

COMMUNICATION

Éradication ou érosion des cellules souches leucémiques : greffes hématopoïétiques et nouvelles molécules

MOTS-CLÉS : cellule souche, leucémie myéloïde chronique, thérapies ciblées

Can we annihilate or erode the Chronic Myelogenous Leukemia stem cells: allogenic bone marrow transplantation and new agents ?

KEY-WORDS: stem cells, Chronic Myelogenous Leukemia, targeted therapies

Philippe ROUSSELOT*, Stéphane PROST.

M. Philippe Rousselot déclare avoir reçu un financement de recherche de la part de la Fondation ARC et de l'association Laurette Fugain en 2008 et 2009 et une subvention de recherche de la part du programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) en 2013. L'auteur déclare n'avoir aucun autre lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

M Stéphane Prost déclare n'avoir aucun autre lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

Remerciements. L'auteur remercie l'équipe du Pr P Leboulch (Institut des Maladies Emergentes et des Thérapies Innovantes, (IMETI), Service des Thérapies Innovantes, (STI), Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives) pour la découverte des effets de la pioglitazone dans la LMC.

RÉSUMÉ

La leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est une maladie clonale de la cellule souche hématopoïétique dont le pronostic a été transformé par l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) qui ciblent la kinase oncogénique Bcr-Abl1. Malgré l'obtention d'une espérance de vie comparable à une population non malade, seulement 10 à 40% des patients atteints de LMC atteignent la réponse moléculaire profonde et sont candidats à des essais d'arrêt de traitement. L'incidence cumulée des rechutes moléculaires après arrêt des ITKs est de l'ordre de 40 à 60%. Même après allogreffe de moelle osseuse, procédure considérée comme le seul traitement potentiellement curateur de la LMC, les rechutes moléculaires ne sont pas exceptionnelles. Ces observations plaident en faveur de la persistance de cellules souches leucémiques (CSLs) de la LMC qui ne sont pas sensibles à l'inhibition de Bcr-Abl1 par les ITKs ou à l'effet des effecteurs allogéniques. Le ciblage des CSLs de la LMC représente une nouvelle voie thérapeutique, en agissant sur des voies de signalisation propres aux CSLs ou par modulation du système immunitaire. Les études pré-cliniques ont identifié des cibles potentielles pour lesquelles des molécules inhibitrices sont disponibles dans la pharmacopée. A titre d'exemple, nous avons pu démontrer que la modulation de STAT5 par la pioglitazone, un agoniste de PPAR γ induit l'érosion du pool des CSLs de la LMC. Ces avancées permettent maintenant d'évaluer cliniquement des stratégies de traitements combinés ou séquentiels entre ces molécules et les ITKs dans l'objectif d'obtenir la guérison de la maladie.

* Service d'Hématologie et d'Oncologie, centre hospitalier de Versailles, 177 rue de Versailles, 78150 Le Chesnay et Inserm UMR 1173, Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris Saclay.

Tirés à part : Professeur Philippe ROUSSELOT, même adresse.

Article reçu le 12 décembre 2016, accepté le 30 janvier 2017

SUMMARY

Chronic Myelogenous Leukemia (CML) is a clonal disorder whose prognosis has been dramatically improved by the use of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) which inhibit the BCR-ABL1 kinase. Despite their life expectancy is comparable to that of the general population, only 10 to 40% of patients achieve the stage of deep molecular response and are candidate for discontinuation studies. The cumulative incidence of molecular relapses observed after TKIs withdrawal is ranging from 40 to 60%. Allogenic bone marrow transplantation is still considered as the only curative therapy for CML although relapses are observed and positivity of the BCR-ABL transcript after transplant is not uncommon. These observations strongly support the persistence of leukemic CML stem cells (LSCs) not targeted by TKIs or the allogenic effect. Targeting the CML LSCs either by inhibiting specific pathways or by activating immune effectors represent promising approaches. Preclinical studies have highlighted potential targets that are “drugable” with commercially available compounds. As an example, we demonstrated that STAT5 modulation by the PPAR γ agonist pioglitazone induced the erosion of the CML LSCs pool. These recent advances provide an exciting opportunity to evaluate the benefit of combined/sequential therapies of selected drugs with TKIs with the aim of cure the disease.

Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) qui fait partie des syndromes myéloprolifératifs est typiquement décrite comme une maladie de la cellule souche hématopoïétique. Le marqueur biologique de la LMC est la présence du chromosome de Philadelphie [1,2] dont la conséquence moléculaire est le gène de fusion BCR-ABL1[3,4]. La protéine chimérique Bcr-Abl1, de par sa portion Abl1, possède une activité tyrosine kinase cytoplasmique et dérégulée responsable du phénotype leucémique [5]. Cette propriété a conduit au développement du premier modèle de thérapie ciblée par inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs) dont le chef de file est l'imatinib mésylate [6]. Les ITKs représentent maintenant le traitement standard de la LMC. Les thérapeutiques ciblées ont révolutionné le pronostic de la LMC et les patients traités ont une espérance de vie comparable à une population non atteinte appariée.

Le concept de cellule souche hématopoïétique a évolué avec le développement des techniques et des tests fonctionnels nécessaires à leur caractérisation. Cette notion a tout d'abord été démontrée chez la souris dans les années 1950 par des expériences de transplantations de souris irradiées à doses létales et l'obtention d'une reconstitution hématopoïétique chez l'animal receveur [7]. La première dénomination de ces cellules a été celle de « *colony-forming unit-spleen* » (CFU-S) devant l'apparition de nodules spléniques visibles 9 à 14 jours après transplantation. Les propriétés qui définissent les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) ont pu être validées dès cette époque : la clonalité, le caractère totipotent, l'auto-renouvellement et la quiescence [8-10]. L'application de ce concept à l'hématopoïèse humaine a été rendue possible grâce aux progrès de la xénotransplantation chez la souris immunodéprimée (*Scid* puis *NOD-Scid*) et celui des cultures clonogènes à long terme (*long term culture initiating cells* ou LTC-IC) puis a abouti à la description du phénotype de la fraction des cellules souches hématopoïétiques (Lin-CD34+CD38-) [11,12]. Une complexité supplémentaire est venue de l'étude de l'environnement

médullaire des CSHs, appelé aussi la niche hématopoïétique qui détermine fonctionnellement les cellules souches [13,14].

La notion de cellules souches leucémiques (CSLs) a émergé parallèlement à celle de CSH, les CSLs ne représentant qu'une fraction des cellules leucémiques [15]. Les CSLs interagissent avec le microenvironnement médullaire et la niche hématopoïétique où elles peuvent trouver les conditions d'échappement aux mécanismes de contrôle et aux traitements anti-leucémiques [16]. S'agissant de la LMC, la cellule souche leucémique est pluripotente, le transcrit *BCR-ABL1* pouvant être retrouvé dans les compartiments myéloïdes et lymphoïdes. Il est possible d'obtenir des colonies *BCR-ABL1* positives en culture à long terme [17] et également de reconstituer des souris immunodéficientes par une hématopoïèse *BCR-ABL1* positive [18]. Il est rapidement apparu que les CSLs de la LMC étaient également quiescentes [19] et naturellement résistantes à l'effet des inhibiteurs de tyrosine kinase [20-23]. Les raisons de cette résistance naturelle sont encore mal comprises, avec en particulier une indépendance à l'oncogène acquise par une réduction drastique de l'expression du gène de fusion *BCR-ABL1* [24].

Ainsi, cibler la quiescence des CSLs de la LMC apparaît comme une stratégie thérapeutique valide *in vivo* [25], à même d'obtenir si ce n'est l'éradication au moins l'érosion des cellules CSL de la LMC. Nos travaux sur le ciblage de la quiescence des CSLs de LMC seront présentés dans cet article.

Allogreffe de cellules souches hématopoïétique.

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques consiste à injecter au patient receveur des cellules souches hématopoïétiques saines issues d'un donneur compatible (HLA identique) issu de la fratrie (allogreffe géno-identique) ou de fichiers de donneurs de moelle osseuse (allogreffe phéno-identique) voire des cellules issues d'autres sources comme le sang fœtal du cordon ombilical (allogreffe de sang de cordon) après avoir administré un traitement immunosuppresseur plus ou moins intensif au receveur (conditionnement). L'allogreffe a longtemps représenté le seul traitement associé à une survie prolongée chez les patients atteints de LMC grâce à la réaction immunologique de la greffe contre la leucémie. Une étude récente débutée avant l'avènement des traitements ciblés et testant l'allogreffe géno-identique en première intention montre un taux de survie à 10 ans de 76% [26]. Actuellement, l'allogreffe n'est plus un traitement de première intention. Même chez les patients allogreffés, des rechutes tardives ont pu être observées suggérant la persistance de CSLs durant des décennies [27]. De façon moins exceptionnelle, à la place d'une négativité complète et persistante, le suivi moléculaire des patients LMC en post greffe peut montrer une positivité du transcrit *BCR-ABL1* de façon fluctuante aboutissant parfois à la rechute [28].

Persistance cellules « souches » leucémiques chez les patients atteints de LMC.

L'exemple clinique le plus élatant de la persistance des CSLs de LMC est celui des tentatives d'arrêts de traitement par ITKs. Le premier essai pilote d'arrêt de traitement par l'imatinib a été mené de 2004 à 2007 chez des 12 patients traités par l'imatinib et ayant obtenus une réponse moléculaire profonde pendant au moins 2 ans, c'est-à-dire l'absence de tout signal moléculaire en lien avec la LMC dans la moelle osseuse ou le sang. Dans les 6 mois ayant suivi l'arrêt du traitement, 6 patients ont vu leur signal *BCR-ABL1* réapparaître, ce qui a conduit à la reprise du traitement et à une nouvelle réponse moléculaire profonde, alors que 6 autres sont restés négatifs sur le long terme [29]. Ces rechutes moléculaires ne s'accompagnent pas de rechutes

hématologiques. Cette dualité entre rechutes moléculaires précoces et réponses persistantes a été retrouvée dans toutes les études d'arrêt de traitement ultérieures, avec la même proportion de 50% de patients en rechute post arrêt, que ce soit avec l'imatinib (étude « STIM » Stop Imatinib ») ou plus récemment avec les ITKs de seconde génération [30-32]. Est-ce à dire que les patients négatifs pour la détection du transcrit BCR-ABL1 sont guéris de la LMC ? Probablement que non, une équipe australienne ayant pu montrer que chez ces patients le réarrangement BCR-ABL1 était toujours détectable au niveau de l'ADN dans la moelle osseuse [33]. De plus, la détection fonctionnelle des cellules LMC capable de former des colonies à long terme reste possible chez des patients LMC répondeurs et traités par l'interféron [34] mais aussi chez des patients en réponse moléculaire complète traités par les ITKs [35]. Ces résultats viennent étayer l'hypothèse de la persistance de cellules souches de la LMC *in vivo* et nous avons pu observer quelques rechutes moléculaires tardives après plus de 3 années d'arrêt de l'imatinib. Il semble toutefois que plus la durée d'exposition à l'imatinib est importante, plus le risque de rechute moléculaire après arrêt des ITKs est faible [36], suggérant une érosion spontanée très lente du pool des CSLs de LMC. Des modélisations mathématiques ont été proposées pour rendre compte de ce phénomène [37].

Stratégies pour cibler les cellules souches leucémiques de la LMC *in vivo*.

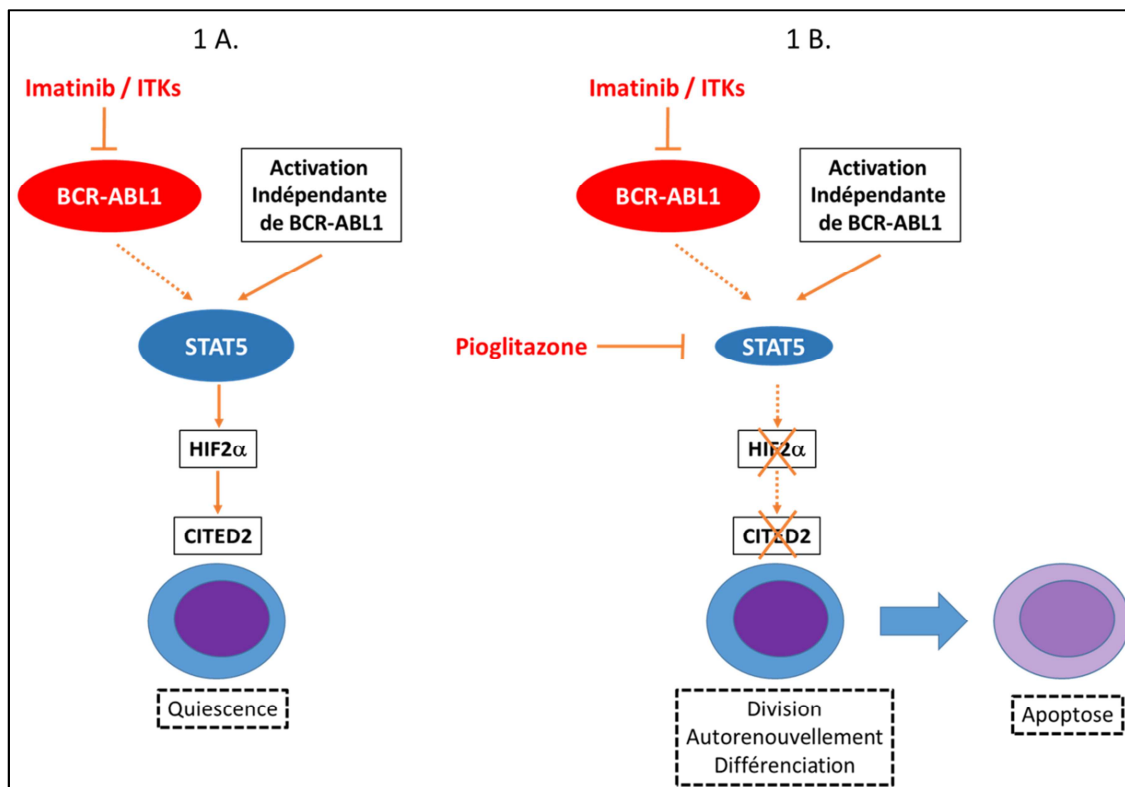
L'étude des patients ayant participé aux essais d'arrêts de traitement par ITKs suggère des mécanismes de contrôle des CSLs. Nous avons mené un essai d'arrêt de l'imatinib (essai A-STIM) chez des patients en réponse moléculaire profonde en changeant le critère de reprise du traitement : au lieu de considérer les patients qui perdent la réponse moléculaire complète comme étant en rechute, le traitement n'a été repris qu'en cas de perte de la réponse moléculaire majeure (RMM), ce qui correspond à un taux de transcrit *BCR-ABL1* à 0,1%. La proportion des patients sans traitement est passée de 41% à 61%, soit un gain de 20% [31]. Ce gain est pérenne, il ne s'agit pas d'un simple retard à la reprise de l'ITK. Une nouvelle catégorie de patients présentant des fluctuations des taux de transcrits *BCR-ABL1* en deçà du seuil de la RMM est ainsi décrite. Ces fluctuations sont durables dans le temps, avec des profils évoquant soit un mécanisme de contrôle immun, soit un mécanisme d'exhaustion des cellules souches avec extinction du signal. Des études immunologiques préliminaires ayant porté sur le phénotype des effecteurs immunologiques montrent un rôle possible du nombre de cellules NK avant arrêt [38,39]. D'un autre côté, nous avons mené des expériences de tri cellulaire montrant une restriction du signal *BCR-ABL1* dans la lignée granulocytaire ce qui fait évoquer une perte de fonctionnalité de ces cellules [31].

Dès lors, comment cibler les cellules souches de la LMC afin d'accélérer une érosion spontanée beaucoup trop lente ? De nombreuses cibles impliquées dans la biologie des CSHs normales ont été proposées. La voie de signalisation Hedgehog indispensable à la persistance des cellules souches a été ciblée la première en utilisant les inhibiteurs de SMO [40]. Ces composés se sont avérés avoir une toxicité importante sur les cellules souches de différents tissus comme la peau, les phanères ou les dents, rendant difficile leur utilisation clinique. Une autre approche a été de cibler la voie « Wnt/beta-catenin » responsable de la progression de la LMC vers la phase transformée de la maladie [41]. Le ciblage de voies plus spécifiques des CSLs devrait s'avérer plus fructueux en permettant d'augmenter l'index thérapeutique des molécules testées. Une équipe libanaise a pu montrer que la combinaison de l'interféron et de l'arsenic trioxide (utilisé dans la leucémie aigue promyélocytaire) réduisait la quantité de CSLs LMC dans un modèle murin [42]. Plus récemment, une équipe américaine a rapporté l'intérêt de la combinaison d'un inducteur de l'apoptose avec les ITKs pour éradiquer les cellules souches de la LMC [43].

Erosions des cellules souches de la LMC par les agonistes de PPAR γ .

Notre approche pour cibler les cellules souches de la LMC a été de contrer la résistance aux ITKs induite par la quiescence. Nous avons décrit une nouvelle voie de modulation de l'expression de STAT5 [44], un transducteur majeur du signal généré par Bcr-Abl1 et les conséquences de son activation dans les cellules *BCR-ABL1* positives issues de patients atteints de LMC. Cette modulation peut être obtenue en activant la voie PPAR γ par un ligand, la pioglitazone, ce qui conduit à l'inhibition de l'expression de STAT5. Dans un modèle de lignées BCR-ABL positives et dans un modèle de cellules CD34+ issue de sang placentaire transduites pour exprimer *BCR-ABL1*, cette diminution de l'expression de STAT5 agit en synergie avec les ITKs pour induire l'apoptose. En utilisant des techniques de marquage cytoplasmique des cellules CD34+ BCR-ABL+ et des techniques de cultures à long terme (LTC-IC), nous avons démontré que l'administration de la pioglitazone conduit à l'entrée en cycle de la très grande majorité des cellules quiescentes et à la restauration de leur sensibilité aux ITKs. Cet effet se traduit par une érosion du pool des cellules souches LMC capables de former des colonies à long terme. Il a pu être possible, après tri des cellules quiescentes, de montrer par des études d'extinction de gènes que la pioglitazone induisait la perte d'expression de HIF2 (« hypoxia-inducible factor »), nécessaire au maintien de la quiescence des cellules souches BCR-ABL positives (Figure 1) [45].

Figure 1. Modèle de l'effet de la pioglitazone sur les cellules souches de la LMC.



1 A. L'activation résiduelle de STAT5 malgré l'inhibition de Bcr-Abl1 par les ITKs conduit à l'expression de HIF2 α et à celle de CITED2, facteurs normalement induits par l'hypoxie de la niche hématopoïétique. Cette activation anormale conduit à la quiescence des cellules souches leucémiques et à leur résistance à l'imatinib. **1 B.** La pioglitazone active PPAR γ et diminue fortement l'expression de STAT5. L'absence de signalisation via STAT5 bloque l'induction de HIF2 α et de CITED2. Les CSLs de la LMC sortent alors de quiescence et deviennent sensibles à l'effet des ITKs.

Trois patients atteints de LMC ont pu recevoir la pioglitazone en association avec l'imatinib, deux patients diabétiques et un patient non diabétique. Le traitement combiné a été très bien toléré, la pioglitazone n'ayant pas de propriétés hypoglycémiantes par elle-même. Ces trois patients ont obtenu une réponse moléculaire durable, même après arrêt de la pioglitazone lors de son retrait du marché en 2011 [45]. Ces premières observations cliniques ont conduit à l'activation d'un essai clinique (essai ACTIM, Actos + Imatinib, EUDRACT n° 2009-011675-79) testant l'ajout de la pioglitazone chez des patients atteints de LMC, traités par l'imatinib, et n'ayant jamais atteint un niveau de réponse moléculaire profonde. L'objectif principal de l'essai ACTIM a été de déterminer la tolérance et l'efficacité de la pioglitazone en combinaison avec l'imatinib. Les patients éligibles étaient traités par l'imatinib depuis au moins deux années, étaient en réponse cytogénétique complète sans avoir atteints la réponse moléculaire complète. Le critère de jugement pour l'efficacité a été l'incidence cumulée sur 12 mois de l'obtention d'une réponse moléculaire profonde (de niveau MR4.5 soit 0,0032% de transcrit *BCR-ABL1*). Il n'y a pas eu d'effets secondaires graves rapportés au traitement par la pioglitazone. Les deux effets secondaires rapportés ont été une prise de poids de 1 kg en moyenne et une diminution du taux d'hémoglobine de 0,5 point. Malgré l'interdiction de la pioglitazone en France en 2011, il a été possible de poursuivre l'essai après autorisation de l'AFSSAPS à l'époque (actuellement l'ANSM) sous réserve d'une durée maximale d'administration de 12 mois et de la mise en place d'une surveillance vésicale systématique durant 5 ans (bandelettes urinaires et échographie vésicale). Aucun effet secondaire vésical n'a été observé durant toute la durée d'observation des patients. Le signal de sur-risque de cancer de vessie n'a pas été confirmé depuis par deux larges études épidémiologiques et la pioglitazone reste autorisée aux Etats-Unis et dans la plupart des pays européens. Malgré ces obstacles, l'essai a été positif en remplissant son objectif principal avec une l'incidence cumulée d'obtention de la RM4.5 sur 12 mois a été de 56% contre 23% dans une cohorte contrôle [46].

Comment tester une multitude d'effecteurs ciblant les cellules souches de la LMC : le programme ACTIW.

L'étude ACTIW (Imatinib plus X) fait suite à l'étude ACTIM. Cette étude vise à sélectionner suivant un plan adaptatif des molécules d'intérêt capables d'induire la réponse moléculaire profonde des patients atteints de LMC (MR4.5) en ciblant les cellules souches quiescentes. Le bras contrôle consiste en la simple poursuite du traitement par inhibiteur de tyrosine kinase que reçoit déjà le patient avant son inclusion dans le cadre de l'AMM de chaque molécule. La probabilité d'obtention spontanée d'une réponse moléculaire profonde par la simple poursuite des ITKs en monothérapie est estimée par le bras contrôle. Les patients sont randomisés 2/1 entre le bras expérimental et le bras contrôle. L'étude ACTIW (EUDRACT N° : 2015-005208-26) a inclus les premiers patients en Novembre 2016 avec comme premier bras expérimental le bras pioglitazone. Un bras testant un modulateur du système immunitaire ainsi qu'un bras testant un inducteur d'apoptose devraient être prochainement activés.

Vers une définition phénotypique de la cellule souche LMC.

Si la détection du transcrit *BCR-ABL1* ne permet pas d'apprécier la persistance de CSLs de la LMC chez les patients sous traitement, de nouvelles méthodes d'évaluation sont nécessaires. Nous l'avons vu, il est difficile et fastidieux de rechercher les CSLs dans la moelle osseuse des patients par des tests fonctionnels et il semble de plus que les résultats ne soient pas prédictifs du

devenir des patients après arrêt des ITKs [35]. L'antigène CD26 a été récemment proposé comme un marqueur phénotypique des CSLs de la LMC couplé avec le marquage CD34+CD38- évoqué au début de ce manuscrit [47]. Une communication lors du dernier congrès de l'American Society of Hematology en 2016 suggère que les cellules CD34+CD38-CD26+ peuvent être détectées dans le sang circulant de patients atteints de LMC et traités par ITKs. Ce marquage est détecté même en cas de détection négative du transcrite *BCR-ABL1* ce qui ouvre la porte à de nouvelles modalités de suivi des patients et des traitements anti-CSLs [48].

Conclusion

La persistance des cellules souches leucémiques est l'élément déterminant de la rechute de la maladie leucémique. Dans le cas de la LMC, ces cellules persistent sous traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase et représentent un frein à l'arrêt du traitement lorsque la réponse moléculaire profonde est atteinte de façon stable. Le ciblage des CSLs de la LMC est l'enjeu actuel du traitement de cette hémopathie. Nous avons proposé l'utilisation de la pioglitazone après avoir validé *in vitro* les effets de cet agoniste de PPAR γ sur la quiescence des CSLs, afin de les rendre à nouveau sensibles aux ITKs. D'autres approches sont possibles qui pourraient aboutir à la guérison de la LMC.

RÉFÉRENCES

- [1] Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.* 1960;25:85-109.
- [2] Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine, fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973; 243: 290-3.
- [3] Bartram CR, Deklein A, Hagemeijer A, *et al.* Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1983;306:277-80.
- [4] Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, *et al.* Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.*1984;36:93-9.
- [5] Daley G, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210 bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:9312-16.
- [6] Druker BJ. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell.* 2002;1:31-6.
- [7] Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK *et al.* Recovery from radiation injury. *Science.* 1951;113:510-511.
- [8] McCulloch EA, Till JE. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res.* 1960;13:115-25.
- [9] Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14:213-22.
- [10] Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963;197:452-4.
- [11] Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, *et al.* Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science.* 1992;255:1137-41.

- [12] Notta F, Doulatov S, Laurenti E, *et al.* Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. 2011;333:218-21.
- [13] Scadden DT. Nice neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche. *Cell*. 2014;157:41-50.
- [14] Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505:327-34.
- [15] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3:730-7.
- [16] Konopleva M, Tabe Y, Zeng Z, *et al.* Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug Resist Updat*. 2009;12:103-13.
- [17] Coulombel L, Kalousek DK, Eaves CJ, *et al.* Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 1983;308:1493-98.
- [18] Wang JC, Lapidot T, Cashman JD, *et al.* High level engraftment of NOD/SCID mice by primitive normal and leukemic hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood*. 1998;91:2406-14.
- [19] Holyoake T, Jiang X, Eaves C, *et al.* Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1999;94:2056-64.
- [20] Chu S, McDonald T, Lin A, *et al.* Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood*. 2011;118:5565-72.
- [21] Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, *et al.* Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002;99:319-325.
- [22] Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, *et al.* Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 2006;107:4532-39.
- [23] Jorgensen HG, Allan EK, Jordanides NE, *et al.* Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood*. 2007;109:4016-19.
- [24] Kumari A, Brendel C, Hochhaus A, *et al.* Low BCR-ABL expression levels in hematopoietic precursor cells enable persistence of chronic myeloid leukemia under imatinib. *Blood*. 2012;119:530-39.
- [25] Essers MA, Trumpp A. Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy. *Mol Oncol*. 2010;4:443-50.
- [26] Gratwohl A, Pfirrmann M, Zander A *et al.* Long term outcome of patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia: a randomized comparison of stem cell transplantation with drug treatment. *Leukemia*. 2016;30:562-569.
- [27] Arcese W, Goldman JM, D'Arcangelo E, *et al.* Outcome for patients who relapse after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. Chronic Leukemia Working Party. European Bone Marrow Transplantation Group. *Blood*. 1993;82:3211-9.
- [28] Kaeda J, O'Shea D, Szydlo RM, *et al.* Serial measurement of BCR-ABL transcripts in the peripheral blood after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia: an attempt to define patients who may not require further therapy. *Blood*. 2006;107:4171-6.
- [29] Rousselot P, Huguet F, Rea D, *et al.* Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood*. 2007;109:58-60.

- [30] Mahon FX, Réa D, Guilhot J, *et al.* Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:1029-35.
- [31] Rousselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, *et al.* Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J Clin Oncol.* 2014;32:424-30.
- [32] Rea D, Nicolini FE, Tulliez M, *et al.* Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. *Blood.* 2016 Dec 8. [Epub ahead of print].
- [33] Ross DM, Branford S, Seymour JF, *et al.* Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia.* 2010; 24:1719-24.
- [34] Chomel JC, Sorel N, Guilhot J, *et al.* BCR-ABL expression in leukemic progenitors and primitive stem cells of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2012;119:2964-65.
- [35] Chomel JC, Bonnet ML, Sorel N, *et al.* Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients in deep molecular response induced by tyrosine kinase inhibitors and the impact of therapy discontinuation. *Oncotarget.* 2016;7:35293-301.
- [36] Etienne G, Guilhot J, Rea D, *et al.* Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia Published. *J Clin Oncol.* Online ahead of print at www.jco.org on October 3, 2016.
- [37] Lenaerts T, Pacheco JM, Traulsen A, *et al.* Tyrosine kinase inhibitor therapy can cure chronic myeloid leukemia without hitting leukemic stem cells *Haematologica* 2010 95: 900-7.
- [38] Ilander MM, Olsson-Strömberg U, Lähteenmäki H, *et al.* Disease relapse after TKI discontinuation in CML is related both to low number and impaired function of NK-cells: Data from Euro-SKI. *Blood.* 2015; Annual meeting abstract 379.
- [39] Rea D, Dulphy N, Henry G, *et al.* Low natural killer (NK) cell counts and functionality are associated with molecular relapse after imatinib discontinuation in patients with chronic phase (CP)-chronic myeloid leukemia (CML) with undetectable BCR-ABL transcripts for at least 2 years: preliminary results from Immunostim, on behalf of STIM investigators. *Blood.* 2015; Annual meeting abstract 856.
- [40] Irvine DA, Zhang B, Kinstrie R, *et al.* Deregulated hedgehog pathway signaling is inhibited by the smoothed antagonist LDE225 (Sonidegib) in chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Sci Rep.* 2016;6:25476.
- [41] Suknuntha K, Thita T, Togarrati PP, *et al.* Wnt signaling inhibitor FH535 selectively inhibits cell proliferation and potentiates imatinib-induced apoptosis in myeloid leukemia cell lines. *Int J Hematol.* 2016 Oct 20. [Epub ahead of print].
- [42] El Eit RM, Iskandarani AN, Saliba JL, *et al.* Effective targeting of chronic myeloid leukemia initiating activity with the combination of arsenic trioxide and interferon alpha. *Int J Cancer.* 2014;134:988-96.

- [43] Carter BZ, Mak PY, Mu H, *et al.* Combined targeting of BCL-2 and BCR-ABL tyrosine kinase eradicates chronic myeloid leukemia stem cells. *Sci Transl Med.* 2016;8:355ra117.
- [44] Prost S, Le Dantec M, Augé S, *et al.* Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPAR γ /STAT5 signaling pathway in macaques. *J Clin Invest.* 2008;118:1765-75.
- [45] Prost S, Relouzat F, Spentchian M, *et al.* Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature.* 2015;525:380-3.
- [46] Rousselot P, Prost S, Guilhot J, *et al.* Pioglitazone together with Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia: a proof of concept study. *Cancer.* 2016 Dec 27. [Epub ahead of print].
- [47] Valent P, Sadovnik I, Ráčil Z, *et al.* DPPIV (CD26) as a novel stem cell marker in Ph+ chronic myeloid leukaemia. *Eur J Clin Invest.* 2014;44:1239-45.
- [48] Bocchia M, Aprile L, Sirianni S, *et al.* Peripheral blood flow-cytometry chronic myeloid leukemia stem cells detection and quantification during tyrosine kinase inhibitors therapy. *Blood.* 2016. Annual meeting abstract 942.