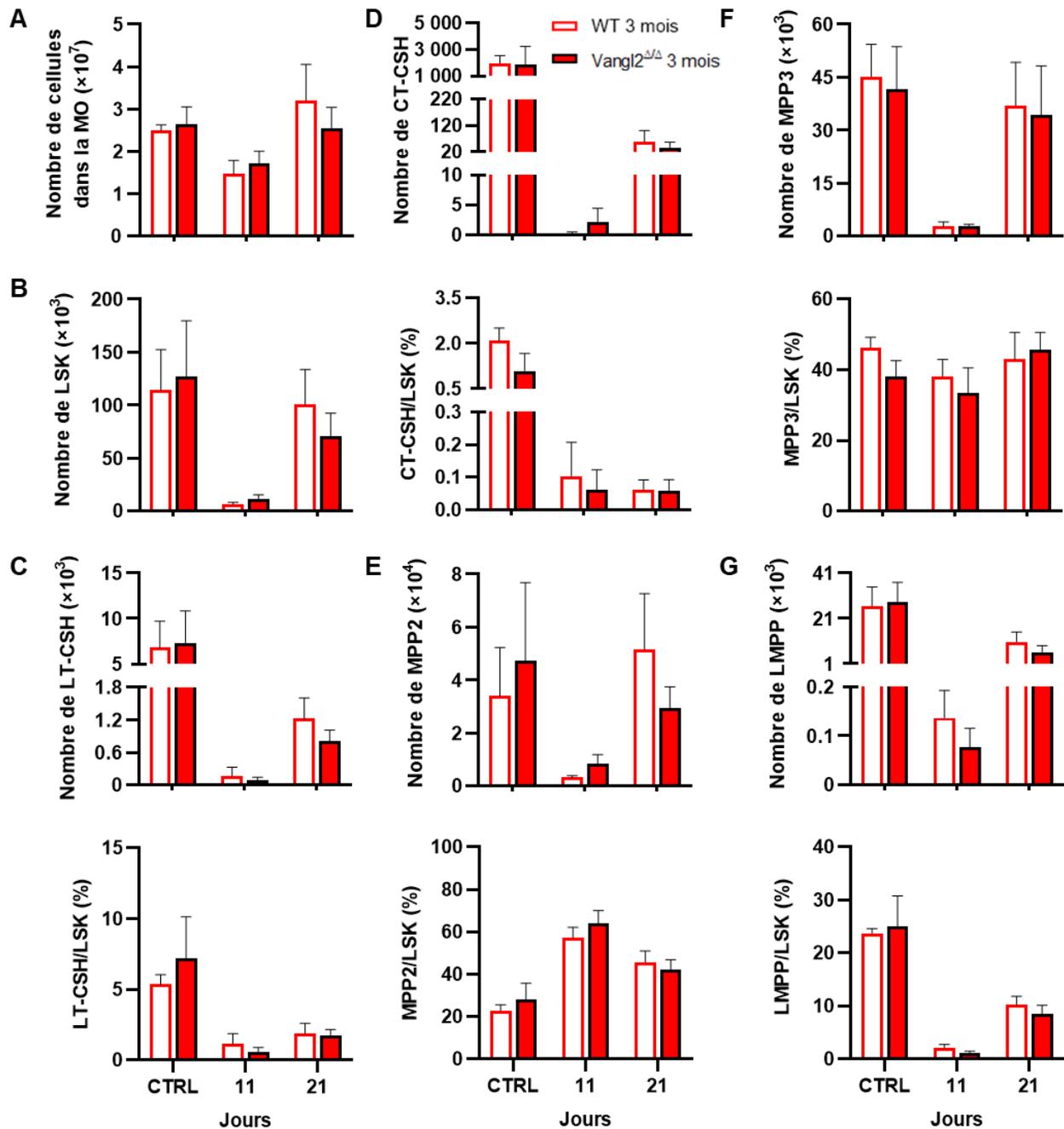


Figure 3.3 Analyse des HSPC *Vangl2^{Δ/Δ}* de souris 3 mois

(A) L'histogramme représente le nombre de cellule dans la MO d'une patte de souris (tibia + fémur). (B-G) Les histogrammes représentent les résultats quantitatifs des populations observées par cytométrie en flux à la Figure 3.2. (C-G) L'histogramme du haut représente le nombre absolu de cette population cellulaire dans la patte d'une souris et l'histogramme du bas représente le pourcentage des HSPC dans la population de LSK observée en (B). CTRL = Contrôles non-irradiés. CTRL (n = 11 WT, n = 4 *Vangl2^{Δ/Δ}*), Jour 11 (n = 10 WT, n = 7 *Vangl2^{Δ/Δ}*), Jour 21 (n = 5 WT, n = 6 *Vangl2^{Δ/Δ}*). Les données proviennent d'au moins trois expériences.

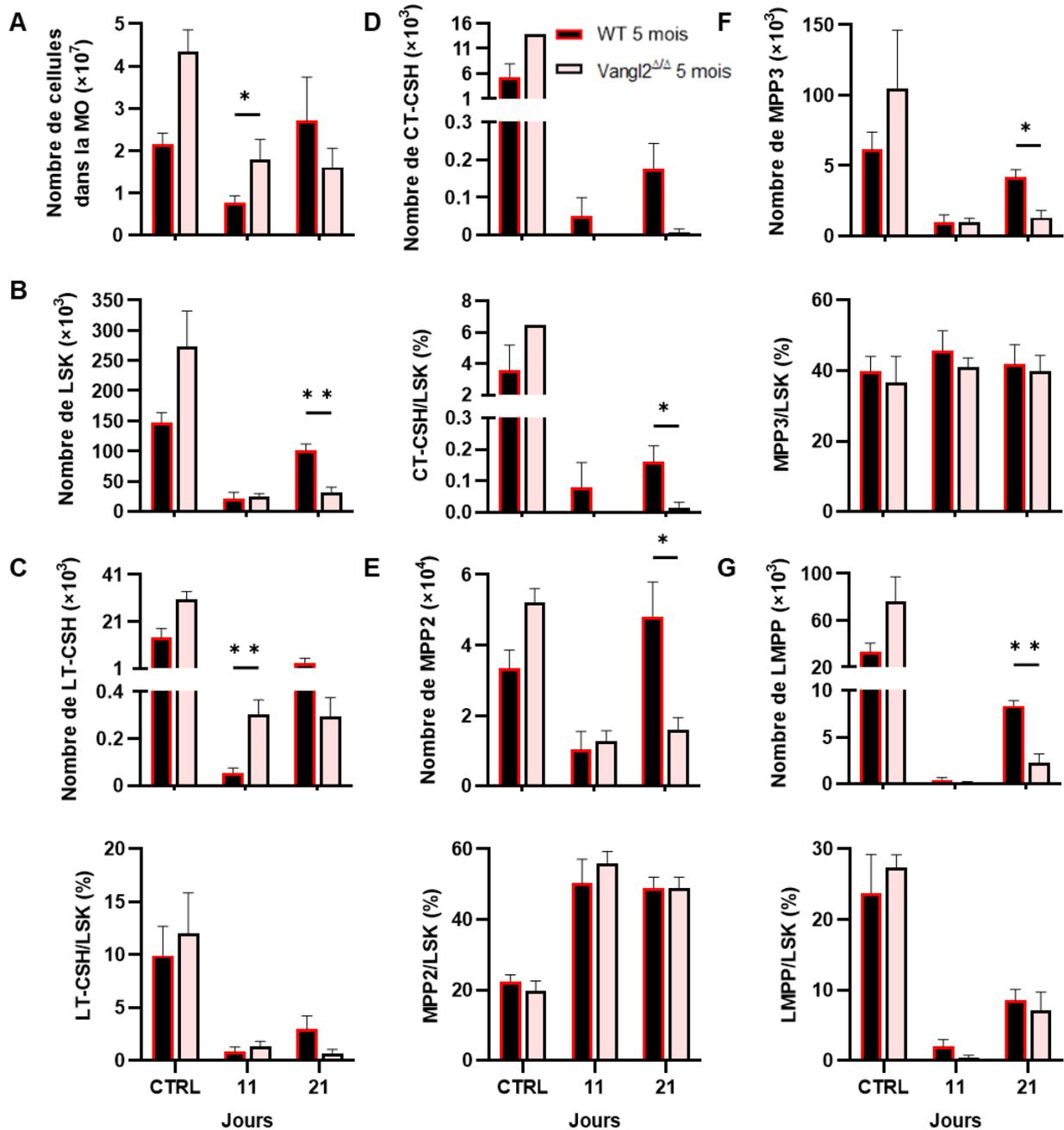


Figure 3.4 Dérèglement des HSPC *Vangl2 Δ/Δ* de souris de 5 mois

(A) L'histogramme représente le nombre de cellule dans la MO d'une patte de souris (tibia + fémur). (B-G) Les histogrammes représentent les résultats quantitatifs des populations observées par cytométrie en flux à la Figure 3.2. (C-G) L'histogramme du haut représente le nombre absolu de cette population cellulaire dans la patte d'une souris et l'histogramme du bas représente le pourcentage des HSPC dans la population de LSK observée en (B). CTRL = Contrôle pré-irradiation. CTRL (n = 5 WT, n = 2 *Vangl2 Δ/Δ*), Jour 11 (n = 5 WT, n = 3 *Vangl2 Δ/Δ*), Jour 21 (n = 3 WT, n = 3 *Vangl2 Δ/Δ*). Les données des souris proviennent d'au moins deux expériences(CTRL, Jour 21), à l'exception des CT-CSH CTRL et du jour 11 qui ne proviennent que d'une.

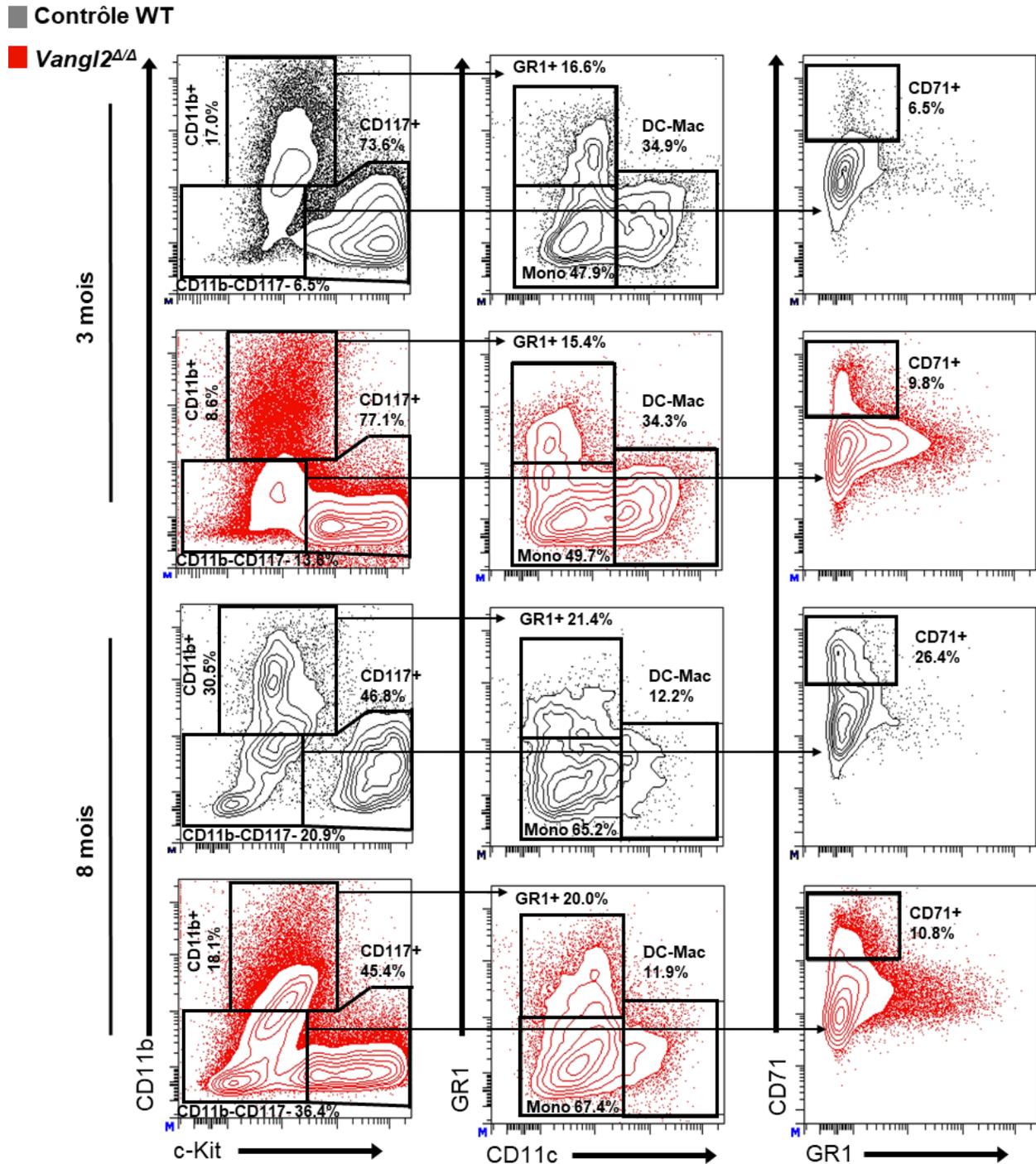


Figure 3.5 Stratégie de sélection des colonies myéloïdes

Représentation des populations cellulaires observées par cytométrie en flux des colonies récoltées 15 jours après leur mise en culture. Les cellules provenant de la MO de souris irradiées 11 jours précédant l'obtention des échantillons et ont été mise en culture dans du M3434. Les panneaux du haut représentent les souris âgées de 3 mois et les panneaux du bas, les souris âgées d'au moins 8 mois.

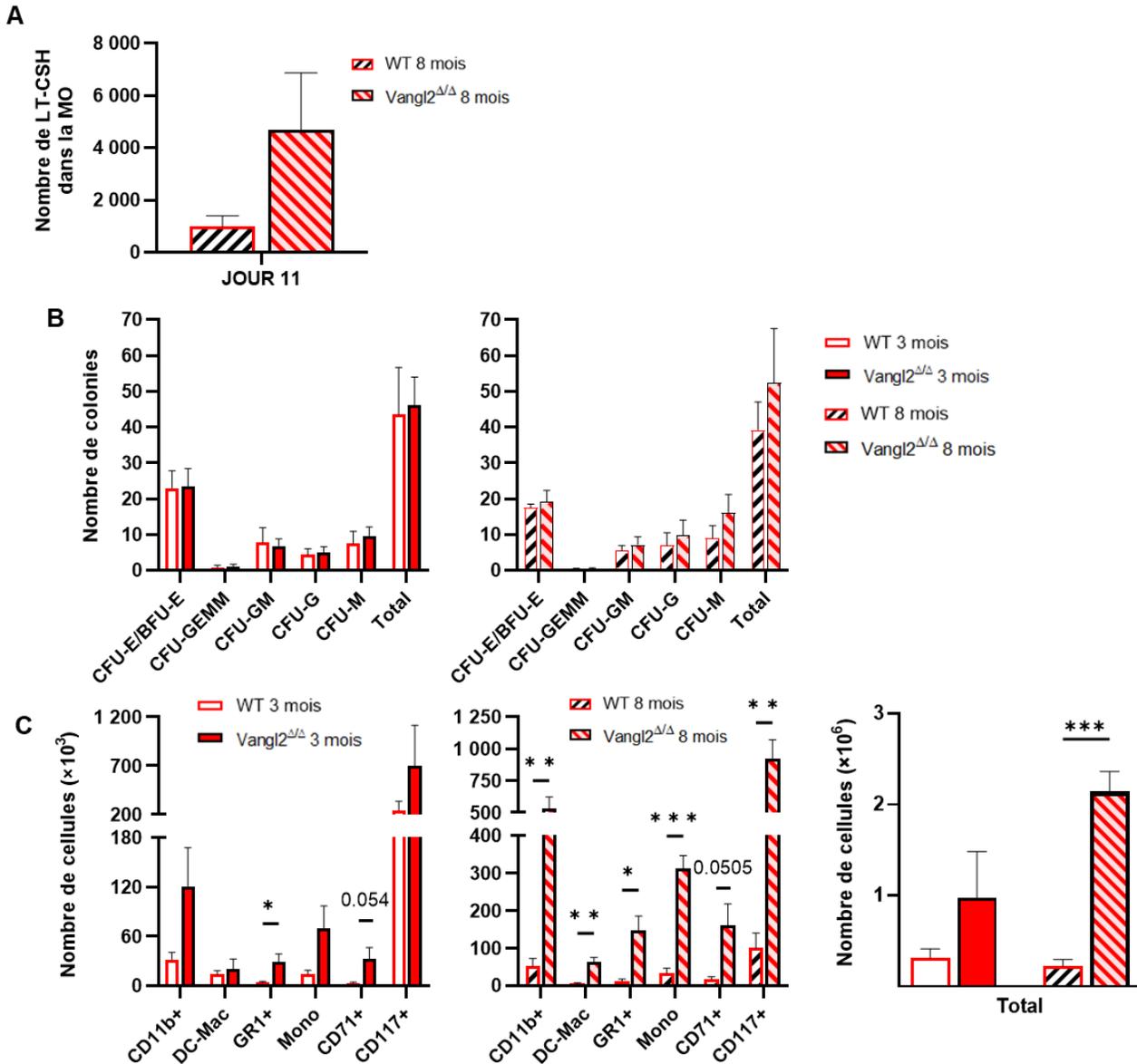


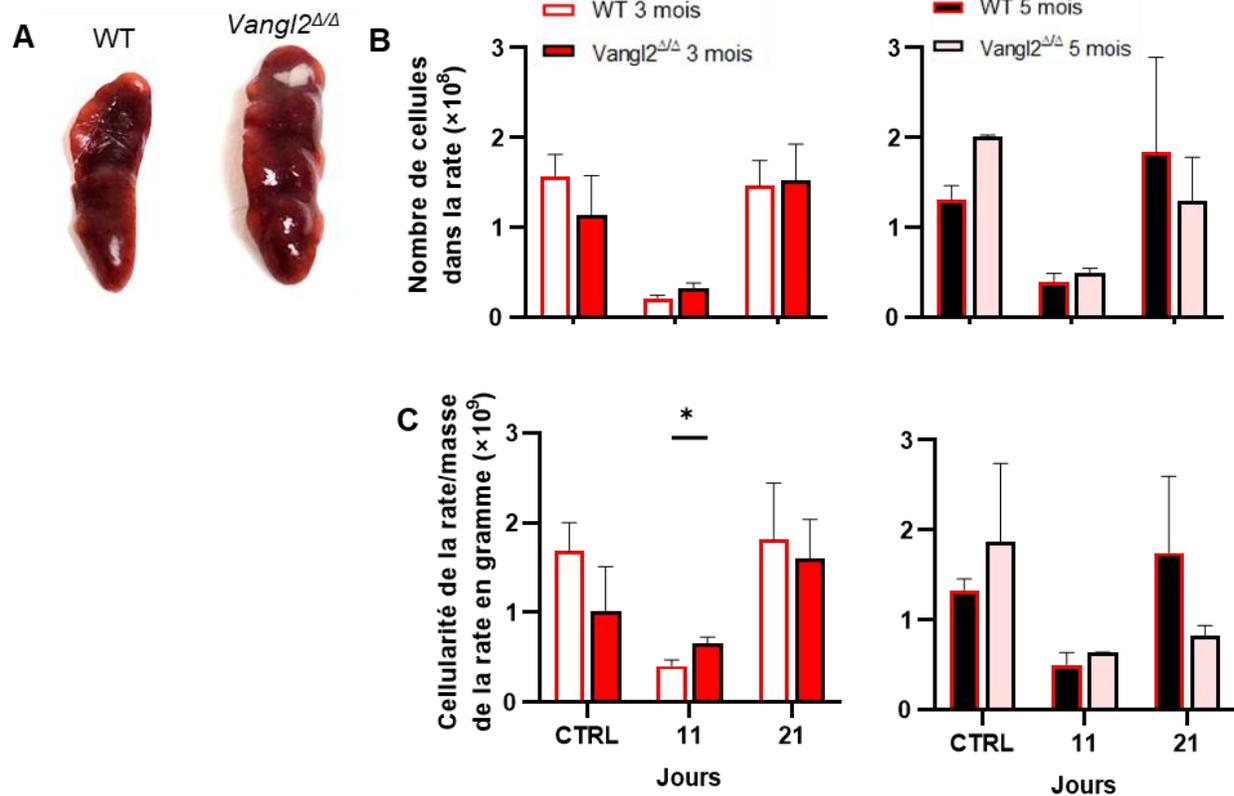
Figure 3.6 L'absence de VANGL2 augmente la cellularité des colonies *in vitro*

(A) Nombre de LT-CSH dans une patte (tibia + fémur) de souris âgée de 8 mois. (n = 3 WT, n = 6 *Vangl2* Δ/Δ). Les données proviennent d'une expérience. (B) Nombre de colonies produites par la mise en culture dans du M3434 de cellules de la moelle osseuse de souris irradiées 11 jours auparavant. L'histogramme de gauche représente des souris âgées de 3 mois et l'histogramme de droite, des souris âgées d'au moins 8 mois. Les CFU-E/BFU-E ont été comptées après 7 jours de culture et les autres colonies, après 14 jours. Les données représentent la moyenne des duplicatas. (n = 3 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2* Δ/Δ 3 mois, n = 3 WT 8 mois, n = 2 *Vangl2* Δ/Δ 8 mois). Les données proviennent d'une expérience. (C) Les histogrammes représentent le nombre de cellules récoltées pour chaque population cellulaire 15 jours après la mise en culture des cellules provenant de la moelle osseuse de souris irradiées 11 jours précédant la mise en culture. L'histogramme de gauche représente les souris âgées de 3 mois, l'histogramme central représente les souris âgées de 8 mois et l'histogramme de droite représente le nombre total de cellules récoltées dans un plat Pétri. Les données proviennent d'une seule expérience où des duplicatas ont été effectués. Les duplicatas n'ont pas été poolés. (n = 6 WT 3 mois, n = 6 *Vangl2* Δ/Δ 3 mois, n = 6 WT 8 mois, n = 4 *Vangl2* Δ/Δ 8 mois). DC-Mac = cellules semblables aux cellules dendritiques et aux macrophages. Mono = monocytes.

Il est également possible de voir que ces mêmes HSPC ont tendance à produire davantage de cellules CD11b+, de monocytes, de cellules CD71+ et de cellules CD117+. Lorsque les cellules cultivées proviennent de souris de 8 mois, l'augmentation significative observée pour les cellules GR1+ *Vangl2*^{Δ/Δ} est maintenue et celles observées pour les CD11b+ *Vangl2*^{Δ/Δ}, les monocytes *Vangl2*^{Δ/Δ} et les CD117+ *Vangl2*^{Δ/Δ} le deviennent également. Il y également une hausse significative du nombre de cellules de type cellule dendritique dans les plats Pétri. Les cellules CD71+ *Vangl2*^{Δ/Δ} associées aux globules rouges ont encore une forte tendance à la hausse (Figure 3.6 C). Les progéniteurs *Vangl2*^{Δ/Δ} de la MO semblent donc proliférer davantage que les progéniteurs WT *in vitro*, augmentant ainsi la cellularité des colonies. Cette différence s'amplifie avec l'âge des souris.

3.2 Les rates *Vangl2*^{Δ/Δ} ont des nodules à la suite d'un stress génotoxique

Lors du prélèvement d'organes, nous avons remarqué que les rates *Vangl2*^{Δ/Δ} présentent plusieurs nodules, et ce, en plus grande quantité que les rates des souris WT (Figure 3.7 A). Des nodules similaires avaient déjà été observés sur des rates de rats à la suite d'une transplantation de HSPC et il avait été proposé que ces nodules représentent des amas de prolifération (Till & McCulloch, 1961). Comme la rate a déjà tendance à produire davantage de cellules myéloïdes que lymphoïdes à l'état homéostatique (O'Neill *et al.*, 2011) et qu'à la suite de dommages hématopoïétiques, un biais myéloïde est nécessaire afin de permettre la récupération et la survie de l'hôte (Pietras *et al.*, 2015), il se peut que ces nodules représentent des amas de prolifération de cellules myéloïdes. Plus encore, notre équipe avait précédemment démontré que l'absence de VANGL2 promeut les splénomégalies chez les souris de 18 mois (Bouali *et al.*, 2022). Nous avons donc vérifié la cellularité de la rate afin d'observer la présence d'anomalies dans l'hématopoïèse extra-médullaire. Comme observé précédemment (Bouali *et al.*, 2022), avant l'irradiation, il n'y a pas de différence entre les souris WT et les souris *Vangl2*^{Δ/Δ} de 3 mois. Pour ce qui est des souris de 5 mois, il est possible de voir une tendance d'augmentation de la cellularité des rates *Vangl2*^{Δ/Δ} avant l'irradiation. Cependant, 11 jours après l'irradiation, cette tendance disparaît chez les souris de 5 mois (Figure 3.7 B). Lorsqu'on effectue le ratio cellularité de la rate / masse de la rate, il est possible de voir une augmentation chez les jeunes souris *Vangl2*^{Δ/Δ} après 11 jours, ce qui n'est pas observable chez les souris de 5 mois. Au contraire, ce ratio indique également une tendance à la baisse dans les rates des souris de 5 mois *Vangl2*^{Δ/Δ} 21 jours après l'irradiation (Figure 3.7 C). Ainsi, il semblerait que les nodules représentent une tentative de prolifération accrue des précurseurs hématopoïétiques présents dans la rate des souris *Vangl2*^{Δ/Δ} de 3 mois et que ceci est absent chez les souris *Vangl2*^{Δ/Δ} de 5 mois.



3.3 L'absence de VANGL2 chez les cellules hématopoïétiques impacte les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires lors de la reprise hématopoïétique

Par la suite, vu la réduction du nombre de MPP2 et de MPP3 dans la MO après 21 jours, nous avons regardé l'effet de VANGL2 sur les cellules progénitrices myéloïdes (MPC) en analysant les proportions de ces progéniteurs par cytométrie en flux dans la MO (Figure 3.8) et dans la rate (Figure 3.9). Au jour 11, le nombre total de MPC *Vangl2 Δ/Δ* dans la MO est légèrement plus élevé chez les souris de 3 mois et cette hausse devient significative chez les souris de 5 mois (Figure 3.10 A). Les souris *Vangl2 Δ/Δ* de 3 mois maintiennent cette tendance au jour 21, alors que les souris de 5 mois *Vangl2 Δ/Δ* ont plutôt tendance à avoir moins de MPC dans leur MO 21 jours après l'irradiation (Figure 3.10 A). Bien qu'aucune différence statistiquement significative ne soit relevée

dans la rate des souris, il est possible de voir que les *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois ont tendance à avoir davantage de MPC que les souris WT du même âge, ce qui n'est pas le cas pour les souris de 5 mois. Plus encore, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois ont en fait tendance à avoir un nombre réduit de MPC dans leur rate par rapport aux souris WT du même âge 21 jours après l'irradiation (Figure 3.11 A).

En regardant les différentes populations de MPC, il est possible de remarquer que 11 jours suivant l'irradiation, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois et de 5 mois ont un nombre significativement plus élevé de MkP que les souris WT du même groupe d'âge dans leur MO. Après 21 jours, cette hausse dans la MO n'est plus maintenue, bien que la proportion de MkP dans les MPC a toujours tendance à être plus élevée chez les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois que chez les WT (Figure 3.10 B, C). Pour ce qui est de la rate, il est encore possible de voir une forte tendance des souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois à avoir davantage de MkP que les WT 11 jours après l'irradiation. Bien que cette tendance ne soit pas observable dans les rates des souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois au jour 11, ces souris ont tout de même tendance à avoir une proportion MkP/MPC plus élevée que les WT. Au jour 21, cependant, contrairement à la MO, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois ont tendance à avoir moins de MkP que les WT et leur proportion MkP/MPC est d'ailleurs significativement réduite. Les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois conservent, quant à elles, l'augmentation de la proportion MkP/MPC également observée dans la MO et qui devient significative au jour 21 dans la rate (Figure 3.11 B, C)

Pour ce qui est des progéniteurs érythrocytaires, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois ont significativement davantage de PreCFU-E dans leur MO 11 jours suivant l'irradiation sous-létale et les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois ont également une forte tendance similaire (Figure 3.10 D, E). Dans la rate, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois ont également tendance à avoir un nombre plus élevé de PreCFU-E que les WT du même âge (Figure 3.11 D). Ceci n'est cependant pas le cas pour les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois qui ont plutôt tendance à avoir un nombre réduit de PreCFU-E dans leur rate 11 jours suivant l'irradiation. Cette réduction du nombre de PreCFU-E devient significative au jour 21, tout comme le ratio PreCFU-E/MPC (Figure 3.11 E)

Pour ce qui est des GMP, il est tout d'abord possible de voir qu'à l'état homéostatique, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois ont un ratio GMP/MPC plus élevé dans leur MO que les souris WT du même âge (Figure 3.10 F). Ceci n'avait pas encore été relevé lors de notre précédente étude sur VANGL2, qui ne s'était pas penchée sur les progéniteurs myéloïdes (Bouali *et al.*, 2022). Bien que les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois ne suivent pas de tendance similaire pour leur ratio GMP/MPC dans la MO, elles ont tout de même tendance à avoir un nombre plus élevé de GMP que les souris

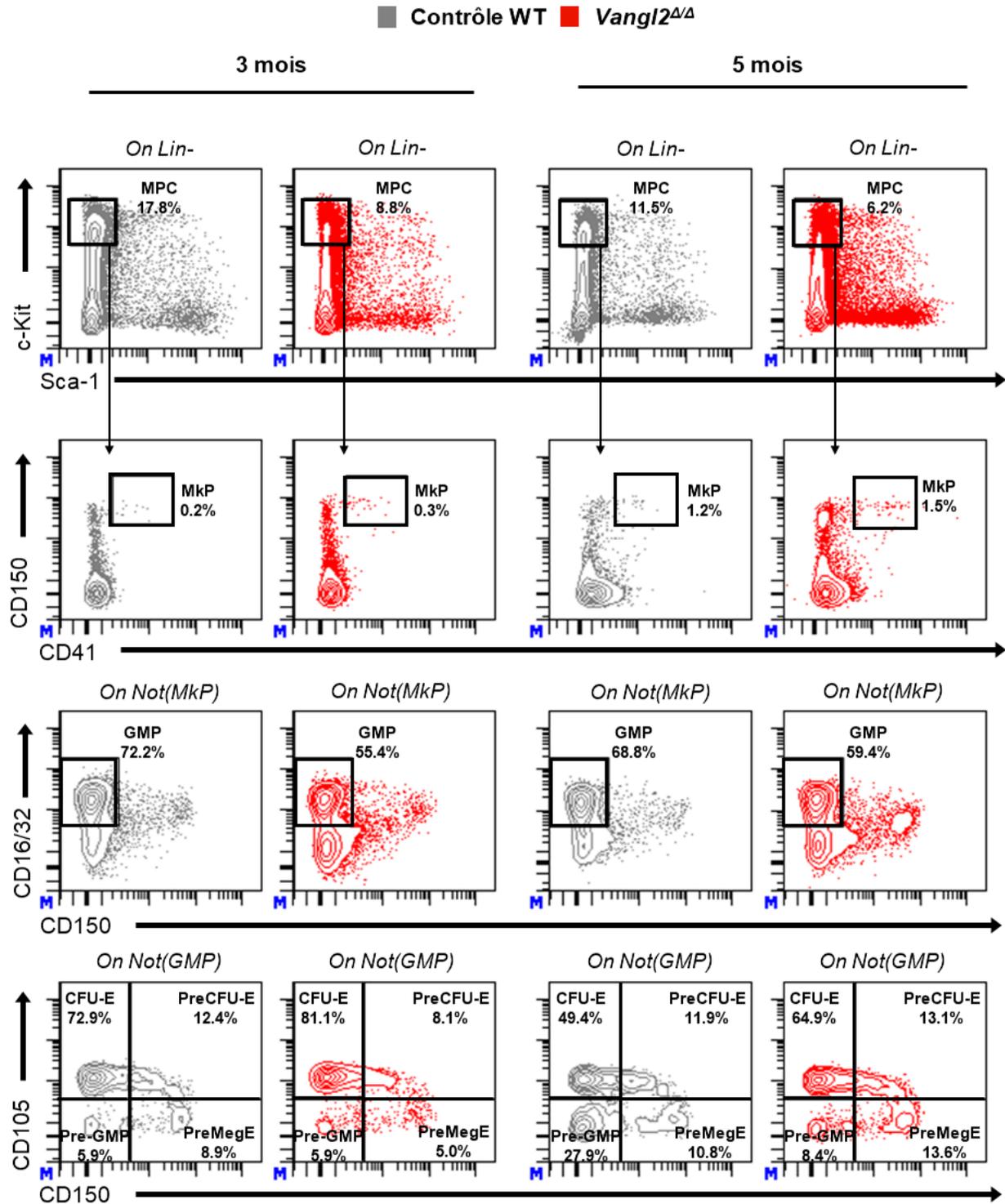


Figure 3.8 Stratégie de sélection des progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse

Représentation des populations cellulaires observées par cytométrie en flux dans la MO de souris irradiées 21 jours auparavant. Les panneaux de gauche représentent des souris âgées de 3 mois et les panneaux de droite, des souris âgées de 5 mois.

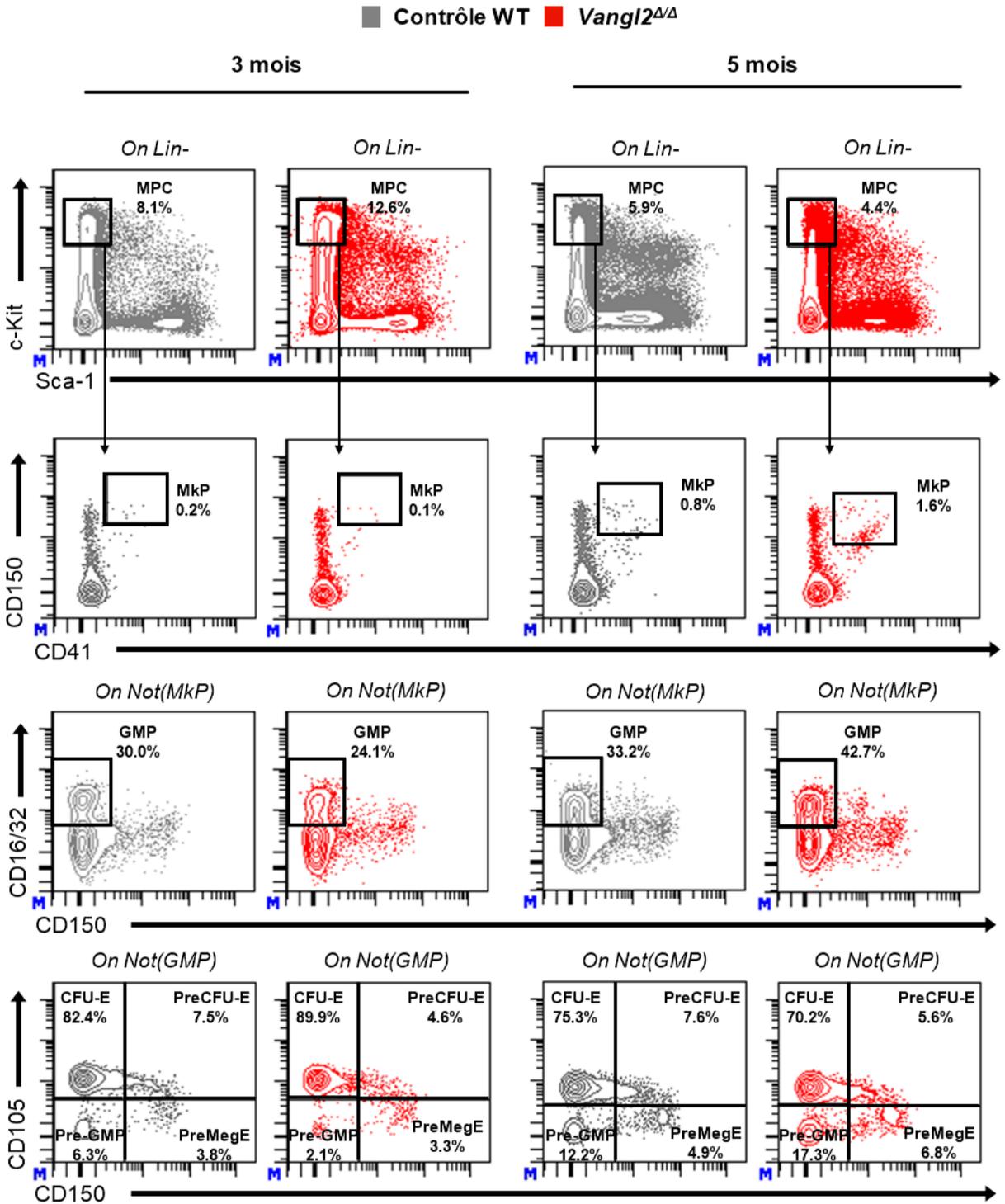


Figure 3.9 Stratégie de sélection des progéniteurs myéloïdes spléniques

Représentation des populations cellulaires observées par cytométrie en flux dans la rate de souris irradiées 21 jours auparavant. Les panneaux de gauche représentent des souris âgées de 3 mois et les panneaux de droite, des souris âgées de 5 mois.

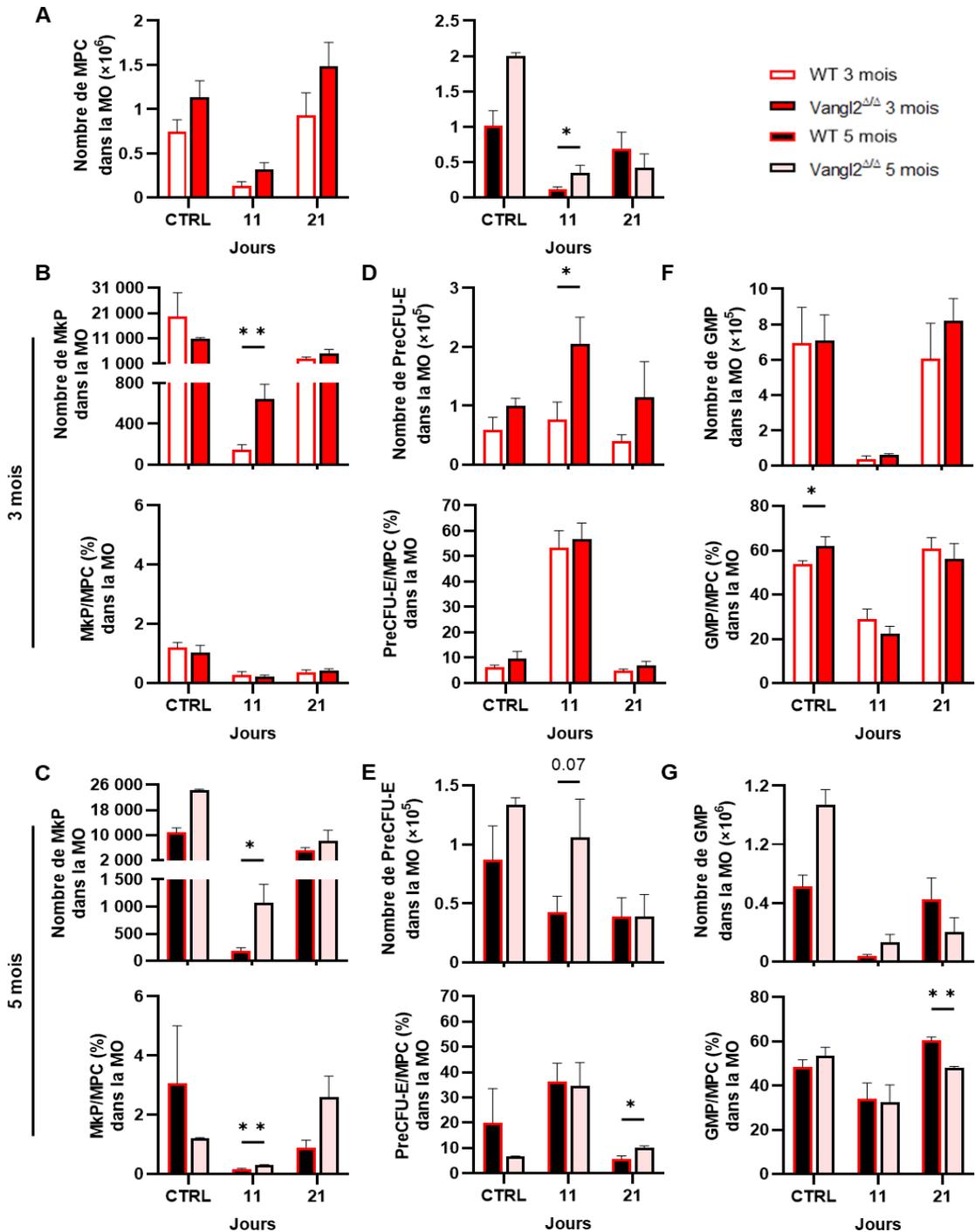


Figure 3.10 Variation des progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse

(A) Les histogrammes représentent le nombre de MPC dans la MO d'une patte de souris (tibia + fémur) à la suite de l'irradiation sous-létale. Les souris âgées de 3 mois sont représentées à gauche et les souris de 5 mois, à droite. Parmi ces progéniteurs, des histogrammes pour les Mkp, les PreCFU-E et les GMP ont été réalisés pour les souris âgées de 3 mois (B, D, F) et de 5 mois (C, E, G). CTRL = Contrôle pré-irradiation. L'histogramme supérieur du panneau (C) indique un résultat significatif à la suite du test non-paramétrique Kolmogorov-Smirnov. CTRL (n = 11 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 2 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois), Jour 11 (n = 7 WT 3 mois, n = 5 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois), Jour 21 (n = 8 WT 3 mois, n = 7 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois). Les données des souris de 3 mois proviennent d'au moins 3 expériences, celles de 5 mois proviennent d'au moins deux expériences.

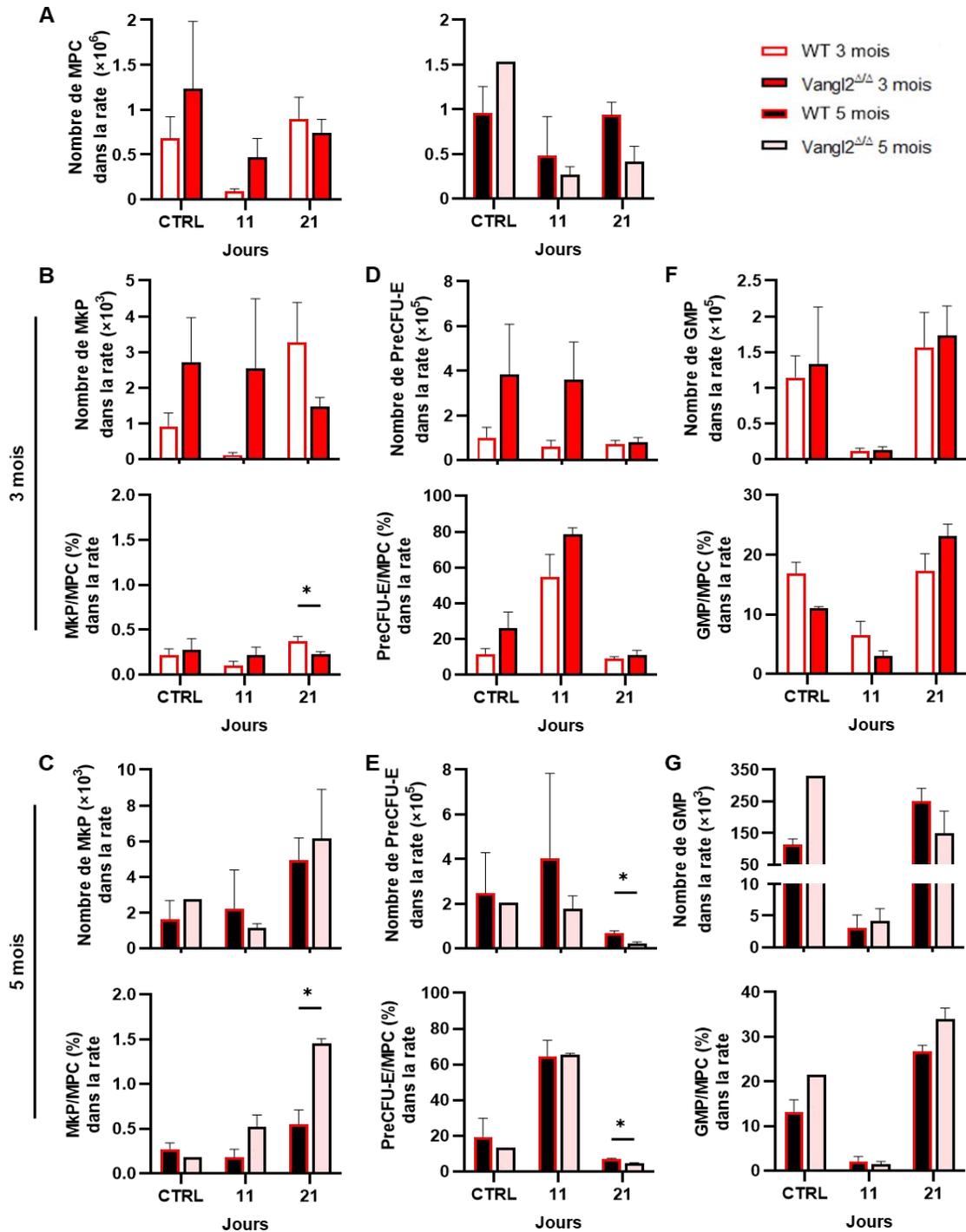


Figure 3.11 Variation des progéniteurs myéloïdes spléniques au jour 21

(A) Les histogrammes représentent le nombre de MPC dans la rate d'une souris à la suite de l'irradiation sous-létale. Les souris âgées de 3 mois sont représentées à gauche et les souris de 5 mois, à droite. Parmi ces progéniteurs, des histogrammes pour les MkP, les PreCFU-E et les GMP ont été réalisés pour les souris âgées de 3 mois (B, D, F) et pour les souris âgées de 5 mois (C, E, G). CTRL = Contrôles non-irradiés. Les histogrammes inférieurs des panneaux en (B-C) affichent un résultat significatif à la suite du test de Welch. CTRL (n = 10 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2* Δ/Δ 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 1 *Vangl2* Δ/Δ 5 mois), Jour 11 (n = 7 WT 3 mois, n = 8 *Vangl2* Δ/Δ 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2* Δ/Δ 5 mois), Jour 21 (n = 8 WT 3 mois, n = 7 *Vangl2* Δ/Δ 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2* Δ/Δ 5 mois). Les données des souris de 3 mois proviennent d'au moins 3 expériences, celles de 5 mois proviennent d'une (CTRL) ou deux expériences.

WT de 5 mois à l'état homéostatique (Figure 3.10 G). À la suite de l'irradiation, cependant, l'écart concernant le ratio GMP/MPC de la MO des souris de 3 mois disparaît (Figure 3.10 F). Pour ce qui est des souris de 5 mois, l'écart entre les *Vangl2^{ΔΔ}* et les WT concernant les GMP de la MO s'inverse. Alors que les GMP *Vangl2^{ΔΔ}* avaient tendance à être présents en plus grand nombre dans la MO des souris de 5 mois, leur nombre a tendance à être inférieur aux GMP WT 21 jours suivant l'irradiation. Plus encore, le ratio GMP/MPC est significativement réduit dans la MO des souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois 21 jours suivant l'irradiation (Figure 3.10 G), augmentant ainsi les ratios MkP/MPC et PreCFU-E/MPC au jour 21, bien que le nombre absolu de MkP et de PreCFU-E à ce moment soient similaires entre le souris WT et *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois (Figure 3.10 E, C). Pour ce qui est des GMP dans la rate, aucune différence n'est relevée entre les souris âgées de 3 mois et de 5 mois (Figure 3.11 F, G). L'ensemble de ces données indiquent que, dans la MO, il y a un biais pour la lignée érythro-mégacaryocytaires lors de la production de cellules myéloïdes *Vangl2^{ΔΔ}* lors des premiers jours suivant l'irradiation, permettant une rapide reprise hématopoïétique, mais que ce biais n'est pas maintenu dans le temps. Plus encore, il est absent des rates des souris *Vangl2^{ΔΔ}*.

3.4 RUNX1b n'est pas responsable de la dérégulation des HSPC *Vangl2^{ΔΔ}*

Par la suite, la variation de la quantité de MkP et de PreCFU-E nous a incité à définir le phénotype de leur progéniteur commun, les PreMegE. Cependant, il n'y avait aucune différence au niveau du nombre de PreMegE dans la MO et dans la rate à la suite de l'irradiation et ce, tous groupes d'âge confondus (Annexe I, Figure 12.1 A-C). Il a précédemment été décrit que les PreMegE qui expriment CD34⁺ à leur surface ont tendance à se différencier en MkP, alors que les PreMegE CD34⁻, plus haut dans la pyramide de différenciation, produisent des colonies érythro-mégacaryocytaires mixtes ou des colonies érythrocytaires *in vitro* (Draper *et al.*, 2016). Nous avons donc examiné l'expression de CD34 à leur surface par cytométrie en flux (Figure 3.12 A). Comme l'impact de VANGL2 semble jusqu'à présent âge-dépendant, nous avons utilisé des souris de 3 mois et de 8 mois, en espérant obtenir une variation claire. Contrairement à ce qui a été attendu, 11 jours après l'irradiation, il y a avait une réduction significative de la proportion de PreMegE *Vangl2^{ΔΔ}* spléniques positifs pour CD34 (Figure 3.12 B). Cette même tendance était également observée chez les PreMegE *Vangl2^{ΔΔ}* spléniques de 8 mois (Figure 3.12 C). Aucune différence statistiquement significative a été observée pour les PreMegE CD34⁺ dans la MO (Annexe I, Figure 12.1 D, E). L'augmentation des MkP *Vangl2^{ΔΔ}* observée au jour 11 ne provient donc pas d'un biais des PreMegE.

En utilisant *EPD The Eukaryotic Promotor Database*, nous avons récupéré les 1500 bp précédant le gène *Vangl2*, représentant la séquence potentielle du promoteur où les facteurs de transcription sont en mesure de se lier. En entrant cette séquence dans *Patch 1.0*, une base de données qui recherche des séquences modèles des sites de liaison des facteurs de transcription, la liste de

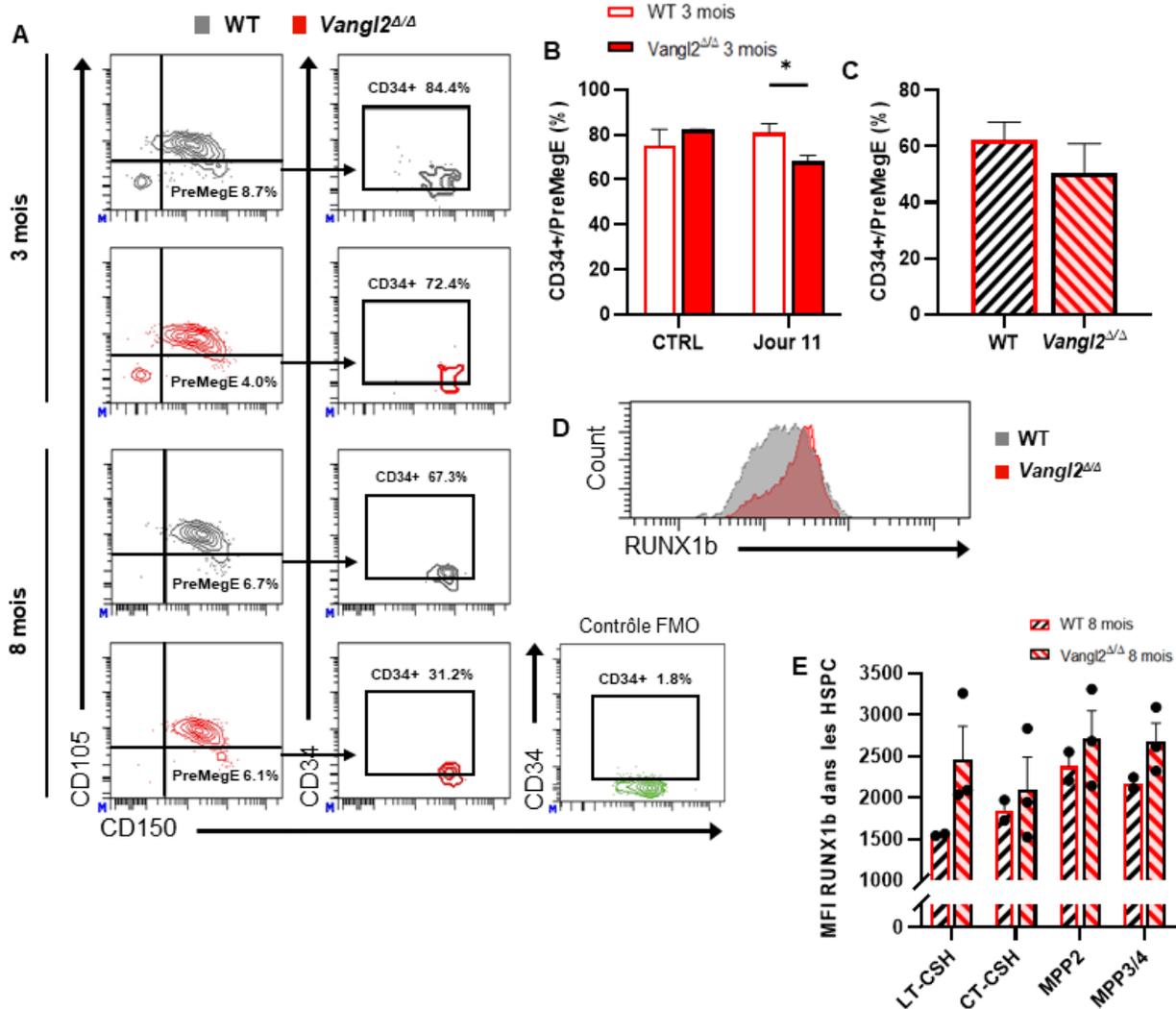


Figure 3.12 L'expression de RUNX1b est inchangée en absence de VANGL2

(A) Stratégie de sélection des PreMegE CD34+ dans la rate 11 jours après l'irradiation sous-létale. (B) L'histogramme représente le pourcentage de PreMegE qui sont positifs pour CD34 dans la rate des souris de 3 mois 11 jours après l'irradiation sous-létale. CTRL (n = 2 WT, n = 2 *Vangl2*^{Δ/Δ}), Jour 11 (n = 4 WT, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ}). Les données proviennent d'une seule expérience. (C) L'histogramme représente le pourcentage de PreMegE qui sont positifs pour CD34 dans la rate des souris de 8 mois 11 jours après l'irradiation sous-létale. (n = 2 WT, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ}). Les données proviennent d'une seule expérience. (D) Superposition d'histogrammes représentant l'expression de RUNX1b dans les LSK de souris WT et *Vangl2*^{Δ/Δ} de 8 mois 11 jours à la suite de l'irradiation sous-létale. Aucun contrôle FMO effectué. Les échantillons proviennent tous de la même expérience et ont été analysés au FACS la même journée. (E) L'histogramme représente le MFI de RUNX1b dans les HSPC de la MO de souris âgées de 8 mois irradiées 11 jours auparavant. Les données proviennent d'une seule expérience. CTRL = Contrôles non-irradiés. L'histogramme en (B) indique un résultat significatif à la suite d'un test de Welch.

facteurs de transcription obtenue contient AML-1. AML-1, pour *Acute myeloid lymphoma*, est également appelé RUNX1. Cette famille de facteurs de transcription est particulièrement importante pour les cellules hématopoïétiques (Behrens *et al.*, 2016; Challen & Goodell, 2010; Draper *et al.*, 2017; Draper *et al.*, 2016; Ichikawa *et al.*, 2008; Kocere *et al.*, 2023). Il a précédemment été démontré que l'expression de CD34 chez les PreMegE murines est associée à l'activité de RUNX1b (Draper *et al.*, 2016). Plus encore, RUNX1/AML-1 est un régulateur négatif de la quiescence des CSH (Ichikawa *et al.*, 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'en absence de VANGL2, RUNX1 s'accumule dans les HSPC, menant à leur suractivation qui éventuellement, mène ensuite à l'épuisement des CSH et au nombre réduit d'HSPC observé au jour 21 (Figure 3.3). Comme nous observons une modification de la proportion de PreMegE CD34+, nous nous sommes concentrés sur RUNX1b, dont l'expression du promoteur est associée à la prolifération des cellules progénitrices (Draper *et al.*, 2016). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons récolté les cellules de la MO de souris irradiées 11 jours auparavant afin de vérifier par cytométrie en flux s'il y avait une augmentation de l'expression de RUNX1b (Figure 3.12 D). Cependant, aucune différence statistiquement significative n'était visible dans les HSPC de souris âgées de 8 mois (Figure 3.12 E). RUNX1b n'est donc pas responsable pour l'augmentation du nombre de MkP *Vangl2^{ΔΔ}*.

3.5 Reconstitution partielle des populations de cellules matures chez les souris *Vangl2^{ΔΔ}* à la suite d'une irradiation sous-létale

Par la suite, afin de vérifier l'impact de VANGL2 à la suite d'un choc génotoxique sur la maturation des cellules progénitrices, les populations cellulaires myéloïdes (Figure 3.13) et lymphoïdes (Figure 3.14) ont été observées par cytométrie en flux, et ce, pour la MO et pour la rate. Lors d'une reconstitution de la MO, les cellules majoritairement produites sont des neutrophiles, vu leur courte durée de vie et sont ainsi considérés comme un indicateur de la reprise hématopoïétique (Pillay *et al.*, 2010). Nous avons donc observé les cellules GR1^{hi} dans la MO et dans la rate. Bien que non statistiquement significatif, il est possible de voir une tendance à la baisse des GR1^{hi} *Vangl2^{ΔΔ}* dans la MO pour les souris de 5 mois (Figure 3.15 B) et dans la rate pour les souris de 3 mois (Figure 3.15 A) 21 jours après l'irradiation sous-létale. Pour ce qui est des érythrocytes matures, aucune différence n'est observée chez les souris de 3 mois (Figure 3.15 C). Chez les souris de 5 mois, bien que non statistiquement significatif, il est tout de même possible de voir une tendance à avoir moins d'érythrocytes *Vangl2^{ΔΔ}* dans la MO au jour 21 (Figure 3.15 D). De manière similaire, aucune variation n'est visible entre les souris WT et *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois en ce qui concerne les plaquettes (Figure 3.15 E), mais leur nombre est significativement réduit dans la

MO des souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois 21 jours post-irradiation, avec une légère tendance similaire dans la rate (Figure 3.15 F). Pour ce qui est des lymphocytes, encore une fois, aucune différence statistiquement significative n'est observée dans leur nombre (Figure 3.15 G-J). Cependant, il est tout de même possible de voir que les souris de 3 mois tendent à avoir davantage de lymphocytes T dans leur rate au jour 21 (Figure 3.15 I). Inversement, les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois tendent à

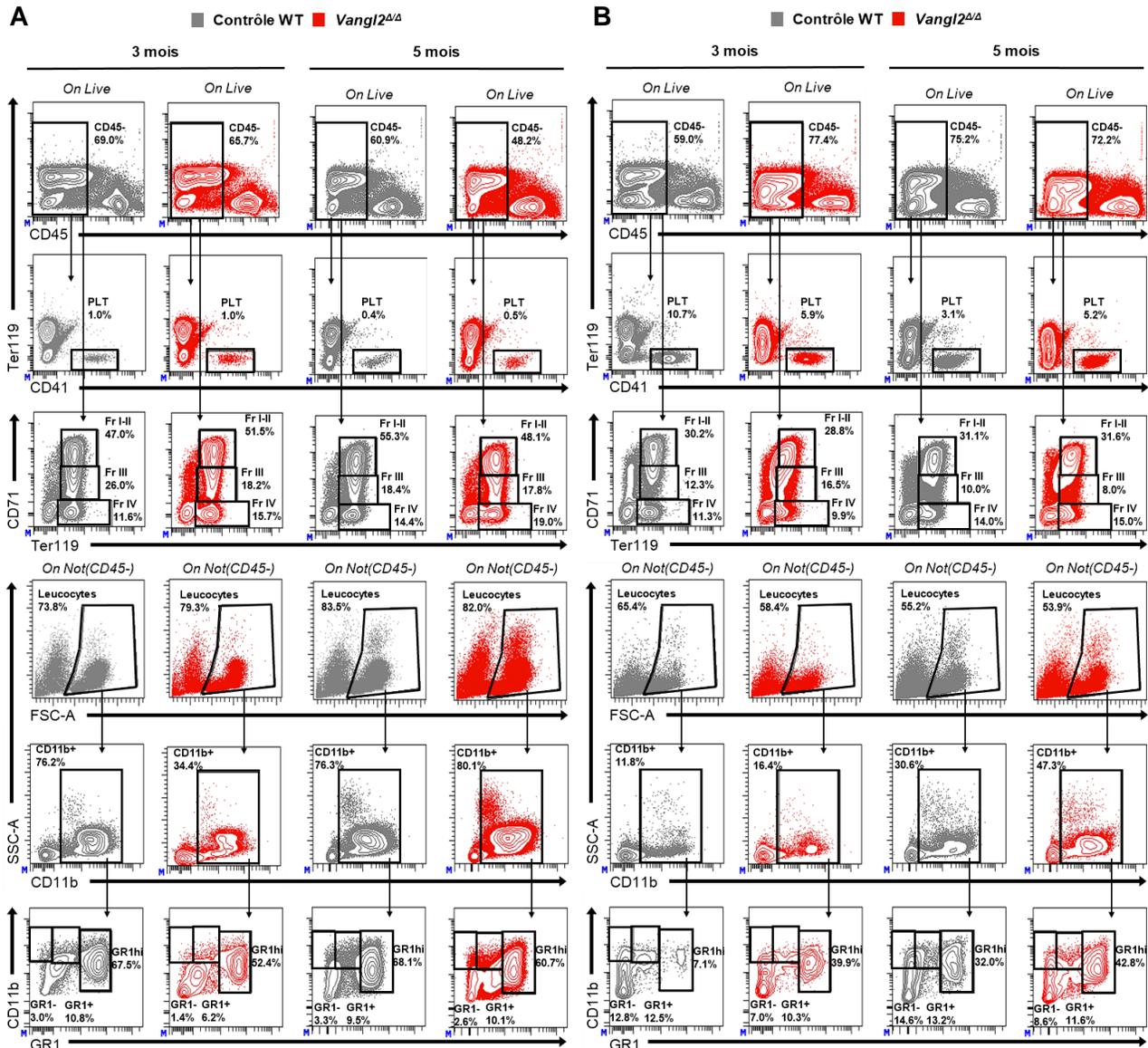


Figure 3.13 Stratégie de sélection des cellules matures myéloïdes

Représentation des populations cellulaires observées par cytométrie en flux de (A) la moelle osseuse et de (B) la rate 21 jours après l'irradiation sous-létale. Le côté gauche de chaque panneau représente les souris âgées de 3 mois et le côté droit, les souris âgées de 5 mois. PLT = plaquettes. Fr I-II = les deux premières fractions dans la maturation des érythrocytes. Fr III = la troisième fraction dans la maturation des érythrocytes. Fr IV = les érythrocytes matures.

avoir moins de lymphocytes B et T dans leur MO 21 jour suivant l'irradiation sous-létale (Figure 3.15 H, J). Plus encore, on remarque une transition significative dans le ratio CD4+/CD8+ des lymphocytes T chez les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois, mais pas chez les souris de 3 mois, au jour 21 tant dans la MO que dans la rate (Figure 3.15 K, L). Ainsi, après 21 jours, il semble y avoir une tendance générale vers la baisse des cellules matures dans la MO des souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois. Ensuite, nous avons analysé la reconstitution du sang périphérique. Afin de faciliter la lecture des histogrammes, les données pré-irradiation ont été séparées de celles suivant l'irradiation (Annexe I Figure 12.2). Aucune différence n'est observée dans les populations du sang périphérique avant l'irradiation, à l'exception des neutrophiles et des monocytes qui sont présents en plus grand nombre chez les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois que chez les WT du même âge (Annexe I Figure 12.2 C, D). 7 jours suivant l'irradiation, les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois ont significativement moins de leucocytes que les souris WT du même âge, mais cette variation ne se maintient pas dans le temps. Inversement, les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 3 mois ont plutôt tendance à avoir davantage de leucocytes aux jours 7 et 14 que les WT du même âge. Au jour 21, le nombre total de leucocytes est similaire entre les souris WT et *Vangl2^{Δ/Δ}* selon leur groupe d'âge respectif (Figure 3.16 A). En regardant les différentes populations leucocytaires, il est possible de voir des tendances qui se répètent. Au jour 11, les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 3 mois tendent à avoir moins de leucocytes myéloïdes et lymphoïdes que les souris WT, tendance qui devient significative en ce qui concerne les lymphocytes B. À l'inverse, au jour 11, les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois tendent plutôt à avoir davantage de leucocytes myéloïdes et lymphoïdes que les WT. Au jour 14, ces tendances s'inversent avant de se stabiliser au jour 21 (Figure 3.16 B-F). En ce qui concerne les érythrocytes, aucune variation significative n'est observable, bien qu'on puisse voir une légère tendance des souris *Vangl2^{Δ/Δ}* à en avoir un plus grand nombre que les WT du même âge au jour 14 (Figure 3.16 G). Cette même tendance est également visible avec les plaquettes. Plus encore, au jour 11, les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois ont significativement davantage de plaquettes que les WT (Figure 3.16 H), ce qui correspond à l'augmentation du nombre de MkP dans leur MO au même jour. Malgré tout, ceci demeure surprenant, étant donné la forte occurrence de thrombocytopenie à la suite d'une irradiation (Chen *et al.*, 2017). Au jour 21, les souris WT et *Vangl2^{Δ/Δ}* ont des quantités similaires d'érythrocytes et de plaquettes (Figure 3.16 G, H). En général, les données du jour 21 indiquent que la reconstitution du sang périphérique a pu être effectuée malgré l'absence de VANGL2.

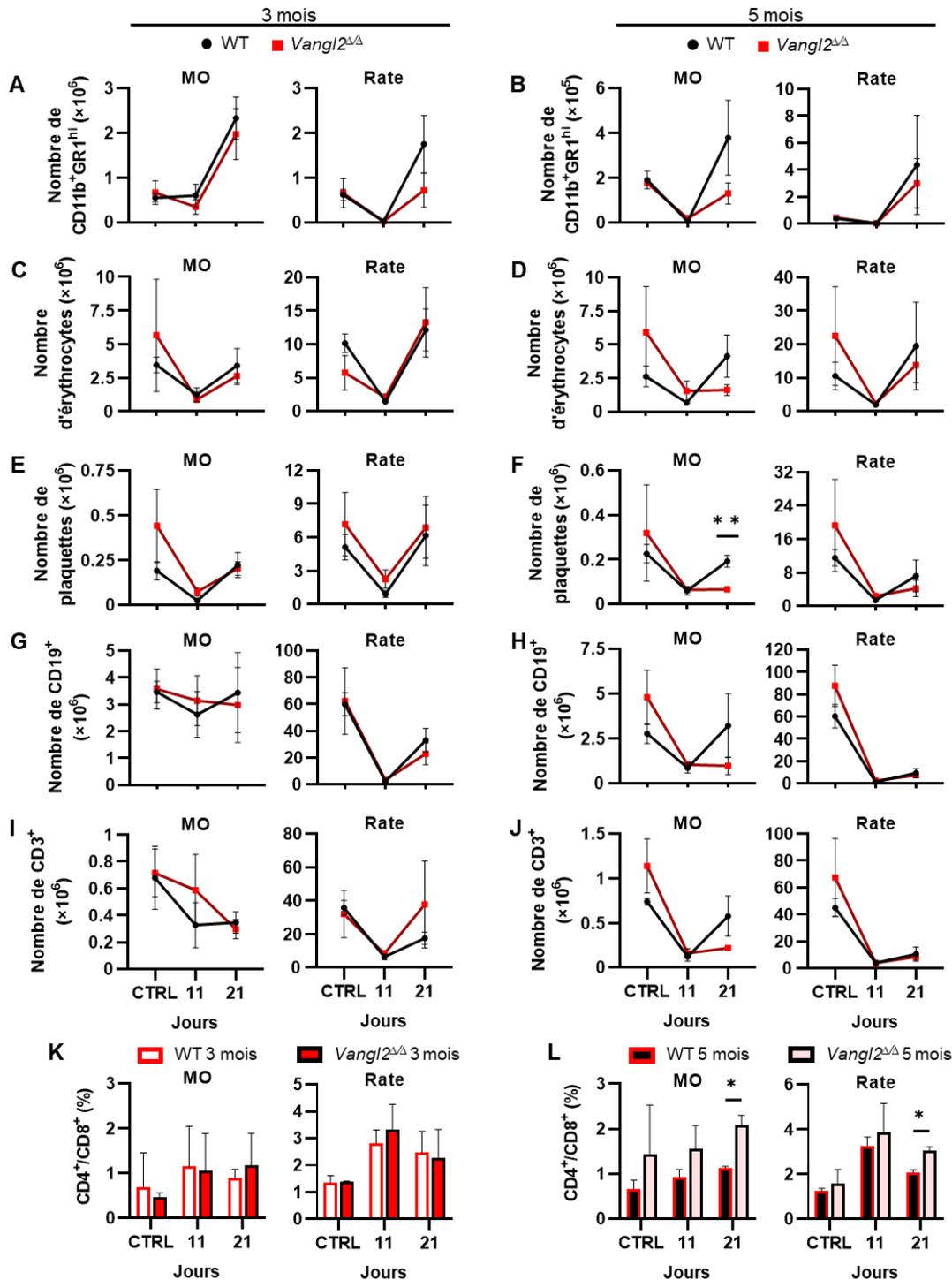


Figure 3.15 Rétablissement partiel des cellules matures dans la rate et la MO

Les histogrammes représentent les différentes cellules matures dans la MO (à gauche des panneaux) et dans la rate (à droite des panneaux) pour les souris de 3 mois (A, C, E, G, I) et de 5 mois (B, D, F, H, J). (A, B, G-L) MO CTRL (n = 8 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2*^{ΔΔ} 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 2 *Vangl2*^{ΔΔ} 5 mois), Jour 11 (n = 7 WT 3 mois, n = 6 *Vangl2*^{ΔΔ} 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{ΔΔ} 5 mois), 21 (n = 6 WT 3 mois, n = 4 *Vangl2*^{ΔΔ} 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{ΔΔ} 5 mois). (C, D) MO CTRL (n = 11 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2*^{ΔΔ} 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 2 *Vangl2*^{ΔΔ} 5 mois), Jour 11 (n = 9 WT 3 mois, n = 7 *Vangl2*^{ΔΔ} 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{ΔΔ} 5 mois), 21 (n = 9 WT 3 mois, n = 7 *Vangl2*^{ΔΔ} 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{ΔΔ} 5 mois). (A, B,

G-L) Rate CTRL (n = 10 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 2 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois), Jour 11 (n = 9 WT 3 mois, n = 8 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois), 21 (n = 8 WT 3 mois, n = 6 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois). (C, D) Rate CTRL (n = 10 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 2 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois), Jour 11 (n = 9 WT 3 mois, n = 8 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois), 21 (n = 7 WT 3 mois, n = 6 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois). Les données des souris de 3 mois proviennent d'au moins 3 expériences. Les données des souris de 5 mois proviennent d'une (CTRL & Jour 11) à deux (Jour 21) expériences. CTRL = Contrôle pré-irradiation.

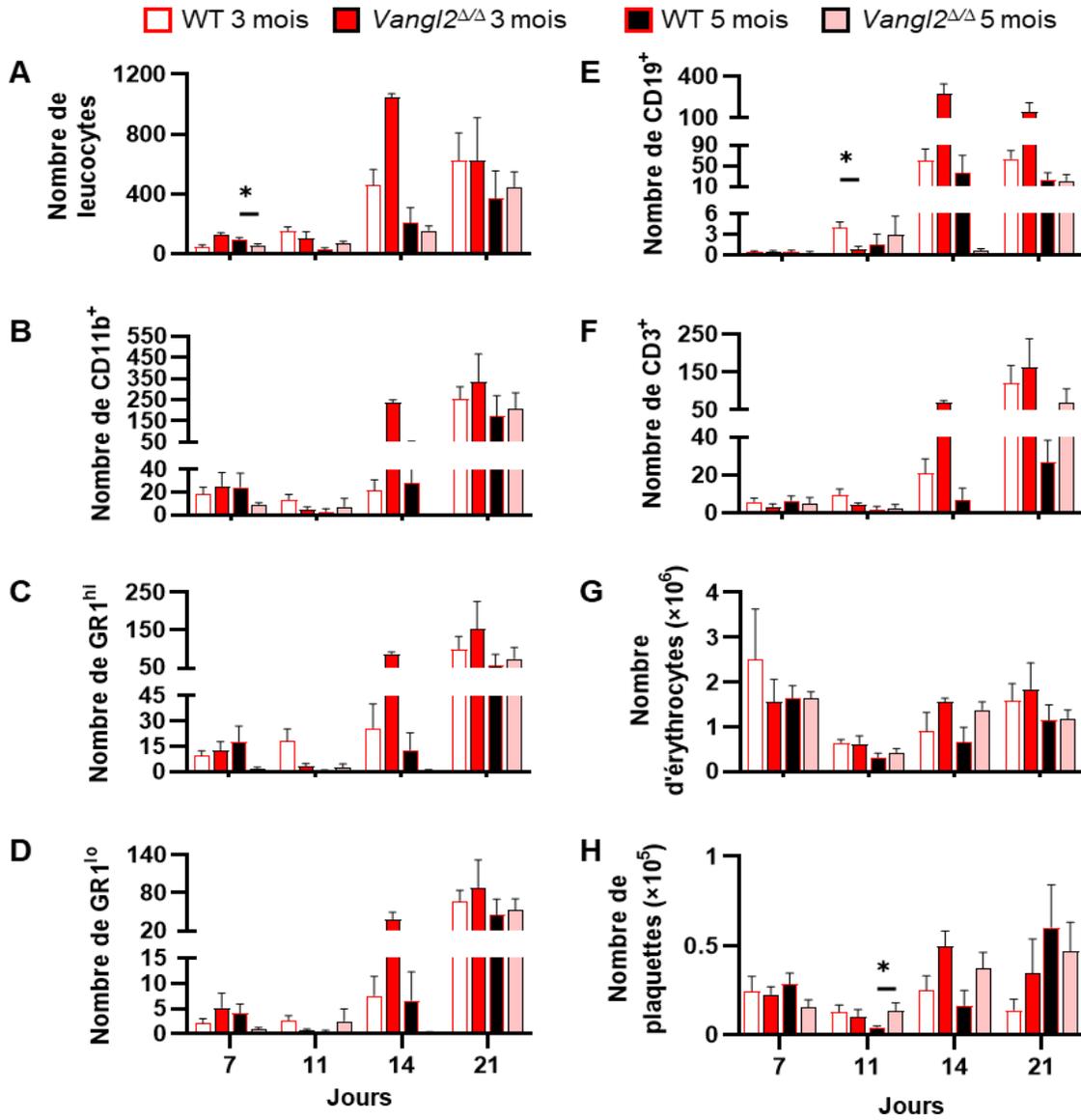


Figure 3.16 Reconstitution du sang périphérique

Les histogrammes représentent les différentes cellules matures dans le sang périphérique. Les données concernant les leucocytes (A-F) proviennent de 30 μ L de sang périphérique et celles concernant les érythrocytes et les plaquettes (G-H) représentent 1 μ L de sang périphérique. Tous les histogrammes de cette figure ont été sujets à un test de Mann-Whitney. Jour 7 (n = 6 WT 3 mois, n = 2 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 7 WT 5 mois, n = 6 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois), Jour 11 (n = 8 WT 3 mois, n = 4 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 5 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois), Jour 14 (n = 4 WT 3 mois, n = 2 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois), Jour 21 (n = 6 WT 3 mois, n = 6 *Vangl2^{Δ/Δ}* 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2^{Δ/Δ}* 5 mois). Les données des souris de 3 mois proviennent d'au moins 2 expériences (CTRL, Jours 11 et 21) ou d'au moins une (Jour 7 et 14). Les données des souris de 5 mois proviennent d'au moins 3 expériences (CTRL) ou d'au moins une (Jours 7, 11, 14 et 21).

4 DISCUSSION

Les voies de signalisation WNT impactent grandement les fonctions des CSH. La voie canonique de la β -caténine a très bien été décrite et est principalement connue pour son rôle dans la prolifération et l'activation des CSH (Luis *et al.*, 2012), alors que certains éléments des deux autres voies non-canoniques demeurent moins étudiés. C'est le cas de VANGL2 dans la voie WNT/PCP dans les cellules hématopoïétiques. Notre équipe est une des premières à se concentrer sur VANGL2 dans ces cellules. Pour se faire, nous utilisons un modèle murin *Vav-iCre-LoxP* qui permet d'inactiver sélectivement le gène *Vangl2* dans les cellules hématopoïétiques lors de l'hématopoïèse au foie fœtal (Georgiades *et al.*, 2002).

Les précédents travaux de notre laboratoire avaient démontré que l'effet de VANGL2 était âge-dépendant (Bouali *et al.*, 2022), c'est pourquoi nous avons encore une fois comparé les souris selon leur groupe d'âge. Ainsi, comme nous avons démontré que VANGL2 est essentiel pour les fonctions des CSH lors de greffes (Bouali *et al.*, 2022), nous avons encore une fois commencé par analyser l'effet de son absence sur les HSPC. Encore une fois, les effets que nous avons observés sont âge-dépendants. Effectivement, 11 jours suivant l'irradiation sous-létale, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois ont significativement davantage de cellules dans leur MO que les souris WT. Cette différence est absente chez les souris de 3 mois. Cette cellularité plus élevée pourrait s'expliquer par une résistance aux cellules *Vangl2^{ΔΔ}* à l'irradiation et donc à une meilleure survie à la suite d'un choc génotoxique. Cependant, lorsque nous observons les différentes populations cellulaires, cette hypothèse semble peu probable. Effectivement, non-seulement les différentes cellules matures sont présentes à une quantité similaire, ou inférieure dans le cas des plaquettes, chez les souris *Vangl2^{ΔΔ}* que chez les souris WT de 5 mois, la quantité de MPP2, MPP3 et LMPP au jour 11 sont également similaires entre les souris *Vangl2^{ΔΔ}* et les WT de 5 mois. Seules les quantités de LT-CSH et de MPC dans la MO sont plus élevées chez les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois que chez les WT. Ainsi, à moins que la protection face à l'irradiation qu'accorderait VANGL2 soit limitée à ces cellules, nous avons plutôt émis l'hypothèse que la hausse de LT-CSH *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois serait due à une suractivation des LT-CSH due à une perte de quiescence. Cette suractivation augmenterait leur prolifération, d'où leur nombre élevé. Cette hausse de la prolifération est observable ici sur les cultures cellulaires effectuées avec des prélèvements de MO de souris de 8 mois. Ces cultures cellulaires démontrent un nombre significativement plus élevé de cellules progénitrices CD117+ en plus d'avoir une augmentation du nombre de cellules matures. Plus encore, cette suractivation due à une perte de quiescence des LT-CSH mènerait

éventuellement à l'épuisement de ces cellules. Cet épuisement expliquerait alors cette réduction de HSPC observée au jour 21 chez les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois. Comme nos précédents travaux démontrent que les HSPC *Vangl2^{Δ/Δ}* ont tendance à accumuler le marqueur de sénescence p16^{INK4a} avec l'âge (Bouali *et al.*, 2022), cette hypothèse nous semble plus plausible qu'un effet protecteur accordé par VANGL2. Afin de confirmer cette hypothèse, une analyse du cycle cellulaire via Ki-67 et DAPI des HSPC *Vangl2^{Δ/Δ}* au jour 11 serait nécessaire étant donné qu'à l'état homéostatique, aucun changement dans le cycle cellulaire des HSPC n'est relevé (Bouali *et al.*, 2022). Le protocole de l'analyse du cycle cellulaire via Ki-67/DAPI est déjà connu par notre laboratoire (Bouali *et al.*, 2022), facilitant la réalisation de ce nouvel objectif de recherche.

Nous avons également observé l'effet de l'absence de VANGL2 dans les cellules hématopoïétiques sur la cellularité de la rate. La rate est un lieu secondaire où s'effectue l'hématopoïèse à un niveau bien plus faible, mais qui prend de l'ampleur en cas de dommages à la niche hématopoïétique de la MO causés par l'irradiation afin d'effectuer une hématopoïèse extra-médullaire d'urgence (Inra *et al.*, 2015; Oguro *et al.*, 2017). Après avoir analysé la cellularité des rates des souris de 3 mois et de 5 mois, nous avons remarqué que les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 3 mois ont significativement davantage de cellules spléniques selon la masse de leur rate comparativement aux WT. En essayant d'expliquer cette hausse, nous avons noté que les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 3 mois tendent à avoir davantage de MPC dans leur rate que les souris WT, bien que non-statistiquement significatif. Nous avons ensuite remarqué que les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* ont également plusieurs nodules sur leur rate comparativement aux souris WT, ce qui suggère une forte activité proliférative. Effectivement, en 1963, une première étude avait mentionné ces nodules spléniques à la suite d'injection de cellules de la moelle dans des rats irradiés. Ces nodules étaient rares et leur apparition était proportionnelle à la quantité de cellules injectées. Les auteurs ont donc suggéré que chaque nodule représente un amas de prolifération dont l'origine est une cellule souche (Till & McCulloch, 1961). Dans notre cas, aucune cellule souche n'a été injectée. Cependant, les amas pourraient potentiellement provenir de HSPC qui ont migré vers la rate à la suite de l'irradiation afin d'être en mesure de continuer l'hématopoïèse, ce qui expliquerait le plus grand nombre de MPC *Vangl2^{Δ/Δ}* dans les rates de souris. Il aurait été intéressant d'effectuer des coupes longitudinales sur ces rates afin d'observer en histologie les profils cellulaires de ces amas, dont le centre est fort probablement une MPP entourée de PreCFU-E ou de MkP. Jusqu'à présent, les recherches sur VANGL2 dans les cellules hématopoïétiques démontrent que cette protéine est essentielle pour plusieurs des fonctions des CSH, entre autres, pour leur quiescence et pour leur capacité d'auto-renouvellement (Bouali *et al.*, 2022). Une autre

fonction des CSH est également leur capacité de migration vers la rate, par exemple, en cas de dommage à la MO. Dans certains cancers du sein, une forte expression de VANGL2 est associée à la migration des métastases (VanderVorst *et al.*, 2022) (Partie II). Bien que dans le cadre de cette étude, VANGL2 est absent, il est reconnu qu'une surexpression d'un élément de la voie WNT/PCP mène souvent au même phénotype qu'en absence de ce même élément (Feng *et al.*, 2021; Hayes *et al.*, 2013). L'augmentation du nombre de cellules dans la rate des souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 3 mois pourrait peut-être être due à une plus forte migration des CSH de la MO vers la rate, se différenciant ensuite en MPC. Cette forte migration serait ainsi absente chez les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois, ce qui correspond encore une fois à une perte de fonctions des CSH en absence de *Vangl2* selon un modèle âge-dépendant. Nos données préliminaires à ce sujet semblent d'ailleurs concorder. 11 jours suivant l'irradiation, les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois ont un ratio CSH/LSK splénique significativement inférieur à celui des souris WT (Annexe I Figure 12.3), ce qui pourrait indiquer que les cellules ne sont pas en mesure de migrer à la rate afin d'effectuer une hématopoïèse d'urgence à la suite de la destruction de la MO. Cependant, afin de confirmer l'effet migratoire de VANGL2 sur les HSPC, nous proposons de regarder leur présence dans le sang périphérique à la suite de l'irradiation sous-létale afin de suivre leur migration de la MO vers la rate. Plus encore, nous voulons également vérifier la présence de MPP dans la rate.

Dans nos précédents travaux, nous n'avions pas évalué s'il y avait des changements sur les MPC en absence de VANGL2 à l'état homéostatique (Bouali *et al.*, 2022). Vu la quantité limitée de souris en notre possession, nous n'avons obtenu les données que de deux souris non-irradiées *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois pour les MPC de la MO et d'une seule pour les MPC de la rate. Aucun test statistique n'a donc été effectué pour ce groupe d'âge avant l'irradiation. Cependant, malgré tout, il est possible de voir une tendance à avoir un nombre total de MPC *Vangl2^{Δ/Δ}* plus élevé dans la MO des souris de 5 mois. Plus encore, le nombre de GMP semble avoir tendance à être plus élevé dans la MO et dans la rate des souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois que les WT. Nous avons l'intention de confirmer ceci en répétant l'expérience avec de nouvelles souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de ce groupe d'âge. Si les résultats s'avèrent statistiquement significatifs, cela corrèle avec le biais myéloïde âge-dépendant précédemment observé en absence de VANGL2 (Bouali *et al.*, 2022). Ce biais myéloïde, s'il est bel et bien présent à l'état homéostatique chez les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois, aurait pu expliquer la quantité plus élevée de MkP dans la MO au jour 11. Cependant, ce biais est âge-dépendant et pourtant, les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 3 mois ont également davantage de MkP dans leur MO et dans leur rate que les WT, nous avons donc tenté d'expliquer ce phénomène.

Notre première hypothèse à ce sujet est que le besoin accru de cellules myéloïdes, nécessaires à la reprise hématopoïétique à la suite de l'irradiation, amplifie ce biais qui devient alors visible malgré le jeune âge des souris. En essayant d'émettre une seconde hypothèse à ce sujet, nous nous sommes tournés vers les HSPC. Il n'y a pas de différence significative chez les MPP2 *Vangl2^{ΔΔ}* au jour 11 et ce, pour les deux groupes d'âge. Plus encore, lorsque nous nous sommes attardés aux PreMegE, cellules progénitrices provenant de la différenciation des MPP2, il y avait une réduction de la proportion de PreMegE CD34+. Une étude a précédemment démontré que les PreMegE CD34+ ont davantage tendance à produire des colonies mégacaryocytaires lors de leur mise en culture, alors que les PreMegE CD34-, des colonies érythrocytaires (Draper *et al.*, 2016). L'augmentation des MkP ne peut donc provenir des MPP2 à ce moment. Cette proportion réduite de PreMegE CD34+ expliquerait plutôt l'augmentation du nombre de PreCFU-E observée dans la MO et la rate des souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 3 mois et la MO des souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois. Les MPP2 au jour 11 se différencieraient donc principalement en PreCFU-E. Ainsi, nous proposons que l'augmentation de MkP *Vangl2^{ΔΔ}* au jour 11 serait due à la différenciation de LT-CSH CD41+ *Vangl2^{ΔΔ}*, qui sont en mesure de contourner la pyramide de différenciation. Les LT-CSH CD41+ ont précédemment été décrits comme une population grandissante dans une MO vieillissante (Gekas & Graf, 2013; Sanjuan-Pla *et al.*, 2013). Ces LT-CSH CD41+ *Vangl2^{ΔΔ}* pourraient être une autre cause de l'augmentation de LT-CSH observée chez les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois et le plus haut niveau de plaquettes dans le sang périphérique au jour 11 chez ces mêmes souris. Afin de confirmer ces deux hypothèses, il serait nécessaire d'observer la présence du marqueur CD41 sur ces cellules par cytométrie en flux.

Nous avons ensuite tenté de déterminer par quel mécanisme d'action VANGL2 impacte les HSPC. Plus précisément, nous avons tenté de déterminer comment l'absence de VANGL2 cause la perte de quiescence des LT-CSH. Nous avons commencé par déterminer quels seraient les potentiels facteurs de transcription de *Vangl2*. Bien que les facteurs de transcription de *VANGL2* chez l'humain soient bien décrits sur *GeneCards.org*, ceux pour l'équivalent murin le sont moins. Il est malgré tout possible de voir que AML-1A est un facteur de transcription connu de *VANGL2* sur *GeneCards.org*. Grâce à *EPD* et à *Patch 1.0*, nous avons établi que RUNX1/AML-1 est également un facteur de transcription potentiel de *Vangl2* murin. RUNX1 favorisant l'activation des CSH, nous avons émis l'hypothèse qu'il permet normalement de transcrire *Vangl2* qui régule ensuite négativement *Runx1*, permettant ainsi de garder un équilibre via une boucle de rétroaction. En absence de VANGL2, il y aurait donc une accumulation de RUNX1 ce qui provoquerait la suractivation des CSH. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de nous concentrer sur RUNX1b dans les HSPC vu la variation de CD34+ dans les PreMegE et car l'activation du

promoteur de RUNX1b est associée à la prolifération et la différenciation des progéniteurs actifs, malgré son absence chez les LT-CSH à l'état homéostatique (Draper *et al.*, 2016). Nous nous attendions donc à voir une hausse de l'expression de RUNX1b, soit dans l'ensemble des MPP, correspondant à la prolifération accentuée observée dans les cultures cellulaires et à l'augmentation des MPC observées *in vivo* aux jours 11, ou même à l'expression de RUNX1b dans la fraction des LT-CSH qui représenterait l'activation des potentiels LT-CSH CD41+ *Vangl2*^{ΔΔ} mentionnés précédemment. Cependant, aucune variation du MFI de RUNX1b n'a été observée chez les souris de 8 mois 11 jours suivant l'irradiation sous-létale. Nous avons donc l'intention de répéter l'expérience en observant plutôt le MFI de RUNX1c, le principal isoforme dans les CSH (Challen & Goodell, 2010; Draper *et al.*, 2016) avec des souris de 8 mois et de 3 mois afin de vérifier s'il y a un effet âge-dépendant. Il est également important de noter que comme aucun FMO n'a été réalisé pour l'expérience concernant RUNX1b, il est impossible de garantir que ce facteur de transcription n'a aucun impact sur les HSPC puisqu'il y a un risque de faux négatifs.

Enfin, nous avons examiné la reconstitution des populations des cellules hématopoïétiques matures dans la MO, dans la rate et dans le sang périphérique. 21 jours suivant l'irradiation, il n'y avait aucune différence observée dans les populations des cellules matures de la rate. Pour ce qui est du sang périphérique, 21 jours après l'irradiation, les populations cellulaires sont également similaires entre les souris *Vangl2*^{ΔΔ} et les souris WT. Cependant, il a précédemment été décrit que la reconstitution du sang périphérique à la suite d'une irradiation totale n'est pas un indicateur d'une reprise hématopoïétique complète et peut se produire malgré des dommages persistants à la niche hématopoïétique de la MO, menant à une réduction des réserves de HSPC (Shao *et al.*, 2014). Ainsi, il se peut que la tendance à la baisse observée dans la MO des souris *Vangl2*^{ΔΔ} de 5 mois soit un signe annonciateur de la sénescence ou de l'épuisement des HSPC, dont le premier signe, selon nos résultats, serait la réduction des plaquettes de la MO. La production plaquettaire des souris *Vangl2*^{ΔΔ} de 5 mois ne suit d'ailleurs pas la courbe attendue. Au jour 11, les souris *Vangl2*^{ΔΔ} avaient davantage de Mkp que les souris WT, et chez les souris *Vangl2*^{ΔΔ} de 5 mois, ceci se reflétait également par un niveau significativement plus élevé de plaquettes dans le sang périphérique au jour 11. Les jeunes souris *Vangl2*^{ΔΔ} ont, tant qu'à elles, une quantité similaire de plaquettes dans le sang périphérique que les souris WT au jour 11, malgré leur nombre plus élevé de Mkp. Au jour 21, alors que les niveaux de Mkp sont redevenus similaires entre les souris *Vangl2*^{ΔΔ} et les WT, il est alors possible de voir que les souris *Vangl2*^{ΔΔ} de 5 mois ont significativement moins de plaquettes dans leur MO que les WT. Cette variation chez les souris *Vangl2*^{ΔΔ} de 5 mois est à l'opposé de ce qui avait été observé précédemment

chez des rats. À la suite d'une irradiation de 2 Gy, les rats irradiés avaient plutôt montré un pic de réduction du nombre de plaquettes au jour 10 et un pic d'augmentation au jour 20. Ces pics étaient proportionnels à ceux des mégacaryocytes (Tanum, 1984). Bien que cette étude ne se réfère qu'aux plaquettes dans le sang périphérique, il n'en demeure pas moins surprenant que les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois de notre étude aient une forte réduction du nombre de plaquettes dans leur MO au jour 21. Comme notre étude ne s'est pas poursuivie au-delà de 21 jours, il est impossible de savoir si éventuellement le nombre de plaquettes dans le sang périphérique serait lui aussi réduit comme dans la MO. Effectivement, comme nous avons proposé que les MkP *Vangl2^{ΔΔ}* produits au jour 11 proviendraient de LT-CSH CD41+ *Vangl2^{ΔΔ}*, la réduction du nombre de LT-CSH *Vangl2^{ΔΔ}* au jour 21 chez les souris de 5 mois pourraient expliquer ainsi le nombre réduit de plaquettes. Il a précédemment été observé que les embryons de poisson-zèbres dont l'expression de *vangl2* ou de *wnt5b* a été atténuée ont un nombre réduit de plaquettes CD41+ (Kocere *et al.*, 2023). Une autre étude sur des souris a démontré qu'en rendant *Runx1* null, les PreMegE ont une différenciation en MkP augmentée, mais que la maturation mégacaryocytaire est altérée et produit des mégacaryocytes à faible ploïdie, réduisant ainsi la production de plaquettes (Behrens *et al.*, 2016). Une autre étude a démontré qu'en remplaçant la séquence spécifique de *Runx1c* par celle de *Runx1b*, les PreMegE ont une différenciation en MkP altérée, bien que la maturation des mégacaryocytes et des plaquettes par la suite soit normale (Draper *et al.*, 2017). De manière similaire, il se peut que les PreMegE *Vangl2^{ΔΔ}* se différencient en MkP dont la maturation en mégacaryocytes est altérée, réduisant le nombre de plaquettes. Au jour 11, comme nous proposons que les MkP *Vangl2^{ΔΔ}* produits à ce moment proviendraient de LT-CSH CD41+ *Vangl2^{ΔΔ}*, la réduction de plaquettes due à une maturation altérée de mégacaryocytes aurait pu être compensée par ce biais des LT-CSH CD41+ *Vangl2^{ΔΔ}*. Au jour 21, cependant, les souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois tendent à avoir une quantité réduite de LT-CSH. Ainsi, s'il y a bien une compensation effectuée par les LT-CSH CD41+ *Vangl2^{ΔΔ}* au jour 11, ce ne serait plus le cas au jour 21, expliquant alors la réduction de plaquettes dans la MO, mais une quantité similaire de MkP entre les souris WT et *Vangl2^{ΔΔ}*. Un plus long suivi des souris irradiées et une analyse de la ploïdie des mégacaryocytes à la suite de l'irradiation sous-létale seront nécessaires afin de confirmer ces hypothèses. Afin de suivre la polyploïdisation des mégacaryocytes, nous proposons de les mettre en culture et de suivre leur maturation par vidéo-confocal (Lordier *et al.*, 2008) ou par l'utilisation de la trousse BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit de BD Bioscience qui permet l'observation de la ploïdie des cellules par cytométrie en flux (Mattia *et al.*, 2002).

Nous avons également remarqué une transition dans le ratio CD4+/CD8+ des lymphocytes T CD3+ en faveur des lymphocytes T CD4+ dans la rate et la MO des souris *Vangl2^{ΔΔ}* de 5 mois.

La lymphopénie est fréquente à la suite d'une irradiation (Paganetti, 2023) et requiert la production de nouveaux lymphocytes. Lors de la maturation des thymocytes dans le thymus, les cellules dendritiques jouent un rôle essentiel lors de la sélection négative, particulièrement pour les thymocytes simple-positifs (SP) CD4+, alors que leur rôle est moins bien compris pour thymocytes SP CD8+ (Oh & Shin, 2015). Les cellules dendritiques expriment également très fortement VANGL2 (Choi *et al.*, 2019). Ainsi, il se peut que les cellules dendritiques *Vangl2*^{Δ/Δ} aient impacté la maturation des thymocytes. Cependant, comme nous n'avons pas prélevé le thymus des souris, nous ne pouvons affirmer que cela provient d'un biais lors de la production et la maturation des lymphocytes T SP. Plus encore, la maturation des thymocytes s'effectue sur une période de 21 jours et, à la suite de l'irradiation, requiert également la réparation et la reconstitution fonctionnelle de l'organe. Il se peut donc que les variations observées soient dues à une prolifération homéostatique en situation de lymphopénie (Unsinger *et al.*, 2009). Malgré tout, ceci constitue une perspective d'étude intéressante.

5 CONCLUSION

Pour conclure, ce projet de maitrise avait pour but de déterminer quel est le rôle de VANGL2 murin lors de la reprise hématopoïétique à la suite d'une irradiation sous-létale et son mécanisme d'action. Nous avons démontré l'importance de VANGL2 selon l'âge des souris afin de permettre une récupération à long-terme de l'hématopoïèse. Effectivement, en absence de VANGL2, nous avons observé ce qui semble être une dérégulation de la prolifération des LT-CSH *Vangl2^{Δ/Δ}* adultes ce qui mène éventuellement à la perte des réserves de HSPC *Vangl2^{Δ/Δ}* adultes. Nos recherches viennent donc encore une fois souligner l'importance de VANGL2 murin sur le long-terme dans les cellules hématopoïétiques (Bouali *et al.*, 2022).

La première indication du dérèglement des LT-CSH fut leur nombre plus élevé 11 jours suivant l'irradiation chez les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois. Nous avons également observé une augmentation du nombre de cellules *Vangl2^{Δ/Δ}* par colonie lors des cultures *in vitro* des prélèvements de moelle osseuse, particulièrement pour les cultures provenant de souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 8 mois. De plus, des nodules sont présents en plus grande quantité sur les rates de souris *Vangl2^{Δ/Δ}*, en plus d'une tendance vers la splénomégalie chez les jeunes souris *Vangl2^{Δ/Δ}* post-irradiation. Ces mêmes jeunes souris avaient d'ailleurs tendance à avoir davantage de MPC 11 jours après l'irradiation sous-létale. L'ensemble de ces données solidifie l'hypothèse que les LT-CSH ont un dérèglement de leur prolifération à la suite de l'irradiation qui a le potentiel de permettre une reprise accrue de l'hématopoïèse à la suite de la destruction de la moelle osseuse. Effectivement, nous avons également observé une augmentation significative des MkP *Vangl2^{Δ/Δ}* dans la moelle des souris de 3 mois et de 5 mois, tout comme un nombre plus élevé de plaquettes dans le sang périphérique des souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois 11 jours après l'irradiation. La présence de plaquettes à la suite d'une irradiation totale du corps est un facteur clé indiquant la reprise hématopoïétique (Stickney *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données semblent indiquer que l'absence de VANGL2 promeut une reprise plus rapide de l'hématopoïèse, bien qu'il reste encore des expériences à effectuer afin de le confirmer.

Cette reprise accrue de l'hématopoïèse engendre cependant une perte de la réserve des HSPC *Vangl2^{Δ/Δ}* de manière âge-dépendante. Alors que les HSPC des jeunes souris *Vangl2^{Δ/Δ}* demeurent à un niveau similaire à celui des souris WT 21 jours post-irradiation, il est possible de voir une forte réduction du nombre de CT-CSH, de MPP2, de MPP3 et de LMPP, le tout également représenté par une réduction significative de LSK, chez les souris *Vangl2^{Δ/Δ}* de 5 mois. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'absence de VANGL2 à long-terme après un choc génotoxique

mène à la suractivation des LT-CSH due à une perte de leur quiescence et éventuellement à leur épuisement. Nous avons donc par la suite tenté de déterminer quel était le mécanisme qui permet à VANGL2 de réguler la reprise hématopoïétique. Ceci nous a mener à regarder l'expression de RUNX1b dans les HSPC. Bien que nos résultats ne soient pas concluants, nous avons d'autres hypothèses concernant les potentiels mécanismes d'action de VANGL2 et les protocoles qui y sont associés sont en cours d'élaboration.

Finalement, notre recherche offre de nouvelles connaissances sur la différenciation des HSPC lors de stress aigus et ouvre la voie à plusieurs nouvelles études sur cette protéine clé de la voie WNT/PCP dans les cellules hématopoïétiques. Ces études ont le potentiel de mener à des avancées cliniques quant à la reprise de l'hématopoïèse en cas de dommages à la moelle osseuse.

PARTIE II
ÉTUDE DU COMPLEXE CELSR2-VANGL2 DANS LES
CANCERS DU SEIN TRIPLE NÉGATIFS



Université Clermont-Auvergne (UCA)

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

Master en Ingénierie de la santé profil Diagnostic biomédical de l'Université Clermont Auvergne

ÉTUDE DU COMPLEXE CELSR2- VANGL2 DANS LES CANCERS DU SEIN TRIPLE NÉGATIFS

Responsable de stage :

Alexandra WALTON

Lieu du stage :

Centre de recherche cancérologie de Marseille
(CRCM)

Présenté par :

Roxanne A. GAUTHIER

6 INTRODUCTION

La voie de signalisation WNT est impliquée dans les processus de développement embryonnaire et est souvent également impliquée dans la progression et la dissémination de cancers lorsque cette dernière est réactivée (Hatakeyama *et al.*, 2014; Martin-Orozco *et al.*, 2019; Zhan *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020). La signalisation WNT se divise en trois voies principales : une canonique (WNT/ β -caténine) qui inhibe la dégradation de la β -caténine dans la cellule dont l'accumulation dans le noyau permet l'activation de facteurs de transcription (Staal *et al.*, 2016), et deux non-canoniques (WNT/Ca²⁺ et WNT/PCP).

La voie de signalisation non-canonique WNT/PCP permet une polarisation planaire des cellules (PCP). Cette voie permet une coordination entre les cellules d'un même tissu afin d'obtenir une orientation de leur cytosquelette et participe à la morphogenèse tridimensionnelle (Gao *et al.*, 2011; Montcouquiol *et al.*, 2003; Yang & Mlodzik, 2015). Cette réorganisation du cytosquelette nécessite généralement l'activation de petites protéines G monomériques de la famille RHO (RHOA et RAC1) et de la protéine c-Jun N-terminale kinase (JNK)(Gao *et al.*, 2011; Yang & Mlodzik, 2015).

La voie WNT/PCP peut être activée via plusieurs récepteurs dont Frizzled (FZD), qui est également impliqué dans les autres voies WNT. L'activation par phosphorylation des récepteurs à tyrosine kinase ROR et/ou RYK, à la suite de la fixation d'un ligand WNT peut également mener à l'activation de la voie WNT/PCP de manière indépendante de FZD (Gao *et al.*, 2011; Macheda *et al.*, 2012). Il existe également d'autres récepteurs de la voie WNT/PCP : les récepteurs paralogues VANGL1 et VANGL2, les cadhérines FAT- DACHSOUS, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) hétérotrimériques CELSR1, CELSR2 et CELSR3 et le récepteur à tyrosine kinase PTK7 (Aviles *et al.*, 2013) (Figure 6.1A). L'expression de VANGL1 et VANGL2 dès les premiers stades de l'embryogenèse et la conservation de leur organisation moléculaire et fonctionnelle de la mouche à l'homme attestent de l'importance capitale de ces récepteurs en physiologie (Hatakeyama *et al.*, 2014). En effet, des mutations de *VANGL1* mènent à une anomalie de la fermeture du tube neural (Reynolds *et al.*, 2010) et en cas de mutation de *VANGL2*, l'embryon n'est pas viable (Lei *et al.*, 2010).

Les récepteurs VANGL1/2 sont souvent surexprimés dans différents cancers de mauvais pronostic associés à de hauts taux de rechute (Hatakeyama *et al.*, 2014; VanderVorst *et al.*, 2022), dont certains cancers mammaires. En effet, le récepteur VANGL1 est associé à une espérance de survie globale réduite lorsqu'il est surexprimé dans les cancers du sein positifs pour le

récepteur de l'estrogène (Hatakeyama *et al.*, 2014). Pour ce qui est du récepteur VANGL2, en plus d'être associé à la dissémination des métastases (VanderVorst *et al.*, 2022), il est surexprimé dans le cancer du sein triple négatif (TNBC) qui est le sous-type le plus agressif (Foidart *et al.*, 2019). Le TNBC est caractérisé par l'absence d'expression du récepteur hormonal de l'estrogène (ER), du récepteur de la progestérone (PR) et du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) (Foidart *et al.*, 2019). Ces récepteurs sont les principales cibles des thérapies ciblées (Foidart *et al.*, 2019). Leur absence dans le TNBC explique pourquoi le traitement principal pour cette maladie est actuellement la chimiothérapie standard. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour ce sous-type de cancer difficile à traiter. VANGL2 pourrait être une cible thérapeutique potentielle. Cependant, la connaissance de son mode d'action reste encore superficielle et une meilleure compréhension est donc essentielle tant du point de vue fondamental que du point de vue médical pour développer de nouvelles approches thérapeutiques. VANGL2 est un récepteur de la voie WNT/PCP à quatre régions transmembranaires avec deux boucles extracellulaires et deux régions intracellulaires (Figure 6.1A). Le ciblage thérapeutique de VANGL2 est pour le moins un véritable défi compte tenu de l'inaccessibilité de ses boucles extracellulaires à des anticorps (Walton, 2019) et de l'absence d'activité enzymatique (Hatakeyama *et al.*, 2014). Ainsi, il serait plus judicieux de viser un co-récepteur davantage accessible afin d'inhiber VANGL2 indirectement. Il est donc nécessaire de poursuivre l'étude moléculaire de VANGL2, en particulier d'identifier ses co-récepteurs afin de mieux comprendre son mode d'activation et de signalisation et d'évaluer si le ciblage de certains d'entre eux peut être une alternative à celui de VANGL2 dans le traitement des cancers du sein résistants aux thérapies standards. Grâce à l'utilisation de la technologie GFP-Trap (immunocapture de GFP-VANGL2 grâce à un nanobody anti-GFP) et à l'expertise de la plateforme de protéomique du CRCM, l'équipe du Pr. Borg a co-purifié CELSR2 avec VANGL2 dans des cellules épithéliales murines (Tableau 6.1, données non publiées de l'équipe), laissant penser que cela pourrait également être le cas dans les TNBC. Cette interaction est d'ailleurs déjà connue chez la *Drosophila*, chez qui CELSR2 porte le nom de flamingo (*fmi*) (Figure 6.1B) et a été décrite dans des cellules de la lignée HEK293T (Anastas *et al.*, 2012). CELSR2 est un récepteur appartenant à la famille des RCPG d'adhésion, famille de récepteurs présentant un rôle primordial dans l'adhésion cellulaire et les contacts cellule-cellule (Wang *et al.*, 2014). Cette famille possède sept régions transmembranaires classiques aux RCPG et une très large région N-terminale extracellulaire qui comprend des motifs d'adhésion et un site protéolytique (Wang *et al.*, 2014) qui pourrait être impliqué dans l'activation du récepteur (Figure 6.1C).

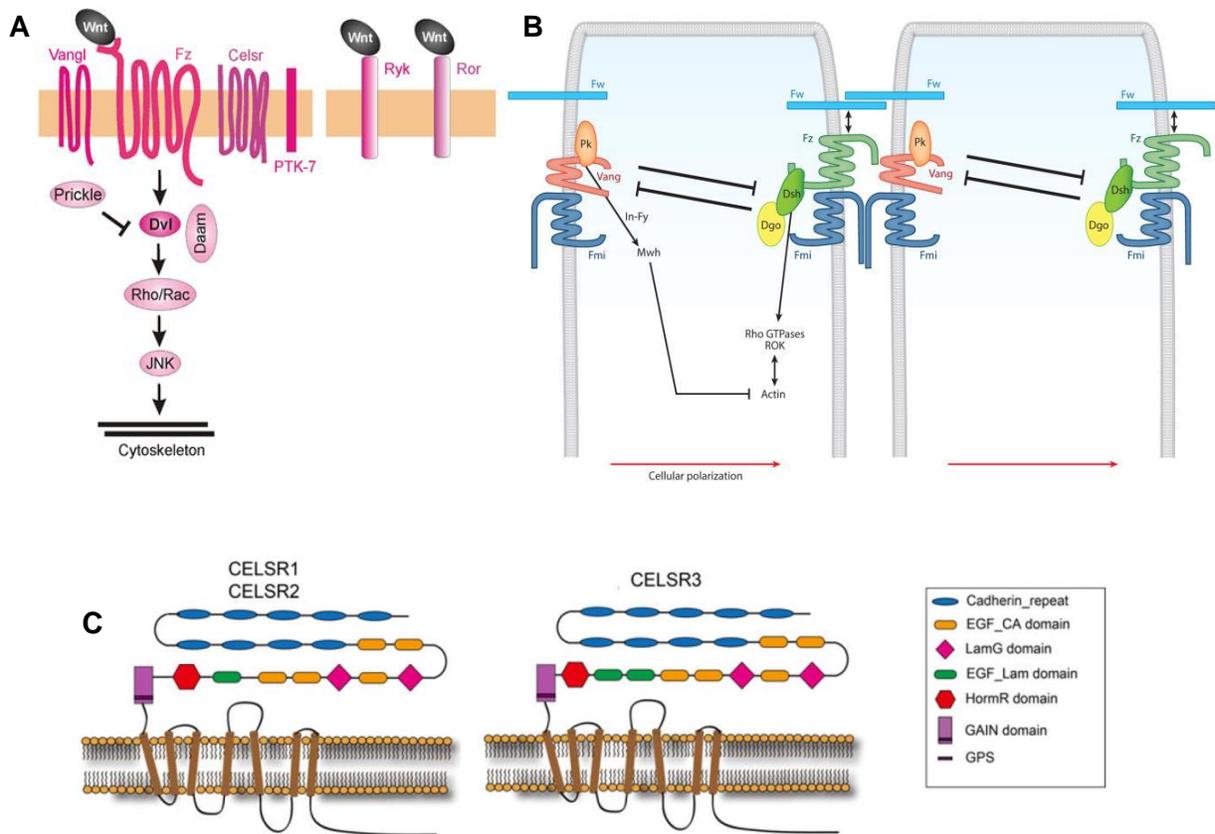


Figure 6.1 Organisation de la voie Wnt/PCP

(A) Les principaux récepteurs de la voie WNT/PCP et la cascade de signalisation qui s'en suit. Adaptée de (Aviles *et al.*, 2013). (B). Interaction des récepteurs de la voie Wnt/PCP chez la drosophile. Adaptée de (Yang & Mlodzik, 2015). (C). Organisation des RCPG atypiques CELSR1-3. Adaptée de (Wang *et al.*, 2014)

Tableau 6.1 Analyse par spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées avec GFP-VANGL2 par GFP-Trap et identifiées comme interacteur connu (VANGL1) et nouveau (CELSR2)

Gènes	Peptides	Couverture	Score
<i>Vangl1</i>	13	36,1	131,02
<i>Celsr2</i>	4	1,7	6,6974

Les connaissances actuelles sur l'expression, la fonction et la signalisation en aval de CELSR2, et de beaucoup de RCPG atypiques, en physiologie et dans les tumeurs malignes humaines sont plutôt limitées. Cependant, une analyse transcriptomique sur une large cohorte de patientes de l'Institut Paoli- Calmettes (IPC) atteintes de cancer du sein et de données publiques a montré une corrélation positive entre l'expression de VANGL2 et de CELSR2. Cette analyse a également

montré l'association entre la surexpression de CELSR2 dans les TNBC et une diminution de la survie sans métastases, avec un effet synergique de VANGL2 (données non publiées de l'équipe, collaboration avec P. Finetti et F. Bertucci, équipe « Oncologie Prédictive » CRCM). CELSR2 et ses autres paralogues sont exprimés à de forts niveaux dans certaines lignées cellulaires cancéreuses mammaires, au même titre que les protéines VANGLs (Tableau 6.2) (DepMap). De plus, les médicaments visant les RCPG, comme CELSR2, représentent le tiers du marché pharmaceutique (Esteouille *et al.*, 2020) et considérant la large région extracellulaire, CELSR2 pourrait être une cible prometteuse pour inhiber indirectement l'action de VANGL2.

Tableau 6.2 Expression de l'ARNm évaluée par DepMap pour VANGLs et CELSRs dans les lignées de cancers mammaires étudiées (DepMap)

Lignées cellulaires	Expression ARNm				
	CELSR1	CELSR2	CELSR3	VANGL1	VANGL2
SUM149	2,76	2,70	2,56	1,57	1,65
MCF7	5,05	6,76	2,13	3,65	0,07

Faible  Élevée

6.1 Objectifs et hypothèse

L'objectif de l'équipe est d'évaluer si le ciblage de récepteurs membranaires partenaires de VANGL2 représente une stratégie thérapeutique prometteuse dans le traitement des cancers du sein résistants aux thérapies standards. Plus précisément, l'objectif de ce stage a principalement consisté à débiter la caractérisation de CELSR2 en termes d'expression et de fonction dans le TNBC, de façon dépendante ou indépendante de VANGL2. Pour se faire, différents objectifs du projet ont été établis :

1. Valider les outils qui permettront d'étudier l'interaction dans la cancérogénèse mammaire
2. Étudier la localisation de CELSR2
3. Étudier l'expression de CELSR2 dans différentes lignées cancéreuses mammaires et l'influence de l'expression de CELSR2 sur VANGL1/2 et inversement
4. Étudier l'impact de sa perte d'expression sur la formation des jonctions adhérentes

7 MATÉRIEL ET MÉTHODE

7.1 Cultures cellulaires

7.1.1 MCF7 et HEK293T

Les cellules ont été cultivées dans du DMEMF-12(Gibco Life technologies®) supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco Life technologies®), 1% de pénicilline-streptomycine, 10µg/mL insuline et incubées à 37°C avec 5% de CO₂.

7.1.2 SUM149

Les cellules ont été cultivées dans du MHAMF12 (50 % DMEM, 50 % Ham's F12) (Gibco Life technologies®) supplémenté avec 5% de SVF décomplémenté (Gibco Life technologies®), 1% de pénicilline-streptomycine, 10µg/mL insuline, 1µg/mL d'hydrocortisone, 1% d'acide aminés non-essentiels et incubées à 37°C avec 5% de CO₂.

7.2 Transfection

Lors des transfections d'ARN interférents (siARN), les cellules ont été transfectées en utilisant le réactif Lipofectamine RNAiMAX Transfection (Thermo Fisher #13778075) selon les instructions du fabricant. Les transfections de plasmides dans les HEK2937 ont été réalisées en utilisant 1 µg/ul de polyéthylèneimine (PEI) à un ratio de plasmide:PEI = 1:3. Les transfections des plasmides dans les SUM149 et MCF7 ont été réalisées en utilisant le réactif Lipofectamine LTX and plus™(Thermo Fisher #15338-100) selon les instructions du fabricant. Les cellules ont été récoltées 48h après les transfections. Les plasmides Celsr1-GFP et Celsr2-GFP ont été fournis par l'équipe de D.Devenport, Princeton, USA.

7.3 Microscopie d'immunofluorescence

Pour l'immunofluorescence, les cellules ont poussé dans une plaque 6 puits contenant préalablement une lamelle. Les cellules ont été transfectées le cas échéant avant la fixation.

Les cellules ont été préalablement rincées deux fois avec du PBS 1x froid, puis fixées avec 4% de paraformaldéhyde/PBS (PFA) pendant 15 minutes à température ambiante. Trois rinçages au PBS 1x ont ensuite été effectués. Le cas échéant, les cellules ont été perméabilisées avec 0,4% Triton - PBS 1x pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation. Trois rinçages au PBS 1x ont été effectués, puis elles ont été bloquées avec du 3% BSA - PBS 1x à température

ambiante pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires aux concentrations appropriées à 4° pendant une nuit. L'anticorps anti-VANGL2 a été conçu dans notre laboratoire. Après trois rinçages de 5 minutes avec du PBS-Tween 0,01%, les anticorps secondaires ont été ajoutés à des concentrations de 1/2000. Les lamelles ont ensuite été montées sur les lames avec la solution de montage Prolong™ Gold antifade reagent with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; 300 nM; Thermo Fisher Scientific, #2409252). Les lames ont ensuite été laissées à l'abri de la lumière à température ambiante une nuit complète avant d'être observées au microscope confocale (LSM 880, logiciel ZEN). Les signaux verts, rouges et violets ont été détectés par une excitation de 488, 594 et 657 nm respectivement et analysée par le programme Zeiss Zen.

7.4 Western blot

Les migrations ont été effectuées dans des gels précoulés (NuPAGE® Bis-Tris Midi Gel, concentration de polyacrylamide : gradient 4-12 %) à 150V pendant 2h. Les transferts ont été effectués sur des membranes de 0,4 µm dans la glace à 80V pendant 1h30. La révélation a été effectuée avec l'imageur (Gbox, logiciel GENESys) . La quantification des bandes a été effectuée avec le programme ImageJ.

7.5 Midiprep

Ajouter 100 ng de plasmides à 40µL de bactéries DH5α puis effectuer un choc thermique, puis ajouter du milieu LB (50 µL/mL d'ampicilline). Après une incubation de 15 minutes à 37°C, les bactéries sont étalées dans une boîte de pétri avec l'antibiotique kanamycine, puis laisser pousser pendant la nuit. Le lendemain, sélectionner une colonie isolée et la déposer dans 3 mL de LB-kamamycine (1/2000). 8 heures plus tard, rajouter 450 mL de LB-kamamycine et incuber à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, les milieux de cultures bactériennes furent centrifugés à 2500 rpm pendant 2 minutes à 20°C. La midi prep a ensuite été réalisée grâce à la trousse Plasmid DNA purification (NucleoBond Xtra® Midi/Maxi) en suivant les instructions du fabricant.

8 Résultats

8.1 Validation des outils qui permettront d'étudier l'interaction CELSR2 VANGL1/2 dans la cancérogénèse mammaire

Pour avancer dans l'étude de CELSR2, un anticorps monoclonal α -CELSR2 a été commandé dès le début de ce stage. Cet anticorps a été généré par l'immunisation de lapins avec un immunogène correspondant à une partie de la région extracellulaire de CELSR2 humain (peptide synthétique correspondant aux résidus entourant l'Histidine 1781). Afin de s'assurer de l'efficacité de ce nouvel anticorps commercial en Western Blot (WB), des lysats protéiques de cellules MCF7 ont été utilisés (Figure 8.1A). Les MCF7 sont des cellules de cancer du sein de type luminal connues pour leur surexpression, au niveau transcriptomique, de CELSR2 (Tableau 6.2). L'anticorps α -CELSR2 reconnaît des bandes au-dessus de 225 kDa à la taille attendue de CELSR2 dont le poids moléculaire est de 317,4 kDa (Atlas THP). L'anticorps semble donc fonctionnel en WB.

Ensuite, afin de s'assurer de la spécificité de l'anticorps, un second WB a été effectué à partir de lysats protéiques de cellules MCF7 transfectées avec un mélange d'ARN interférents (siARN) (smart pool de 4 siARN) dirigés contre le gène *CELSR2* humain (Figure 8.1B). Un siARN contrôle (NT) a également été transfecté dans les MCF7. Ce WB a permis d'observer une forte réduction de l'intensité des bandes précédemment observées dans la piste correspondant aux lysats protéiques de MCF transfectées avec les siARN, indiquant que l'anticorps reconnaît bel et bien spécifiquement CELSR2. Ce résultat montre également que l'ensemble de ces bandes correspondent à CELSR2. Afin de s'assurer de l'efficacité de chaque siARN, des MCF7 sauvages ont été transfectées avec les siARN individuellement. Il est possible d'observer que tous les siARN provoquent une diminution de l'expression de CELSR2 (Figure 8.1C). Pour la suite de l'étude, les siARN 05 et 06 ont été utilisés afin d'éviter de potentiels effets non-spécifiques (CELSR2) (Neumeier & Meister, 2020; Olejniczak *et al.*, 2010) que l'utilisation du mélange de siARN pourrait provoquer.

Des expériences d'immunofluorescence ont également été réalisées sur les cellules MCF7 pour tester la capacité de l'anticorps α -CELSR2 à y reconnaître CELSR2. Les cellules ont été soumises à différentes conditions de fixation. La localisation membranaire des récepteurs de la voie WNT/PCP dans les cellules étant dépendante de l'intégrité des jonctions cellulaires (Puvirajesinghe *et al.*, 2016), un anticorps α -E-Cadhérine a également été utilisé. Lors de la fixation en paraformaldéhyde (PFA) un signal au niveau du noyau est détectable avec l'anticorps α -CELSR2 (Figure 8.2A). Ce signal inattendu ne disparaît pas dans les cellules MCF7

préalablement transfectées avec un mélange de siARN dirigés contre *CELSR2* (Figure 8.2B). C'est donc un signal aspécifique. De plus, aucun signal n'est visible lors de la fixation au méthanol (Figure 8.2C). Ainsi, l'anticorps commercial ne fonctionne pas en immunofluorescence.

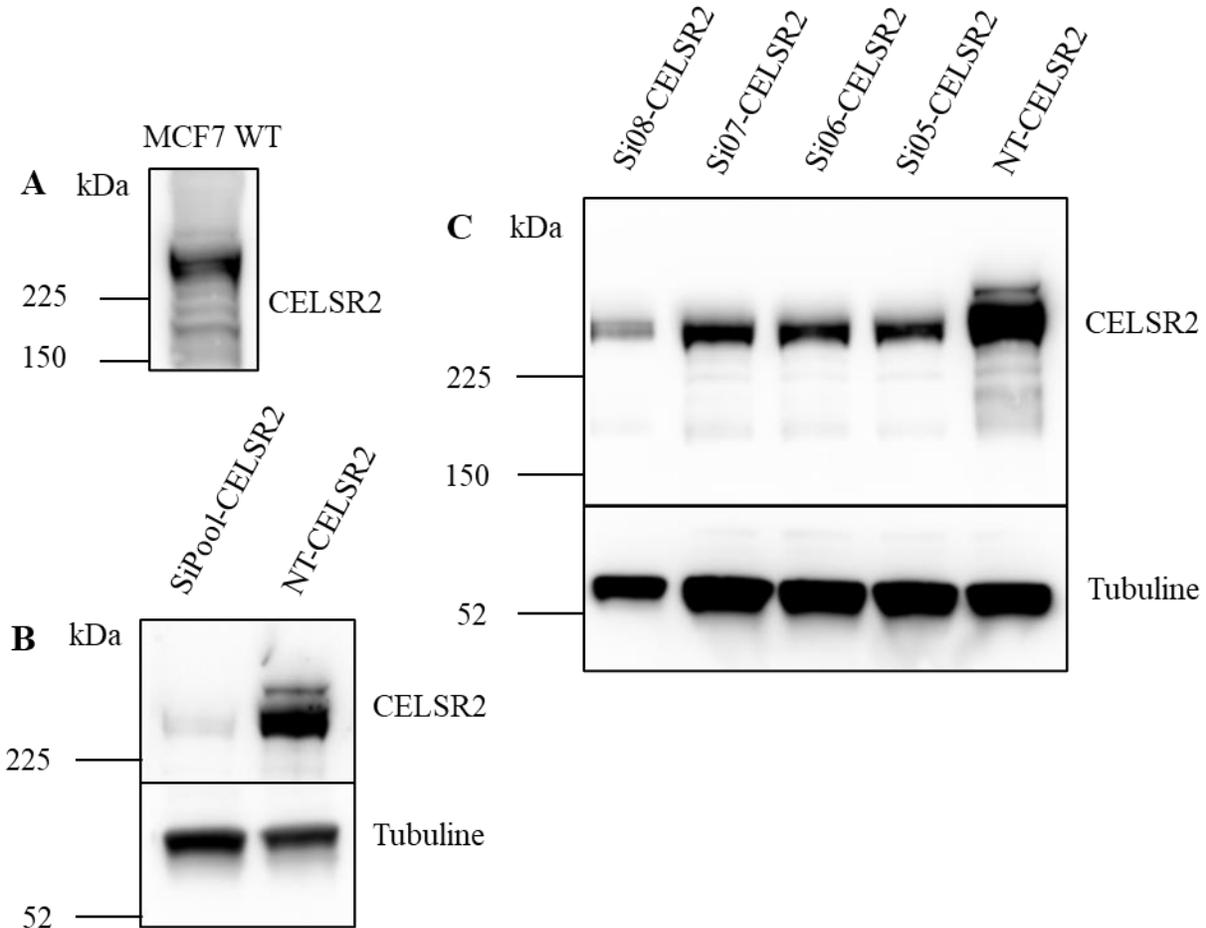


Figure 8.1 Test de la spécificité de l'anticorps α -CELSR2 par Western Blot

(A) Des cellules MCF7 ont été analysées par WB avec l'anticorps anti-CELSR2 commercial. (B) Des cellules MCF7 transfectées avec les siARN décrits dans la figure ont été analysées par Western Blot avec l'anticorps anti-CELSR2 et anti-Tubuline. (C) Des cellules MCF7 transfectées avec les siARN décrits dans la figure ont été analysées par Western Blot avec l'anticorps anti-CELSR2 et anti-Tubuline.

Une fois l'anticorps anti-CELSR2 caractérisé, il a fallu valider un autre outil indispensable pour étudier CELSR2. Cet outil est un plasmide encodant le récepteur CELSR2 murin avec un tag intracellulaire (GFP) au niveau de la partie C-terminale fourni par l'équipe de D.Devenport, Princeton, USA. L'équipe collaboratrice avait également fourni un plasmide encodant GFP-CELSR1 murin. Les plasmides ont d'abord été amplifiés grâce à une Midiprep (Annexe II Figure 13.1), puis séquencés afin de s'assurer de la qualité de l'amplification. Ils ont ensuite été utilisés dans une transfection d'ADN complémentaire (ADNc) dans des cellules épithéliales humaines de rein embryonnaire HEK293T (Figure 8.3, Annexe II Figure 13.2). Les lysats protéiques de ces

cellules ont été analysés par WB avec un anticorps anti-GFP et anti-CELSR2. Comme l'attestent les 3 premières pistes de la figure 8.3, il est possible de confirmer que les constructions s'expriment bien et à la taille attendue. Par ailleurs, CELSR2-GFP murin est reconnu par l'anticorps anti-CELSR2 humain, indiquant sa réactivité croisée entre espèces qui n'était pas inscrite sur la notice d'utilisation (Figure 8.3, dernière piste). De plus, nous pouvons observer que l'anticorps anti-CELSR2 humain reconnaît une quatrième bande qui co-migre avec GFP-CELSR1/2 murin (Figure 8.3, 5ème piste). Cette bande représente CELSR1-GFP murin qui migre plus haut que CELSR1/2 murin endogène non-marqué. Ainsi, la spécificité de l'anticorps n'est pas parfaite, ce dernier reconnaît très légèrement CELSR1 murin.

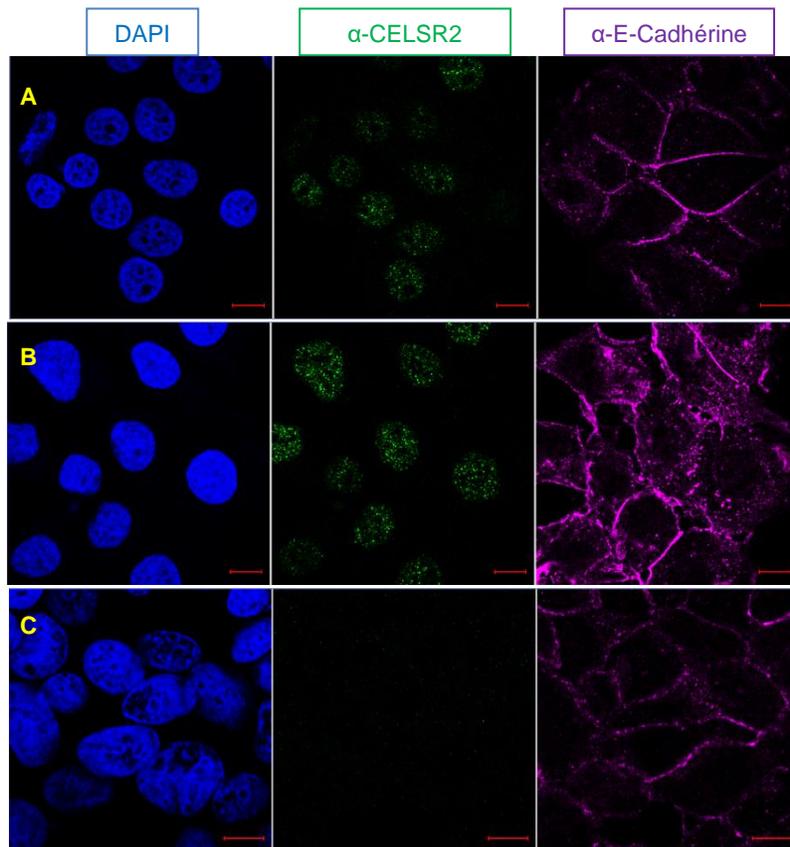


Figure 8.2 Test de l'efficacité de l'anticorps commercial α -CELSR2 en immunofluorescence

(A-B) Fixation des cellules avec de la PFA et observation des MCF7 NT (A) et d'un mélange de siARN de CELSR2 (B) avec les anticorps indiqués sur la figure. (C) Fixation des cellules MCF7 WT avec du méthanol et observation avec les anticorps indiqués sur la figure. Échelle : 10 μ m.

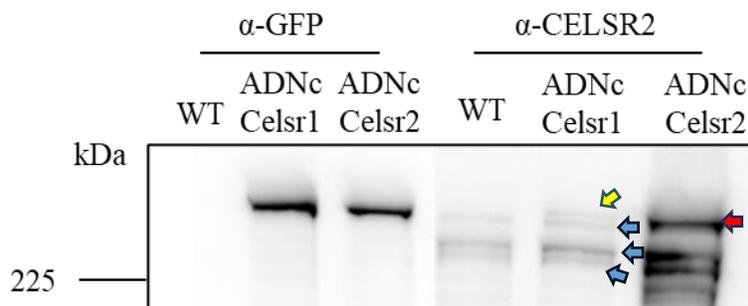


Figure 8.3 Expression des plasmides Celsr1-GFP et Celsr2-GFP murins dans les cellules HEK293T

Des cellules HEK293T transfectées avec les constructions Celsr1-GFP et Celsr2-GFP murins ont été analysées par WB avec les anticorps indiqués sur la figure. La flèche jaune indique une bande supplémentaire par rapport au type sauvage (WT) qui est Celsr1-GFP murin reconnu par α -CELSR2. Les flèches bleues indiquent les différents isoformes de Celsr2 murin endogène. La flèche rouge indique Celsr2-GFP murin.

8.2 Étude de la localisation de CELSR2

Une fois la construction GFP-CELSR2 murine validée, elle a été utilisée pour étudier la localisation de CELSR2 humain dans les MCF7 étant donné que l'anticorps anti-CELSR2 humain ne fonctionne pas en immunofluorescence. Un signal fort est détectable au niveau des contours des cellules avec l'anticorps α -GFP (Figure 8.4). Ce signal se situe au niveau de la membrane plasmique dans la mesure où il co-localise avec celui de E-Cadhérine et de VANGL1 dont la localisation membranaire avait préalablement été décrite (Iliescu *et al.*, 2011). Ce résultat semble tout à fait cohérent car CELSR2 est un RCPG d'adhésion et donc un récepteur membranaire (Tissir *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014).

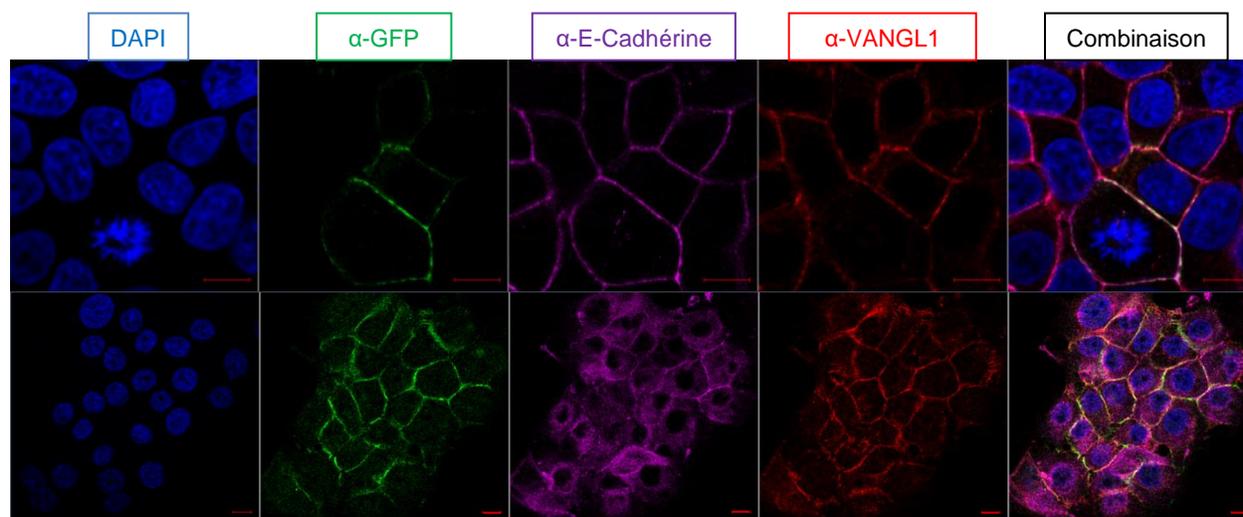


Figure 8.4 Localisation de CELSR2-GFP murin dans les cellules MCF7

CELSR2-GFP murin se situe à la membrane plasmique et co-localise avec VANGL1 humain. Les anticorps utilisés pour l'immunofluorescence sont ceux indiqués sur la figure. Échelle : 10 μ m.

8.3 Étude de l'expression de CELSR2 dans différentes lignées cancéreuses mammaires et de l'influence de l'expression de CELSR2 sur VANGL1/2 et inversement

Une fois la spécificité de l'anticorps confirmé pour CELSR2 en WB, il a été possible de déterminer si les cellules TNBC modèles SUM149 expriment CELSR2, car à terme, c'est sur ce sous-type de cancer du sein que l'équipe se focalisera pour étudier le complexe CELSR2-VANGL1/2. Ces cellules sont connues pour exprimer VANGL2 (Hoffmeyer *et al.*, 2005), mais très peu d'études ne se sont concentrées sur son corécepteur CELSR2 jusqu'à présent. Comme attendu (Tableau 6.2), un premier WB a permis d'observer CELSR2 dans les SUM149, dont le niveau d'expression est bien inférieur à celui des MCF7 (Figure 8.5 A). Ensuite, l'influence de CELSR2 sur l'expression de VANGL2 et inversement a été évaluée dans les SUM149. Pour cela des lysats protéiques de cellules SUM149 transfectées avec des siARN dirigés soit contre *VANGL2* soit contre *CELSR2* ont été analysés par WB avec les anticorps anti-CELSR2 et anti-VANGL2 (Figure 6B). L'intensité des bandes détectées avec l'anti-VANGL2 est inchangée quand l'expression de CELSR2 est diminuée (Figure 8.5 B-C). De la même façon, l'intensité des bandes détectées avec l'anti-CELSR2 est inchangée quand l'expression de VANGL2 est diminuée (Figure 8.5 B-C). Ainsi, le niveau d'expression de VANGL2 ne semble pas dépendre de celui de CELSR2 et inversement.

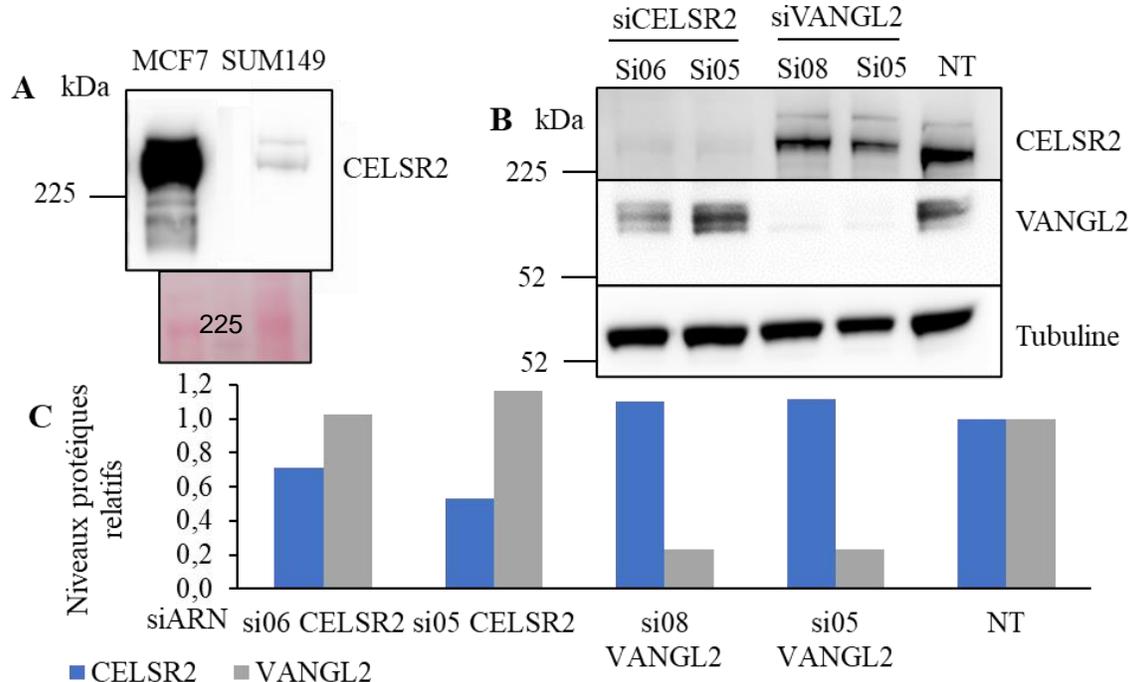


Figure 8.5 Expression protéique de CELSR2 et de VANGL2 dans les SUM149 et dans les MCF7

(A) Comparaison de l'intensité d'expression de CELSR2 dans les SUM149 et les MCF7 par WB avec l'anticorps indiqué sur la figure. (B) Observation de l'impact de l'expression de CELSR2 sur VANGL2 et inversement dans les SUM149 suivant l'utilisation de siARN indiqués sur la figure. (C) Quantification du WB en (B). Ces données représentent le résultat d'une seule expérience.

8.4 Impact de la perte d'expression de CELSR2 sur la formation des jonctions adhérentes

Étant donné le rôle de CELSR2 et des autres RCPG d'adhésion dans l'adhésion cellule-cellule, l'impact de la diminution de son expression sur la formation des jonctions adhérentes a été évalué. Pour cela, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur des cellules MCF7 transfectées avec deux siARN différents dirigés contre le gène *CELSR2* et avec un siARN contrôle. L'intégrité des jonctions a été évaluée en évaluant la localisation de E-Cadhérine déterminée grâce à un anticorps anti-E-cadhérine. En effet, les jonctions adhérentes sont en partie constituées de glycoprotéines transmembranaires de la superfamille des cadhérines comme E-Cadhérine. Dans les cellules MCF7 transfectées avec le siARN contrôle, un signal fort est détectable au niveau de la membrane plasmique avec l'anticorps anti-E-Cadhérine (Figure 8.6 A, panneau supérieur). En revanche, lorsque l'expression de CELSR2 est diminuée, la protéine E Cadhérine semble être moins localisée à la membrane plasmique. Les cellules semblent avoir des jonctions altérées et expriment parfois de petits filaments (Figure 8.6 A panneau du milieu et panneau inférieur). De la même façon, un effet sur la localisation de VANGL1 est observable (Figure 8.6 A).

Une nouvelle transfection des MCF7 a été réalisée avec le mélange des siARN afin d'amplifier l'effet observé en augmentant la réduction de l'expression de CELSR2 (Neumeier & Meister, 2020; Parsons *et al.*, 2009). Dans ces cellules, nous avons pu observer en immunofluorescence une délocalisation de la protéine E-Cadhérine qui n'est plus localisée à la membrane plasmique ainsi qu'une diminution de l'expression de E-Cadhérine dans toute la cellule (Figure 8.6 B). Ainsi, nous pouvons conclure que CELSR2 joue probablement un rôle dans l'intégrité des jonctions adhérentes.

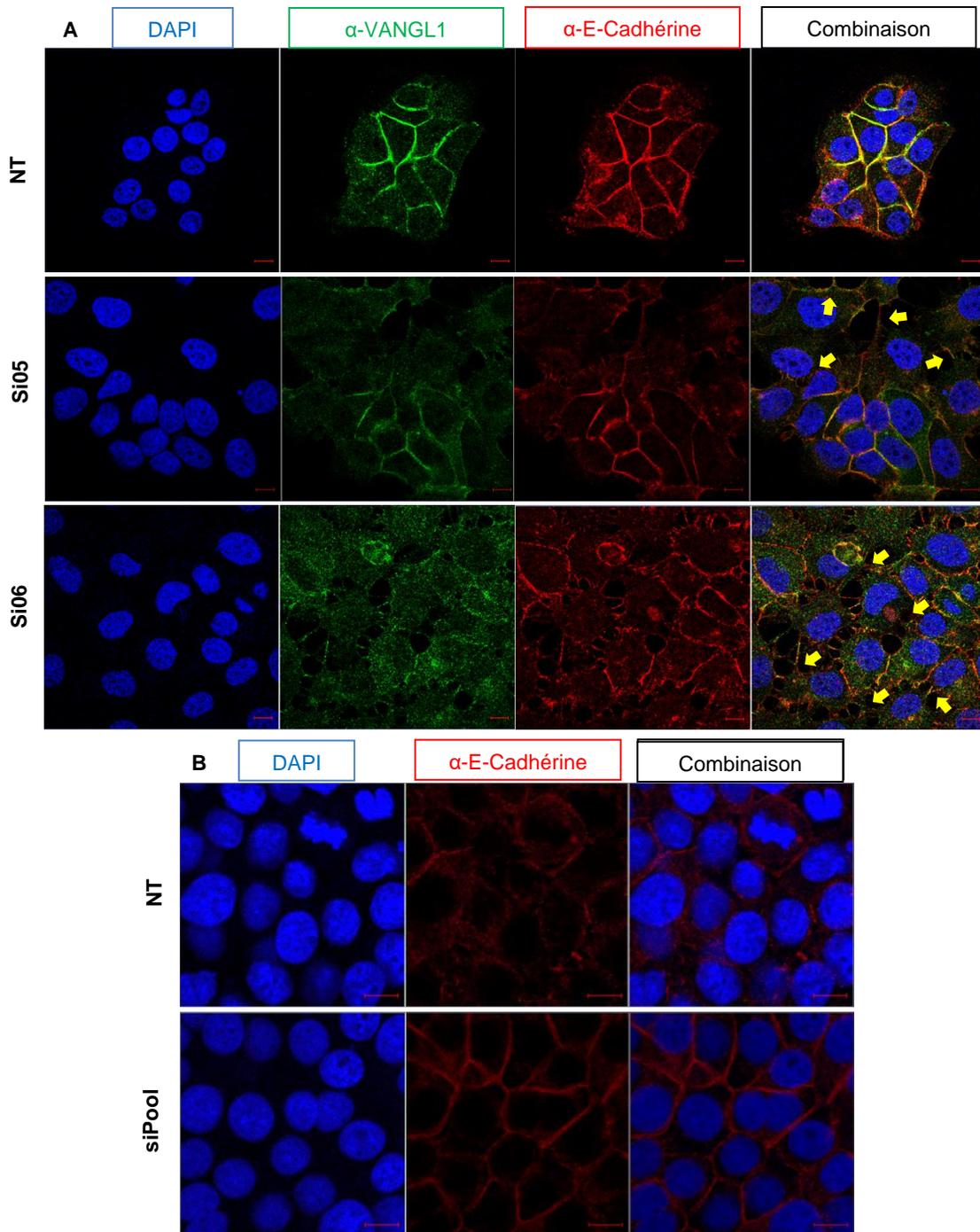


Figure 8.6 Analyse de l'effet de la diminution de l'expression de CELSR2 sur la localisation de E-cadhérine et de VANGL1 dans les MCF7

Marquage avec l'anticorps α -VANGL1 et α -E-Cadhérine. Les flèches jaunes pointent les filaments anormaux. (A) Panneau supérieur : siNT. Panneau du milieu : si05 dirigé contre *CELSR2*. Panneau inférieur : si06 dirigé contre *CELSR2*. (B) Panneau supérieur : siNT. Panneau inférieur : mélange de siARN dirigés contre *CELSR2*. Échelle : 10 μ m.

9 Discussion

L'objectif de cette étude a consisté à débiter la caractérisation de CELSR2 en termes d'expression et de fonction, de façon dépendante ou indépendante de VANGL2. Pour cela, différents outils qui permettront d'étudier l'interaction CELSR2 VANGL1/2 dans la cancérogénèse mammaire ont été validés. Tout d'abord, un anticorps monoclonal commercial de lapin a montré son efficacité en WB. De plus, l'efficacité de différents siARN dirigés contre le gène CELSR2 a été démontrée. Enfin, la validation d'un plasmide encodant GFP-Celsr2 murin a permis de constater la localisation membranaire de CELSR2 murin dans les MCF7. Quant à l'anticorps, en le mettant à profit, il a été possible de déterminer que l'expression protéique de CELSR2 dans des cellules cancéreuses triple-négatives SUM149 est bien moins importante que dans les cellules MCF7 de type luminal. Les cellules SUM149 présentent cependant l'avantage d'exprimer VANGL2 à l'opposé des cellules MCF qui n'expriment que VANGL1. De plus, ce sont des cellules cancéreuses triple-négatives, sous-type de cancer du sein où la surexpression du complexe CELSR2/VANGL2 est de mauvais pronostic. Ainsi, les SUM149 ont été utilisées pour étudier l'influence de la régulation de l'expression de CELSR2 sur VANGL2 et inversement. Il a été observé que le niveau d'expression respectifs de ces récepteurs n'influe pas sur le niveau d'expression de l'autre. En revanche, il est possible d'observer un effet attendu sur l'organisation des jonctions adhérentes à la suite de la diminution d'expression de CELSR2 dans les MCF7.

Une fois l'anticorps anti-CELSR2 validé, il a premièrement été possible de remarquer qu'il détectait trois bandes à environ 300 kDa (Figure 8.1A). Dans la littérature, CELSR2 est connu pour être de 317,4 kDa (Atlas THP). Ces bandes supplémentaires pourraient donc représenter une forme de CELSR2 avec des modifications post-traductionnelles qui modifient sa migration. Afin de le confirmer, il sera nécessaire de purifier ces différentes formes de CELSR2 par immunoprécipitation et de les analyser par spectrométrie de masse. Cela pourrait également être des isoformes de différentes tailles de CELSR2 produites par épissage alternatif ou par initiation alternative de la traduction. Dans tous les cas, ces trois bandes sont présentes dans les différentes lignées observées, que cela soit les MCF7, les SUM149 ou les HEK293T. De plus, ces trois bandes diminuent lorsque l'expression de CELSR2 est diminuée par les siARN, confirmant qu'elles correspondent bien toutes à différentes formes de CELSR2 (Figure 8.1B-C).

Les cellules MCF ont été choisies pour certaines des expériences effectuées car elles expriment très fortement CELSR2 et car elles forment des jonctions bien qu'elles soient cancéreuses. La localisation membranaire des récepteurs de la voie WNT/PCP dans les cellules en culture étant

dépendante de l'intégrité des jonctions cellulaires des lignées (Puvirajesinghe *et al.*, 2016), ce modèle de cellule était adapté pour confirmer la localisation à la membrane plasmique de CELSR2 (Figure 8.4). Par ailleurs, cette expérience a permis une fois de plus de confirmer la qualité de la construction GFP-CELSR2 murin et elle pourra donc être utilisée par une équipe collaboratrice (Franck Vandermoere, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier) pour disséquer la signalisation en aval de CELSR2. L'expression de la construction à la membrane plasmique est en effet indispensable pour aborder cette question. La signalisation en aval de CELSR2 demeure pour le moment inconnue et le recrutement des différentes protéines G au récepteur à la membrane plasmique sera testé en utilisant la construction GFP-CELSR2 murin. De plus, l'équipe de Jean-Paul Borg a démarré une collaboration avec l'équipe de Patrick Chames (CRCM, Marseille), expertes dans la production de nanobodies, dans le but d'obtenir des modulateurs potentiels du récepteur CELSR2. À la lumière des résultats obtenus au cours de ce stage (fort niveau d'expression protéique de CELSR2 dans les MCF7 et validation des siARN dirigés contre CELSR2), les nanobodies dirigés contre CELSR2 seront produits en utilisant comme immunogène les cellules MCF7 et des cellules MCF7 transfectées avec un siARN contre CELSR2 comme contrôle.

Par ailleurs, le résultat de la Figure 8.5 montre qu'une stabilisation réciproque de ces deux récepteurs entraînant une augmentation de leur quantité n'est pas envisageable. Une étude a démontré qu'une diminution de CELSR2 murin dans l'épendyme du cerveau de souris affecte la disposition asymétrique de VANGL2 murin dans les ventricules et non son expression protéique. Cette étude montre que l'inactivation combinée de CELSR2 murin et CELSR3 murin est nécessaire pour diminuer l'expression de VANGL2 murin (Tissir *et al.*, 2010). Il serait donc intéressant de refaire cette expérience avec des siARN dirigés contre *CELSR3* également.

L'utilisation des cellules MCF et leur capacité à former des jonctions a également permis de constater que CELSR2 joue probablement un rôle dans l'intégrité des jonctions adhérentes (Figure 8.6). Une grande majorité des tumeurs humaines chez l'adulte dérivent des altérations de la polarité cellulaire des tissus épithéliaux comme la polarité apico-basale qui est assurée au niveau cellulaire grâce à l'intégrité des jonctions cellulaires dont les jonctions adhérentes. Étant donné le pouvoir oncogénique de CELSR2 et son rôle dans l'adhésion cellulaire, ce résultat était attendu. Il reste cependant à confirmer ce résultat avec des expériences de sauvetage qui seront facilement réalisables car les siARN du laboratoire sont dirigés contre le gène *CELSR2* humain et que la construction GFP-CELSR2 permet d'exprimer le récepteur murin. Cependant, cet effet pourrait également être dû indirectement à la réduction de l'expression de VANGL1 à la

membrane plasmique. Bien qu'il soit davantage reporté qu'un dérèglement de VANGL2 provoque de fortes anomalies au niveau des jonctions en provoquant l'endocytose d'E-Cadhérine (Jessen & Jessen, 2019; Lindqvist *et al.*, 2010; Nagaoka *et al.*, 2014), il n'est pas à exclure que le rôle de VANGL2 dans la stabilité des jonctions soit rempli par VANGL1 dans les MCF7. Afin de vérifier si la perte des jonctions adhérentes est bien due à une diminution de VANGL1 à la membrane, il faudrait observer des MCF7 transfectées avec des siARN dirigés contre *VANGL1*. Il serait également intéressant de tester si cet effet est potentialisé par la diminution d'expression de VANGL2. Cependant, les MCF ne sont pas des cellules adaptées pour cette expérience car elles n'expriment pas VANGL2.

Les cellules cancéreuses triple-négatives SUM149 expriment CELSR2 et VANGL2 mais elles ne forment pas de jonctions. Ce modèle de cellules sera principalement utilisé pour des expériences de biochimie pour confirmer l'interaction entre VANGL2 et CELSR2 dans des cellules cancéreuses mammaires.

10 Conclusion

L'objectif du stage était de valider les nouveaux outils du laboratoire pour étudier CELSR2 et de débiter la caractérisation de ce récepteur de façon dépendante ou indépendante de VANGL2.

Cette étude a permis de constater la localisation membranaire de CELSR2 murin dans les MCF7, de comparer l'expression protéique de CELSR2 humain dans différentes cellules cancéreuses mammaires et d'évaluer l'influence du niveau d'expression de CELSR2 humain sur VANGL2 humain et inversement. Enfin, un effet sur l'organisation des jonctions à la suite de la diminution d'expression de CELSR2 humain a été mis en évidence.

Les résultats obtenus au cours de ce stage vont permettre à l'équipe de Jean-Paul Borg de mieux appréhender le rôle du complexe VANGL2/CELSR2 dans un contexte pathologique qu'est celui du cancer du sein triple négatif et d'évaluer si CELSR2 pourrait faire l'objet d'un développement en tant que biomarqueur et/ou cible thérapeutique.

11 BIBLIOGRAPHIE

- Abbastabar M, Kheyrollah M, Azizian K, Bagherlou N, Tehrani SS, Maniati M, Karimian A (2018) Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)* 69:63-72.
- Abidin BM, Owusu Kwarteng E, Heinonen KM (2015) Frizzled-6 Regulates Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Survival and Self-Renewal. *J Immunol* 195(5):2168-2176.
- Amoah A, Keller A, Emini R, Hoenicka M, Liebold A, Vollmer A, Eiwen K, Soller K, Sakk V, Zheng Y, Florian MC, Geiger H (2022) Aging of human hematopoietic stem cells is linked to changes in Cdc42 activity. *Haematologica* 107(2):393-402.
- Anastas JN, Biechele TL, Robitaille M, Muster J, Allison KH, Angers S, Moon RT (2012) A protein complex of SCRIB, NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression. *Oncogene* 31(32):3696-3708.
- Andre P, Wang Q, Wang N, Gao B, Schilit A, Halford MM, Stacker SA, Zhang X, Yang Y (2012) The Wnt coreceptor Ryk regulates Wnt/planar cell polarity by modulating the degradation of the core planar cell polarity component Vangl2. *J Biol Chem* 287(53):44518-44525.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118(2):149-161.
- Askmyr M, Sims NA, Martin TJ, Purton LE (2009) What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche? *Trends Endocrinol Metab* 20(6):303-309.
- Atlas THP (The Human Protein Atlas, Knut & Alice Wallenberg Foundation.).
- Aviles EC, Wilson NH, Stoeckli ET (2013) Sonic hedgehog and Wnt: antagonists in morphogenesis but collaborators in axon guidance. *Front Cell Neurosci* 7:86.
- Barnat M, Enslin H, Propst F, Davis RJ, Soares S, Nothias F (2010) Distinct roles of c-Jun N-terminal kinase isoforms in neurite initiation and elongation during axonal regeneration. *J Neurosci* 30(23):7804-7816.
- Beerman I, Seita J, Inlay MA, Weissman IL, Rossi DJ (2014) Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell* 15(1):37-50.
- Behrens K, Trivai I, Schwieger M, Tekin N, Alawi M, Spohn M, Indenbirken D, Ziegler M, Muller U, Alexander WS, Stocking C (2016) Runx1 downregulates stem cell and megakaryocytic transcription programs that support niche interactions. *Blood* 127(26):3369-3381.
- Berwick DC, Harvey K (2013) LRRK2: an eminence grise of Wnt-mediated neurogenesis? *Front Cell Neurosci* 7:82.
- Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marcais A, Marvel J (2004) Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3):159-168.
- Bouali S, Hetu-Arbour R, Gardet C, Heinonen KM (2022) Vangl2 Promotes Hematopoietic Stem Cell Expansion. *Front Cell Dev Biol* 10:760248.

- Bowers M, Zhang B, Ho Y, Agarwal P, Chen CC, Bhatia R (2015) Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development. *Blood* 125(17):2678-2688.
- Bowie MB, McKnight KD, Kent DG, McCaffrey L, Hoodless PA, Eaves CJ (2006) Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J Clin Invest* 116(10):2808-2816.
- Brenner AK, Reikvam H, Lavecchia A, Bruserud O (2014) Therapeutic targeting the cell division cycle 25 (CDC25) phosphatases in human acute myeloid leukemia--the possibility to target several kinases through inhibition of the various CDC25 isoforms. *Molecules* 19(11):18414-18447.
- Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, Scheiermann C, Schiff L, Poncz M, Bergman A, Frenette PS (2014) Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med* 20(11):1315-1320.
- Brunt L, Greicius G, Rogers S, Evans BD, Virshup DM, Wedgwood KCA, Scholpp S (2021) Vangl2 promotes the formation of long cytonemes to enable distant Wnt/beta-catenin signaling. *Nat Commun* 12(1):2058.
- Buono M, Facchini R, Matsuoka S, Thongjuea S, Waithe D, Luis TC, Giustacchini A, Besmer P, Mead AJ, Jacobsen SE, Nerlov C (2016) A dynamic niche provides Kit ligand in a stage-specific manner to the earliest thymocyte progenitors. *Nat Cell Biol* 18(2):157-167.
- Cetera M, Leybova L, Woo FW, Deans M, Devenport D (2017) Planar cell polarity-dependent and independent functions in the emergence of tissue-scale hair follicle patterns. *Dev Biol* 428(1):188-203.
- Chae WJ, Bothwell ALM (2018) Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling in Immune Cells. *Trends Immunol* 39(10):830-847.
- Challen GA, Goodell MA (2010) Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 38(5):403-416.
- Charbord P, Tavian M, Humeau L, Peault B (1996) Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood* 87(10):4109-4119.
- Chen F, Shen M, Zeng D, Wang C, Wang S, Chen S, Tang Y, Hu M, Chen M, Su Y, Ran X, Xu Y, Wang J (2017) Effect of radiation-induced endothelial cell injury on platelet regeneration by megakaryocytes. *J Radiat Res* 58(4):456-463.
- Cheng H, Zheng Z, Cheng T (2020) New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell* 11(1):34-44.
- Cho RH, Sieburg HB, Muller-Sieburg CE (2008) A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* 111(12):5553-5561.
- Choi J, Baldwin TM, Wong M, Bolden JE, Fairfax KA, Lucas EC, Cole R, Biben C, Morgan C, Ramsay KA, Ng AP, Kauppi M, Corcoran LM, Shi W, Wilson N, Wilson MJ, Alexander WS, Hilton DJ, de Graaf CA (2019) Haemopedia RNA-seq: a database of gene expression during haematopoiesis in mice and humans. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D780-D785.
- Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL (2004) Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* 2(3):E75.

- Ciriza J, Thompson H, Petrosian R, Manilay JO, Garcia-Ojeda ME (2013) The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal bone marrow: lessons learned and possible clinical applications. *Exp Hematol* 41(5):411-423.
- Coppin E, Florentin J, Vasamsetti SB, Arunkumar A, Sembrat J, Rojas M, Dutta P (2018) Splenic hematopoietic stem cells display a pre-activated phenotype. *Immunol Cell Biol* 10.1111/imcb.12035.
- Cosolo A, Jaiswal J, Csordas G, Grass I, Uhlirva M, Classen AK (2019) JNK-dependent cell cycle stalling in G2 promotes survival and senescence-like phenotypes in tissue stress. *Elife* 8.
- Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ (2017) Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol* 17(9):573-590.
- Das G, Reynolds-Kenneally J, Mlodzik M (2002) The atypical cadherin Flamingo links Frizzled and Notch signaling in planar polarity establishment in the Drosophila eye. *Dev Cell* 2(5):655-666.
- Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103(2):239-252.
- De A (2011) Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43(10):745-756.
- de Graaf CA, Metcalf D (2011) Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 10(10):1582-1589.
- DepMap (DepMap, Broad Institute.).
- Devenport D (2014) The cell biology of planar cell polarity. *J Cell Biol* 207(2):171-179.
- DiCarlo AL, Poncz M, Cassatt DR, Shah JR, Czarniecki CW, Maidment BW (2011) Medical countermeasures for platelet regeneration after radiation exposure. Report of a workshop and guided discussion sponsored by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD, March 22-23, 2010. *Radiat Res* 176(1):e0001-0015.
- DiMascio L, Voermans C, Uqoezwa M, Duncan A, Lu D, Wu J, Sankar U, Reya T (2007) Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J Immunol* 178(6):3511-3520.
- Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481(7382):457-462.
- Dominici M, Rasini V, Bussolari R, Chen X, Hofmann TJ, Spano C, Bernabei D, Veronesi E, Bertoni F, Paolucci P, Conte P, Horwitz EM (2009) Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. *Blood* 114(11):2333-2343.
- Draper JE, Sroczynska P, Leong HS, Fadlullah MZH, Miller C, Kouskoff V, Lacaud G (2017) Mouse RUNX1C regulates premeagakaryocytic/erythroid output and maintains survival of megakaryocyte progenitors. *Blood* 130(3):271-284.
- Draper JE, Sroczynska P, Tsoulaki O, Leong HS, Fadlullah MZ, Miller C, Kouskoff V, Lacaud G (2016) RUNX1B Expression Is Highly Heterogeneous and Distinguishes Megakaryocytic and Erythroid Lineage Fate in Adult Mouse Hematopoiesis. *PLoS Genet* 12(1):e1005814.
- Drissen R, Buza-Vidas N, Woll P, Thongjuea S, Gambardella A, Giustacchini A, Mancini E, Zriwil A, Lutteropp M, Grover A, Mead A, Sitnicka E, Jacobsen SEW, Nerlov C (2016) Distinct myeloid progenitor-differentiation pathways identified through single-cell RNA sequencing. *Nat Immunol* 17(6):666-676.

- Emerson SG (2007) Thrombopoietin, HSCs, and the osteoblast niche: holding on loosely, but not letting GO. *Cell Stem Cell* 1(6):599-600.
- Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y (2002) CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive? *Leukemia* 16(9):1603-1608.
- Esteouille L, Daubeuf F, Collot M, Riche S, Durroux T, Brasse D, Marchand P, Karpenko IA, Klymchenko AS, Bonnet D (2020) A near-infrared fluorogenic dimer enables background-free imaging of endogenous GPCRs in living mice. *Chem Sci* 11(26):6824-6829.
- Ewen-Campen B, Comyn T, Vogt E, Perrimon N (2020) No Evidence that Wnt Ligands Are Required for Planar Cell Polarity in *Drosophila*. *Cell Rep* 32(10):108121.
- Faltusova K, Chen CL, Heizer T, Bajecny M, Szikszai K, Paral P, Savvulidi F, Renesova N, Necas E (2020) Altered Erythro-Myeloid Progenitor Cells Are Highly Expanded in Intensively Regenerating Hematopoiesis. *Front Cell Dev Biol* 8:98.
- Famili F, Naber BA, Vloemans S, de Haas EF, Tiemessen MM, Staal FJ (2015) Discrete roles of canonical and non-canonical Wnt signaling in hematopoiesis and lymphopoiesis. *Cell Death Dis* 6:e1981.
- Feng D, Wang J, Yang W, Li J, Lin X, Zha F, Wang X, Ma L, Choi NT, Mii Y, Takada S, Huen MSY, Guo Y, Zhang L, Gao B (2021) Regulation of Wnt/PCP signaling through p97/VCP-KBTBD7-mediated Vangl ubiquitination and endoplasmic reticulum-associated degradation. *Sci Adv* 7(20).
- Fielding C, Mendez-Ferrer S (2020) Neuronal regulation of bone marrow stem cell niches. *F1000Res* 9.
- Florian MC, Dorr K, Niebel A, Daria D, Schrezenmeier H, Rojewski M, Filippi MD, Hasenberg A, Gunzer M, Scharffetter-Kochanek K, Zheng Y, Geiger H (2012) Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell* 10(5):520-530.
- Florian MC, Klose M, Sacma M, Jablanovic J, Knudson L, Nattamai KJ, Marka G, Vollmer A, Soller K, Sakk V, Cabezas-Wallscheid N, Zheng Y, Mulaw MA, Glauche I, Geiger H (2018) Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division. *PLoS Biol* 16(9):e2003389.
- Foidart P, Yip C, Radermacher J, Blacher S, Lienard M, Montero-Ruiz L, Maquoi E, Montaudon E, Chateau-Joubert S, Collignon J, Coibion M, Jossa V, Marangoni E, Noel A, Sounni NE, Jerusalem G (2019) Expression of MT4-MMP, EGFR, and RB in Triple-Negative Breast Cancer Strongly Sensitizes Tumors to Erlotinib and Palbociclib Combination Therapy. *Clin Cancer Res* 25(6):1838-1850.
- Fox N, Priestley G, Papayannopoulou T, Kaushansky K (2002) Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J Clin Invest* 110(3):389-394.
- Galan-Diez M, Kousteni S (2017) The osteoblastic niche in hematopoiesis and hematological myeloid malignancies. *Curr Mol Biol Rep* 3(2):53-62.
- Gao B, Song H, Bishop K, Elliot G, Garrett L, English MA, Andre P, Robinson J, Sood R, Minami Y, Economides AN, Yang Y (2011) Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2. *Dev Cell* 20(2):163-176.
- Gao Y, Smith E, Ker E, Campbell P, Cheng EC, Zou S, Lin S, Wang L, Halene S, Krause DS (2012) Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev Cell* 22(3):573-584.
- Gekas C, Graf T (2013) CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* 121(22):4463-4472.

- Georgiades P, Ogilvy S, Duval H, Licence DR, Charnock-Jones DS, Smith SK, Print CG (2002) VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. *Genesis* 34(4):251-256.
- Gilles L, Bluteau D, Boukour S, Chang Y, Zhang Y, Robert T, Dessen P, Debili N, Bernard OA, Vainchenker W, Raslova H (2009) MAL/SRF complex is involved in platelet formation and megakaryocyte migration by regulating MYL9 (MLC2) and MMP9. *Blood* 114(19):4221-4232.
- Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao BQ, Cifuni SM, Wagner DD (2008) Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 111(10):4958-4964.
- Golan K, Kumari A, Kollet O, Khatib-Massalha E, Subramaniam MD, Ferreira ZS, Avemaria F, Rzeszotek S, Garcia-Garcia A, Xie S, Flores-Figueroa E, Gur-Cohen S, Itkin T, Ludin-Tal A, Massalha H, Bernshtein B, Ciechanowicz AK, Brandis A, Mehlman T, Bhattacharya S, Bertagna M, Cheng H, Petrovich-Kopitman E, Janus T, Kaushansky N, Cheng T, Sagi I, Ratajczak MZ, Mendez-Ferrer S, Dick JE, Markus RP, Lapidot T (2018) Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. *Cell Stem Cell* 23(4):572-585 e577.
- Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Al Masri A, Christian JL, Fleming WH (2009) BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 114(20):4393-4401.
- Gray DH, Tull D, Ueno T, Seach N, Classon BJ, Chidgey A, McConville MJ, Boyd RL (2007) A unique thymic fibroblast population revealed by the monoclonal antibody MTS-15. *J Immunol* 178(8):4956-4965.
- Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpeiz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T, Link DC (2013) CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495(7440):227-230.
- Gu J, Chen YZ, Zhang ZX, Yang ZX, Duan GX, Qin LQ, Zhao L, Xu JY (2020) At What Dose Can Total Body and Whole Abdominal Irradiation Cause Lethal Intestinal Injury Among C57BL/6J Mice? *Dose Response* 18(3):1559325820956783.
- Gubb D, Garcia-Bellido A (1982) A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 68:37-57.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15(11):2760-2770.
- Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267(5196):389-393.
- Gutierrez GJ, Tsuji T, Cross JV, Davis RJ, Templeton DJ, Jiang W, Ronai ZA (2010) JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G(2)/M DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* 285(19):14217-14228.
- Guyot MC, Bosoi CM, Kharfallah F, Reynolds A, Drapeau P, Justice M, Gros P, Kibar Z (2011) A novel hypomorphic Looptail allele at the planar cell polarity Vangl2 gene. *Dev Dyn* 240(4):839-849.
- Hatakeyama J, Wald JH, Printsev I, Ho HY, Carraway KL, 3rd (2014) Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer. *Endocr Relat Cancer* 21(5):R345-356.

- Hayes M, Naito M, Daulat A, Angers S, Ciruna B (2013) Ptk7 promotes non-canonical Wnt/PCP-mediated morphogenesis and inhibits Wnt/beta-catenin-dependent cell fate decisions during vertebrate development. *Development* 140(8):1807-1818.
- Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R (2000) The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J* 19(8):1839-1850.
- Heib T, Hermanns HM, Manukjan G, Englert M, Kusch C, Becker IC, Gerber A, Wackerbarth LM, Burkard P, Dandekar T, Balkenhol J, Jahn D, Beck S, Meub M, Dutting S, Stigloher C, Sauer M, Cherpokova D, Schulze H, Brakebusch C, Nieswandt B, Nagy Z, Pleines I (2021) RhoA/Cdc42 signaling drives cytoplasmic maturation but not endomitosis in megakaryocytes. *Cell Rep* 35(6):109102.
- Heinonen KM, Vanegas JR, Lew D, Krosi J, Perreault C (2011) Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. *PLoS One* 6(4):e19279.
- Henry E, Arcangeli ML (2021) How Hematopoietic Stem Cells Respond to Irradiation: Similarities and Differences between Low and High Doses of Ionizing Radiations. *Exp Hematol* 94:11-19.
- Hetu-Arbour R, Tili M, Bandeira Ferreira FL, Abidin BM, Kwarteng EO, Heinonen KM (2021) Cell-intrinsic Wnt4 promotes hematopoietic stem and progenitor cell self-renewal. *Stem Cells* 10.1002/stem.3385.
- Hoffmeyer MR, Wall KM, Dharmawardhane SF (2005) In vitro analysis of the invasive phenotype of SUM 149, an inflammatory breast cancer cell line. *Cancer Cell Int* 5(1):11.
- Hu T, Kitano A, Luu V, Dawson B, Hoegenauer KA, Lee BH, Nakada D (2019) Bmi1 Suppresses Adipogenesis in the Hematopoietic Stem Cell Niche. *Stem Cell Reports* 13(3):545-558.
- Ichikawa M, Goyama S, Asai T, Kawazu M, Nakagawa M, Takeshita M, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M (2008) AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol* 180(7):4402-4408.
- Iliescu A, Gravel M, Horth C, Apuzzo S, Gros P (2011) Transmembrane topology of mammalian planar cell polarity protein Vangl1. *Biochemistry* 50(12):2274-2282.
- Inra CN, Zhou BO, Acar M, Murphy MM, Richardson J, Zhao Z, Morrison SJ (2015) A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature* 527(7579):466-471.
- Italiano JE, Hartwig JH (2013) Megakaryocyte Development and Platelet Formation. *Platelets*, 10.1016/b978-0-12-387837-3.00002-x. p 27-49.
- Jackson DP, Cronkite EP, Le RG, Halpern B (1952) Further studies on the nature of the hemorrhagic state in radiation injury. *J Lab Clin Med* 39(3):449-461.
- Jessen TN, Jessen JR (2019) VANGL2 protein stability is regulated by integrin alpha_v and the extracellular matrix. *Exp Cell Res* 374(1):128-139.
- Julien E, El Omar R, Tavian M (2016) Origin of the hematopoietic system in the human embryo. *FEBS Lett* 590(22):3987-4001.
- Kaplan HG, Malmgren JA, Atwood MK (2011) Increased incidence of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia following breast cancer treatment with radiation alone or combined with chemotherapy: a registry cohort analysis 1990-2005. *BMC Cancer* 11:260.

- Kelly LK, Wu J, Yanfeng WA, Mlodzik M (2016) Frizzled-Induced Van Gogh Phosphorylation by CK1epsilon Promotes Asymmetric Localization of Core PCP Factors in Drosophila. *Cell Rep* 16(2):344-356.
- Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, Reynolds A, Berghout J, Mathieu M, Kirillova I, De Marco P, Merello E, Hayes JM, Wallingford JB, Drapeau P, Capra V, Gros P (2007) Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. *N Engl J Med* 356(14):1432-1437.
- Kiefer F, Tibbles LA, Anafi M, Janssen A, Zanke BW, Lassam N, Pawson T, Woodgett JR, Iscove NN (1996) HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. *EMBO J* 15(24):7013-7025.
- Kim CH (2010) Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J Blood Med* 1:13-19.
- Kocere A, Chiavacci E, Mendez-Acevedo KM, Soneson C, Hiltabidle MS, Raghunath A, MacGowan JS, Shavit JA, Panakova D, Williams MLK, Robinson MD, Mosimann C, Burger A (2023) TAR Syndrome-associated Rbm8a deficiency causes hematopoietic defects and attenuates Wnt/PCP signaling. *bioRxiv* 10.1101/2023.04.12.536513.
- Koushyar S, Meniel VS, Pheesse TJ, Pearson HB (2022) Exploring the Wnt Pathway as a Therapeutic Target for Prostate Cancer. *Biomolecules* 12(2).
- Kypta RM (2011) Wnt Signaling. *Encyclopedia of Cancer*, 10.1007/978-3-642-16483-5_6257. p 3953-3957.
- LaMonica K, Bass M, Grabel L (2009) The planar cell polarity pathway directs parietal endoderm migration. *Dev Biol* 330(1):44-53.
- Laurenti E, Gottgens B (2018) From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553(7689):418-426.
- Lecine P, Italiano JE, Kim S-W, Villeval J-L, Shivdasani RA (2000) Hematopoietic-specific 1ulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood* 96(4):1366-1373.
- Lecine P, Villeval J-L, Vyas P, Swencki B, Xu Y, Shivdasani RA (1998) Mice Lacking Transcription Factor NF-E2 Provide In Vivo Validation of the Proplatelet Model of Thrombocytopoiesis and Show a Platelet Production Defect That Is Intrinsic to Megakaryocytes. *Blood* 92(5):1608-1616.
- Lee J, Andreeva A, Sipe CW, Liu L, Cheng A, Lu X (2012) PTK7 regulates myosin II activity to orient planar polarity in the mammalian auditory epithelium. *Curr Biol* 22(11):956-966.
- Lei YP, Zhang T, Li H, Wu BL, Jin L, Wang HY (2010) VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects. *N Engl J Med* 362(23):2232-2235.
- Lhoumeau AC, Arcangeli ML, De Grandis M, Giordano M, Orsoni JC, Lembo F, Bardin F, Marchetto S, Aurrand-Lions M, Borg JP (2016) Ptk7-Deficient Mice Have Decreased Hematopoietic Stem Cell Pools as a Result of Deregulated Proliferation and Migration. *J Immunol* 196(10):4367-4377.
- Liang H, Coles AH, Zhu Z, Zayas J, Jurecic R, Kang J, Jones SN (2007) Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *J Exp Med* 204(13):3077-3084.
- Lindqvist M, Horn Z, Bryja V, Schulte G, Papachristou P, Ajima R, Dyberg C, Arenas E, Yamaguchi TP, Lagercrantz H, Ringstedt T (2010) Vang-like protein 2 and Rac1 interact to regulate adherens junctions. *J Cell Sci* 123(Pt 3):472-483.

- Liu J, Lin A (2005) Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 15(1):36-42.
- Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, Zhou Z, Shu G, Yin G (2022) Wnt/beta-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther* 7(1):3.
- Liu P, Jiang H, Che M, Fu R, Wang H, Li L, Zhang W, Tao J, Gao S, Shao Z (2018) Abnormal CD25 expression on hematopoietic cells in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 67:12-16.
- Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, Vainchenker W, Chang Y (2008) Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* 112(8):3164-3174.
- Luis TC, Ichii M, Brugman MH, Kincade P, Staal FJ (2012) Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia* 26(3):414-421.
- Macaulay IC, Thon JN, Tijssen MR, Steele BM, MacDonald BT, Meade G, Burns P, Rendon A, Salunkhe V, Murphy RP, Bennett C, Watkins NA, He X, Fitzgerald DJ, Italiano JE, Jr., Maguire PB (2013) Canonical Wnt signaling in megakaryocytes regulates proplatelet formation. *Blood* 121(1):188-196.
- MacCorkle-Chosnek RA, VanHooser A, Goodrich DW, Brinkley BR, Tan TH (2001) Cell cycle regulation of c-Jun N-terminal kinase activity at the centrosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 289(1):173-180.
- Macheda ML, Sun WW, Kugathasan K, Hogan BM, Bower NI, Halford MM, Zhang YF, Jacques BE, Lieschke GJ, Dabdoub A, Stacker SA (2012) The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling. *J Biol Chem* 287(35):29312-29323.
- Machlus KR, Italiano JE, Jr. (2013) The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* 201(6):785-796.
- Mack R, Zhang L, Breslin S, Zhang J (2021) The Fetal-to-Adult Hematopoietic Stem Cell Transition and its Role in Childhood Hematopoietic Malignancies. *Stem Cell Rev Rep* 17(6):2059-2080.
- Mali RS, Kapur S, Kapur R (2014) Role of Rho kinases in abnormal and normal hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 21(4):271-275.
- Martin-Orozco E, Sanchez-Fernandez A, Ortiz-Parra I, Ayala-San Nicolas M (2019) WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. *Front Immunol* 10:2854.
- Martinez-Font E, Perez-Capo M, Ramos R, Felipe I, Garcias C, Luna P, Terrasa J, Martin-Broto J, Vogler O, Alemany R, Obrador-Hevia A (2020) Impact of Wnt/beta-Catenin Inhibition on Cell Proliferation through CDC25A Downregulation in Soft Tissue Sarcomas. *Cancers (Basel)* 12(9).
- Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, Barca A, Macioce G, Giampaolo A, Hassan HJ (2002) Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood* 99(3):888-897.
- Mauch P, Constine L, Greenberger J, Knospe W, Sullivan J, Liesveld JL, Deeg HJ (1995) Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31(5):1319-1339.

- Mendelson A, Frenette PS (2014) Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med* 20(8):833-846.
- Meng A, Wang Y, Van Zant G, Zhou D (2003) Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res* 63(17):5414-5419.
- Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW (2003) Identification of *Vangl2* and *Scrb1* as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423(6936):173-177.
- Moon RT (2005) Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* 2005(271):cm1.
- Morrison SJ, Scadden DT (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505(7483):327-334.
- Nagaoka T, Inutsuka A, Begum K, Bin hafiz K, Kishi M (2014) *Vangl2* regulates E-cadherin in epithelial cells. *Sci Rep* 4:6940.
- Nagata Y, Muro Y, Todokoro K (1997) Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J Cell Biol* 139(2):449-457.
- Neelis KJ, Visser TP, Dimjati W, Thomas GR, Fielder PJ, Bloedow D, Eaton DL, Wagemaker G (1998) A Single Dose of Thrombopoietin Shortly After Myelosuppressive Total Body Irradiation Prevents Pancytopenia in Mice by Promoting Short-Term Multilineage Spleen-Repopulating Cells at the Transient Expense of Bone Marrow–Repopulating Cells. *Blood* 92(5):1586-1597.
- Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM (2007) *Wnt5a* inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39):15436-15441.
- Neumeier J, Meister G (2020) siRNA Specificity: RNAi Mechanisms and Strategies to Reduce Off-Target Effects. *Front Plant Sci* 11:526455.
- Ng CP, Littman DR (2016) *Tcf1* and *Lef1* pack their own HDAC. *Nat Immunol* 17(6):615-616.
- Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, Bertoncello I, Bendall LJ, Simmons PJ, Haylock DN (2005) Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 106(4):1232-1239.
- Nishi K, Sakamaki T, Kao KS, Sadaoka K, Fujii M, Takaori-Kondo A, Miyanishi M (2019) Age-Associated Myeloid Biased Hematopoiesis Depends on Relative Decrease of Short-Term Hematopoietic Stem Cell. *Blood* 134(Supplement_1):2481-2481.
- Nishikii H, Kurita N, Chiba S (2017) The Road Map for Megakaryopoietic Lineage from Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Transl Med* 6(8):1661-1665.
- O'Neill HC, Griffiths KL, Periasamy P, Hinton RA, Hey YY, Petvises S, Tan JK (2011) Spleen as a site for hematopoiesis of a distinct antigen presenting cell type. *Stem Cells Int* 2011:954275.
- Oguro H, Ding L, Morrison SJ (2013) SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell* 13(1):102-116.

- Oguro H, McDonald JG, Zhao Z, Umetani M, Shaul PW, Morrison SJ (2017) 27-Hydroxycholesterol induces hematopoietic stem cell mobilization and extramedullary hematopoiesis during pregnancy. *J Clin Invest* 127(9):3392-3401.
- Oh J, Shin JS (2015) The Role of Dendritic Cells in Central Tolerance. *Immune Netw* 15(3):111-120.
- Olejniczak M, Galka P, Krzyzosiak WJ (2010) Sequence-non-specific effects of RNA interference triggers and microRNA regulators. *Nucleic Acids Res* 38(1):1-16.
- Paganetti H (2023) A review on lymphocyte radiosensitivity and its impact on radiotherapy. *Front Oncol* 13:1201500.
- Parsons BD, Schindler A, Evans DH, Foley E (2009) A direct phenotypic comparison of siRNA pools and multiple individual duplexes in a functional assay. *PLoS One* 4(12):e8471.
- Peradziryi H, Kaplan NA, Podleschny M, Liu X, Wehner P, Borchers A, Tolwinski NS (2011) PTK7/Otk interacts with Wnts and inhibits canonical Wnt signalling. *EMBO J* 30(18):3729-3740.
- Peradziryi H, Tolwinski NS, Borchers A (2012) The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. *Arch Biochem Biophys* 524(1):71-76.
- Pham K, Sacirbegovic F, Russell SM (2014) Polarized cells, polarized views: asymmetric cell division in hematopoietic cells. *Front Immunol* 5:26.
- Pietras EM, Reynaud D, Kang YA, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, Stuart JM, Gottgens B, Passegue E (2015) Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* 17(1):35-46.
- Pietras EM, Warr MR, Passegue E (2011) Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* 195(5):709-720.
- Pillay J, den Braber I, Vriskoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L (2010) In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116(4):625-627.
- Pinal N, Calleja M, Morata G (2019) Pro-apoptotic and pro-proliferation functions of the JNK pathway of *Drosophila*: roles in cell competition, tumorigenesis and regeneration. *Open Biol* 9(3):180256.
- Pinho S, Frenette PS (2019) Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(5):303-320.
- Prebet T, Lhoumeau AC, Arnoulet C, Aulas A, Marchetto S, Audebert S, Puppo F, Chabannon C, Sainty D, Santoni MJ, Sebbagh M, Summerour V, Huon Y, Shin WS, Lee ST, Esterni B, Vey N, Borg JP (2010) The cell polarity PTK7 receptor acts as a modulator of the chemotherapeutic response in acute myeloid leukemia and impairs clinical outcome. *Blood* 116(13):2315-2323.
- Psaila B, Mead AJ (2019) Single-cell approaches reveal novel cellular pathways for megakaryocyte and erythroid differentiation. *Blood* 133(13):1427-1435.
- Puvirajesinghe TM, Bertucci F, Jain A, Scerbo P, Belotti E, Audebert S, Sebbagh M, Lopez M, Brech A, Finetti P, Charafe-Jauffret E, Chaffanet M, Castellano R, Restouin A, Marchetto S, Collette Y, Goncalves A, Macara I, Birnbaum D, Kodjabachian L, Johansen T, Borg JP (2016) Identification of p62/SQSTM1 as a component of non-canonical Wnt VANGL2-JNK signalling in breast cancer. *Nat Commun* 7:10318.

- Razavipour SF, Harikumar KB, Slingerland JM (2020) p27 as a Transcriptional Regulator: New Roles in Development and Cancer. *Cancer Res* 80(17):3451-3458.
- Reynolds A, McDearmid JR, Lachance S, De Marco P, Merello E, Capra V, Gros P, Drapeau P, Kibar Z (2010) VANGL1 rare variants associated with neural tube defects affect convergent extension in zebrafish. *Mech Dev* 127(7-8):385-392.
- Rogan MR, Patterson LL, Wang JY, McBride JW (2019) Bacterial Manipulation of Wnt Signaling: A Host-Pathogen Tug-of-Wnt. *Front Immunol* 10:2390.
- Roszko I, Sawada A, Solnica-Krezel L (2009) Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. *Semin Cell Dev Biol* 20(8):986-997.
- Rothbacher U, Laurent MN, Deardorff MA, Klein PS, Cho KW, Fraser SE (2000) Dishevelled phosphorylation, subcellular localization and multimerization regulate its role in early embryogenesis. *EMBO J* 19(5):1010-1022.
- Rufer N, Brummendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, Schulzer M, Lansdorp PM (1999) Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med* 190(2):157-167.
- Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, Woll PS, Luis TC, Mead A, Moore S, Carella C, Matsuoka S, Bouriez Jones T, Chowdhury O, Stenson L, Lutteropp M, Green JC, Facchini R, Boukarabila H, Grover A, Gambardella A, Thongjuea S, Carrelha J, Tarrant P, Atkinson D, Clark SA, Nerlov C, Jacobsen SE (2013) Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* 502(7470):232-236.
- Schlessinger K, Hall A, Tolwinski N (2009) Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev* 23(3):265-277.
- Shao L, Luo Y, Zhou D (2014) Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal* 20(9):1447-1462.
- Shnitsar I, Borchers A (2008) PTK7 recruits dsh to regulate neural crest migration. *Development* 135(24):4015-4024.
- Singh S, Jakubison B, Keller JR (2020) Protection of hematopoietic stem cells from stress-induced exhaustion and aging. *Curr Opin Hematol* 27(4):225-231.
- Smith EC, Teixeira AM, Chen RC, Wang L, Gao Y, Hahn KL, Krause DS (2013) Induction of megakaryocyte differentiation drives nuclear accumulation and transcriptional function of MKL1 via actin polymerization and RhoA activation. *Blood* 121(7):1094-1101.
- Solomon M, DeLay M, Reynaud D (2020) Phenotypic Analysis of the Mouse Hematopoietic Hierarchy Using Spectral Cytometry: From Stem Cell Subsets to Early Progenitor Compartments. *Cytometry A* 97(10):1057-1065.
- Somorjai IML, Ehebauer MT, Escriva H, Garcia-Fernandez J (2021) JNK Mediates Differentiation, Cell Polarity and Apoptosis During Amphioxus Development by Regulating Actin Cytoskeleton Dynamics and ERK Signalling. *Front Cell Dev Biol* 9:749806.
- Staal FJ, Chhatta A, Mikkers H (2016) Caught in a Wnt storm: Complexities of Wnt signaling in hematopoiesis. *Exp Hematol* 44(6):451-457.
- Stahley SN, Basta LP, Sharan R, Devenport D (2021) Celsr1 adhesive interactions mediate the asymmetric organization of planar polarity complexes. *Elife* 10.

- Stickney DR, Dowding C, Authier S, Garsd A, Onizuka-Handa N, Reading C, Frincke JM (2007) 5-androstenediol improves survival in clinically unsupported rhesus monkeys with radiation-induced myelosuppression. *Int Immunopharmacol* 7(4):500-505.
- Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grunewald E, Cheng T, Dombkowski D, Calvi LM, Rittling SR, Scadden DT (2005) Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 201(11):1781-1791.
- Taichman RS, Emerson SG (1994) Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* 179(5):1677-1682.
- Tanum G (1984) The megakaryocyte DNA content and platelet formation after the sublethal whole body irradiation of rats. *Blood* 63(4):917-920.
- Till JE, McCulloch EA (1961) A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* 14(2):213-222.
- Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M, Zhou L, Komatsu K, Shi D, Fujimori T, Labeau J, Tyteca D, Courtoy P, Poumay Y, Uemura T, Goffinet AM (2010) Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat Neurosci* 13(6):700-707.
- Torban E, Patenaude AM, Leclerc S, Rakowiecki S, Gauthier S, Andelfinger G, Epstein DJ, Gros P (2008) Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(9):3449-3454.
- Unsinger J, Kazama H, McDonough JS, Hotchkiss RS, Ferguson TA (2009) Differential lymphopenia-induced homeostatic proliferation for CD4+ and CD8+ T cells following septic injury. *J Leukoc Biol* 85(3):382-390.
- Van Putten LM, Croon F (1958) The Life Span of Red Cells in the Rat and the Mouse as Determined by Labeling with DFP32 in Vivo. *Blood* 13(8):789-794.
- VanderVorst K, Dreyer CA, Hatakeyama J, Bell GRR, Berg AL, Hernandez M, Lee H, Collins SR, Carraway KL (2022) Wnt/PCP signaling mediates breast cancer metastasis by promoting pro-invasive protrusion formation in collectively motile leader cells. *bioRxiv* 10.1101/2022.01.07.475316:2022.2001.2007.475316.
- Walton A (2019) *Ciblage de la voie de signalisation Wnt dans les cancers mammaires et colorectaux*. Docteur en Pharmacie (Université d'Aix-Marseille, Marseille, France). 141 p. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02177560/document>
- Wang C, Tian C, Zhang Y (2016) The Interaction Between Niche and Hematopoietic Stem Cells. *Indian J Hematol Blood Transfus* 32(4):377-382.
- Wang L, Yang L, Filippi MD, Williams DA, Zheng Y (2006a) Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment. *Blood* 107(1):98-105.
- Wang XJ, Zhang DL, Xu ZG, Ma ML, Wang WB, Li LL, Han XL, Huo Y, Yu X, Sun JP (2014) Understanding cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptors. *J Neurochem* 131(6):699-711.
- Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, Ogawa M, Zhou D (2006b) Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* 107(1):358-366.
- Wehner P, Shnitsar I, Urlaub H, Borchers A (2011) RACK1 is a novel interaction partner of PTK7 that is required for neural tube closure. *Development* 138(7):1321-1327.

- Wen X, Wu Y, Awadasseid A, Tanaka Y, Zhang W (2020) New Advances in Canonical Wnt/beta-Catenin Signaling in Cancer. *Cancer Manag Res* 12:6987-6998.
- Wertheimer T, Velardi E, Tsai J, Cooper K, Xiao S, Kloss CC, Ottmuller KJ, Mokhtari Z, Brede C, deRoos P, Kinsella S, Palikuqi B, Ginsberg M, Young LF, Kreines F, Lieberman SR, Lazrak A, Guo P, Malard F, Smith OM, Shono Y, Jenq RR, Hanash AM, Nolan DJ, Butler JM, Beilhack A, Manley NR, Rafii S, Dudakov JA, van den Brink MRM (2018) Production of BMP4 by endothelial cells is crucial for endogenous thymic regeneration. *Sci Immunol* 3(19).
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lio P, Macdonald HR, Trumpp A (2008) Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135(6):1118-1129.
- Witt CM, Robey EA (2004) The ins and outs of CCR7 in the thymus. *J Exp Med* 200(4):405-409.
- Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi DL, Zheng J (2003) Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* 12(5):1251-1260.
- Wong LL, Adler PN (1993) Tissue polarity genes of Drosophila regulate the subcellular location for prehair initiation in pupal wing cells. *J Cell Biol* 123(1):209-221.
- Wu J, Mlodzik M (2008) The frizzled extracellular domain is a ligand for Van Gogh/Stbm during nonautonomous planar cell polarity signaling. *Dev Cell* 15(3):462-469.
- Xiao X, Lai W, Xie H, Liu Y, Guo W, Liu Y, Li Y, Li Y, Zhang J, Chen W, Shi M, Shang L, Yin M, Wang C, Deng H (2019) Targeting JNK pathway promotes human hematopoietic stem cell expansion. *Cell Discov* 5:2.
- Xie H, Sun Z, Xiao X, Liu D, Qi H, Tian G, Chen M, Chen L, Su X (2022) Transient Inhibition of the JNK Pathway Promotes Human Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Engraftment. *Stem Cells Transl Med* 11(6):597-603.
- Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, Takada S, Nishida E (2002) JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep* 3(1):69-75.
- Yamane T (2018) Mouse Yolk Sac Hematopoiesis. *Front Cell Dev Biol* 6:80.
- Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H (2011) Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* 147(5):1146-1158.
- Yang L, Wang L, Geiger H, Cancelas JA, Mo J, Zheng Y (2007) Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12):5091-5096.
- Yang W, Garrett L, Feng D, Elliott G, Liu X, Wang N, Wong YM, Choi NT, Yang Y, Gao B (2017) Wnt-induced Vangl2 phosphorylation is dose-dependently required for planar cell polarity in mammalian development. *Cell Res* 27(12):1466-1484.
- Yang Y, Mlodzik M (2015) Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind (Wnt). *Annu Rev Cell Dev Biol* 31:623-646.
- Yin H, Copley CO, Goodrich LV, Deans MR (2012) Comparison of phenotypes between different vangl2 mutants demonstrates dominant effects of the Looptail mutation during hair cell development. *PLoS One* 7(2):e31988.

- Yoon KA, Son Y, Choi YJ, Kim JH, Cho JY (2017) Fibroblast growth factor 2 supports osteoblastic niche cells during hematopoietic homeostasis recovery after bone marrow suppression. *Cell Commun Signal* 15(1):25.
- You H, Li Q, Kong D, Liu X, Kong F, Zheng K, Tang R (2022) The interaction of canonical Wnt/beta-catenin signaling with protein lysine acetylation. *Cell Mol Biol Lett* 27(1):7.
- Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J, Lin A (2004) JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 13(3):329-340.
- Yu JJS, Maugarny-Cales A, Pelletier S, Alexandre C, Bellaiche Y, Vincent JP, McGough IJ (2020) Frizzled-Dependent Planar Cell Polarity without Secreted Wnt Ligands. *Dev Cell* 54(5):583-592 e585.
- Yu S, Han R, Gan R (2022a) The Wnt/beta-catenin signalling pathway in Haematological Neoplasms. *Biomark Res* 10(1):74.
- Yu VW, Scadden DT (2016) Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche. *Curr Top Dev Biol* 118:21-44.
- Yu Z, Yang W, He X, Chen C, Li W, Zhao L, Liu L, Liu J, Xie L, Zhang Y, Zheng J (2022b) Endothelial cell-derived angiopoietin-like protein 2 supports hematopoietic stem cell activities in bone marrow niches. *Blood* 139(10):1529-1540.
- Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36(11):1461-1473.
- Zhang K, Yao E, Chuang E, Chen B, Chuang EY, Volk RF, Hofmann KL, Zaro B, Chuang PT (2022) Wnt5a-Vangl1/2 signaling regulates the position and direction of lung branching through the cytoskeleton and focal adhesions. *PLoS Biol* 20(8):e3001759.
- Zhang Y, Zu D, Chen Z, Ying G (2020) An update on Wnt signaling pathway in cancer. *Transl Cancer Res* 9(2):1246-1252.
- Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, Ahamed J, Li L (2014) Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 20(11):1321-1326.
- Zhao M, Ross JT, Itkin T, Perry JM, Venkatraman A, Haug JS, Hembree MJ, Deng CX, Lapidot T, He XC, Li L (2012) FGF signaling facilitates postinjury recovery of mouse hematopoietic system. *Blood* 120(9):1831-1842.
- Zhou BO, Yu H, Yue R, Zhao Z, Rios JJ, Naveiras O, Morrison SJ (2017) Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nat Cell Biol* 19(8):891-903.

12 ANNEXE I

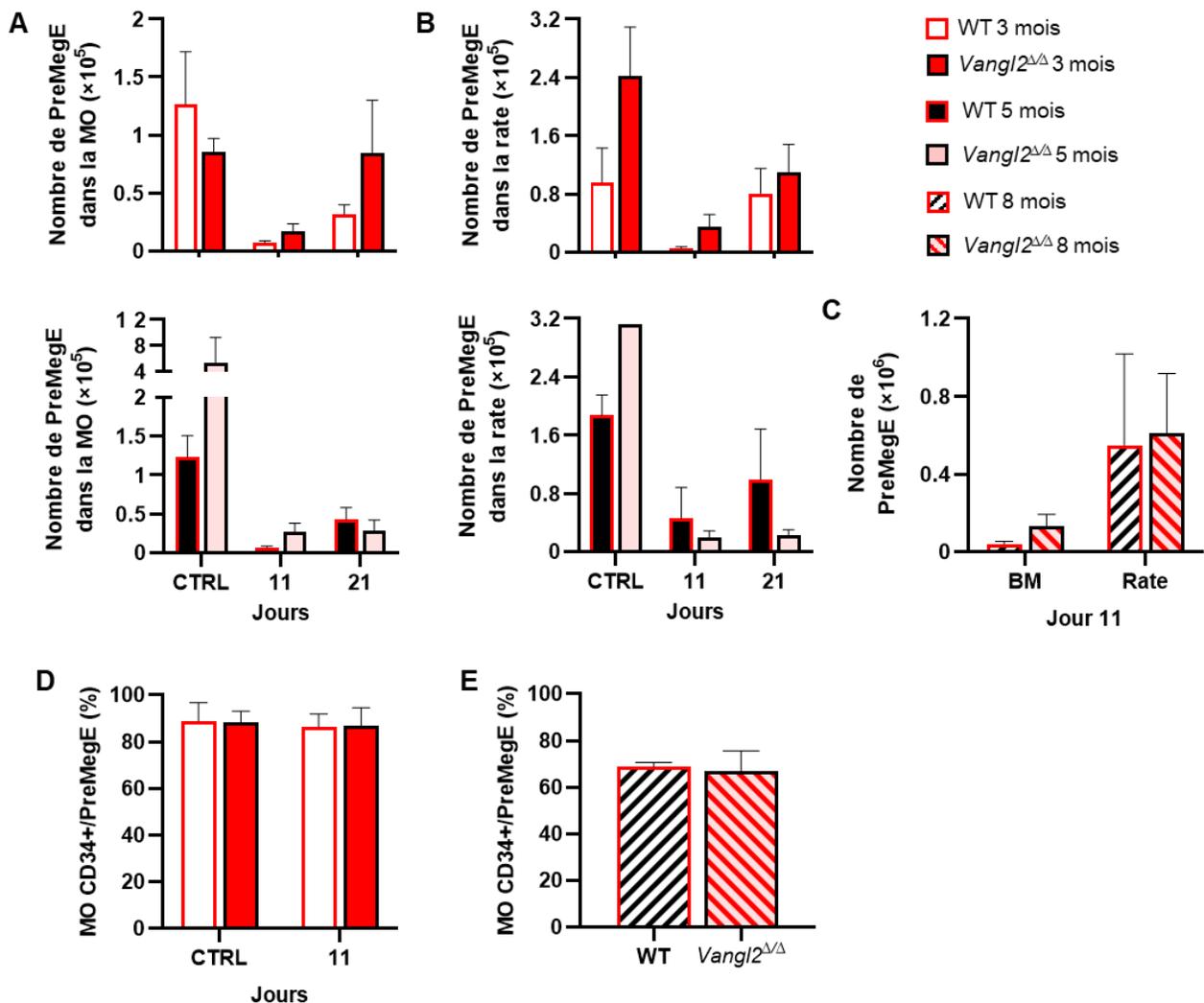


Figure 12.1 Analyse des PreMegE à la suite de l'irradiation

Les histogrammes représentent les PreMegE dans les organes hématopoïétiques recueillis des différents groupes d'âge de souris. (A) Les histogrammes représentent les PreMegE dans les MO des souris de 3 mois et de 5 mois. CTRL (n = 11 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 2 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois), Jour 11 (n = 8 WT 3 mois, n = 7 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois), Jour 21 (n = 8 WT 3 mois, n = 6 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois). (B) Les histogrammes représentent les PreMegE dans la rate des souris de 3 mois et de 5 mois. CTRL (n = 9 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 1 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois), Jour 11 (n = 7 WT 3 mois, n = 6 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois), Jour 21 (n = 8 WT 3 mois, n = 6 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois). (C) L'histogramme représente les PreMegE dans la MO et la rate des souris de 8 mois 11 jours suivant leur irradiation sous-létale. MO (n = 4 WT, n = 6 *Vangl2*^{Δ/Δ}), Rate (n = 4 WT, n = 6 *Vangl2*^{Δ/Δ}). (D) L'histogramme représente le pourcentage de PreMegE qui sont positifs pour CD34 dans la MO des souris de 3 mois. CTRL (n = 2 WT, n = 2 *Vangl2*^{Δ/Δ}), Jour 11 (n = 3 WT, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ}). (E) L'histogramme représente le pourcentage de PreMegE qui sont positifs pour CD34 dans la MO des souris de 8 mois 11 jours suivant leur irradiation sous-létale. (n = 2 WT, n = 2 *Vangl2*^{Δ/Δ}). (A, B) Les données des souris de 3 mois proviennent d'au moins 3 expériences. Les données des souris de 5 mois proviennent d'une (CTRL & Jour 11) à deux (Jour 21) expériences. (C-E) Les données proviennent d'une seule expérience. CTRL = Contrôles non-irradiés.

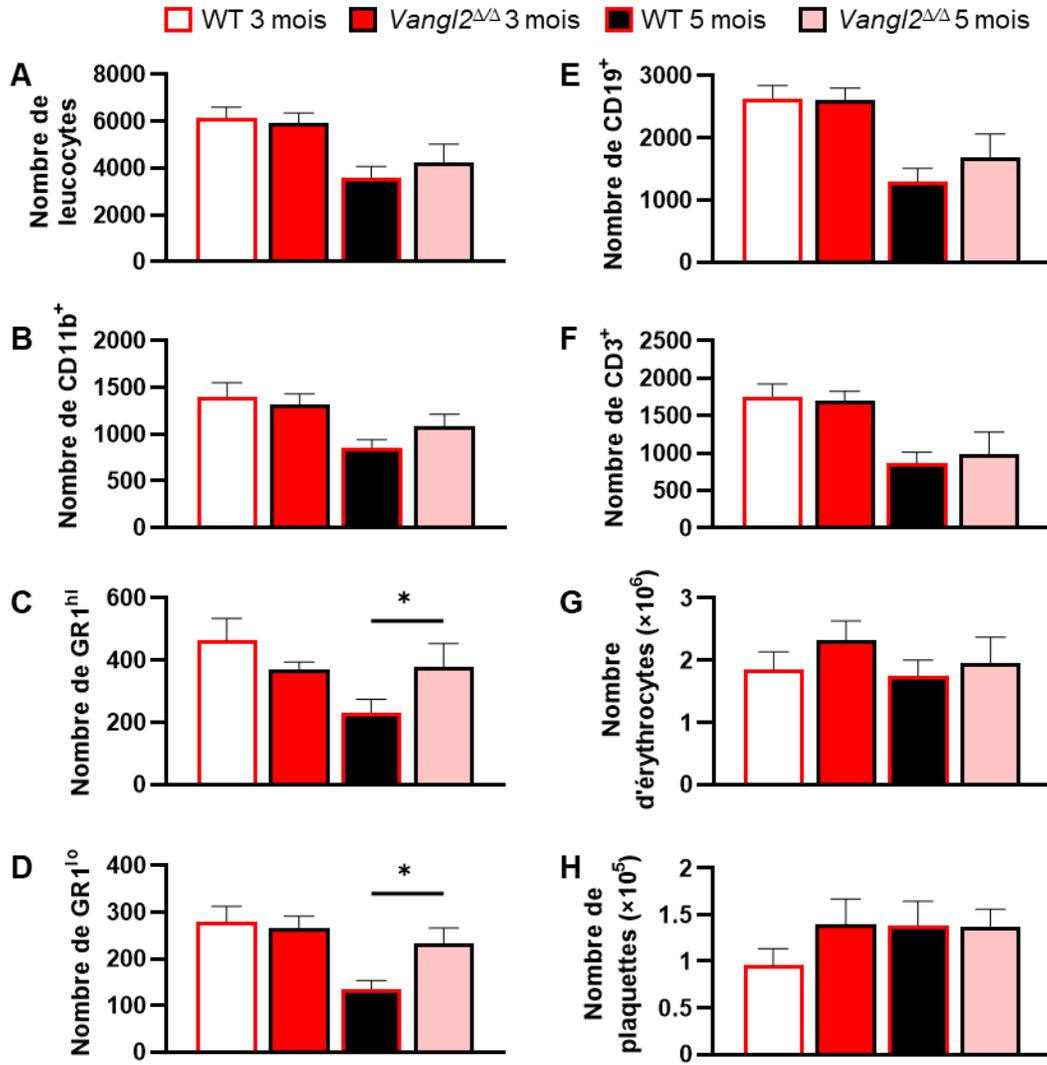


Figure 12.2 Analyse du sang périphérique des souris non-irradiées

Les histogrammes représentent les populations cellulaires des souris contrôles et des souris expérimentales avant leur irradiation. L'histogramme en (C) indique un résultat significatif à la suite du test de Mann-Whitney. n = 24 WT 3 mois, n = 13 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 14 WT 5 mois, n = 9 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois. Les données proviennent d'au moins trois expériences. CTRL = Contrôles non-irradiés.

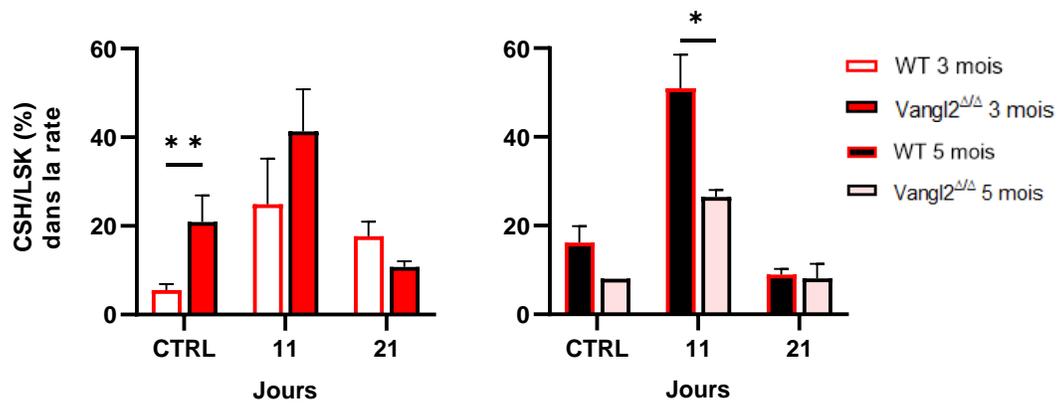


Figure 12.3 Données préliminaires sur les HSPC dans la rate

Les histogrammes représentent le ratio CSH/LSK dans les rates des souris. CTRL (n = 10 WT 3 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 1 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois). Jour 11 (n = 7 WT 3 mois, n = 8 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 5 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois). Jour 21 (n = 8 WT 3 mois, n = 6 *Vangl2*^{Δ/Δ} 3 mois, n = 3 WT 5 mois, n = 3 *Vangl2*^{Δ/Δ} 5 mois). Les données des souris de 3 mois proviennent d'au moins 3 expériences. Les données des souris de 5 mois proviennent d'une (CTRL & Jour 11) à deux (Jour 21) expériences. CTRL = Contrôles non-irradiés.

13 ANNEXE II



Figure 13.1 Culture bactérienne sur de l'agar-kanamycine de DH5 α transformés avec les plasmides de CELSR1-GFP murin et CELSR2-GFP murin

Les photos sont prises 24 heures après l'ensemencement.

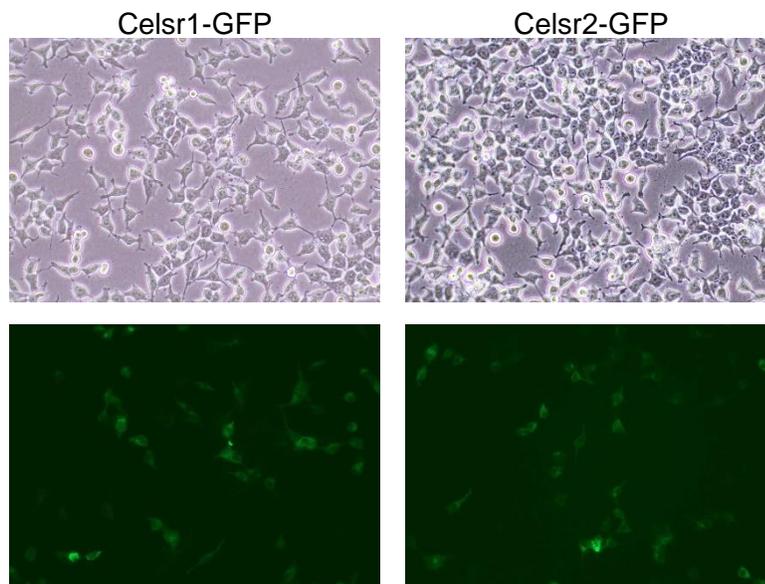


Figure 13.2 Cellules HEK293T à la suite de la transfection des plasmides CELSR1/2-GFP murins
Photos prises avec un microscope à fluorescence NIKON.