

Université de Montréal

**La collaboration entre l'oncogène *E2A-PBX1* et *Hoxa9*
lors de l'induction de B-ALL implique l'activation de *Flt3***

Par

Mona Hassawi

Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Science (M.Sc.)
en Biologie Moléculaire

Décembre, 2012

© Mona Hassawi, 2012

Résumé

La protéine de fusion E2A-PBX1 induit une leucémie lymphoblastique aigüe des cellules B pédiatrique chez l'humain. E2A-PBX1 possède de puissantes propriétés de trans-activation et peut se lier à l'ADN ainsi qu'aux protéines homéotiques (HOX) via des domaines conservés dans sa portion PBX1, ce qui suggère qu'une dérégulation des gènes cibles de HOX/PBX1 contribue à la leucémogénèse. Précédemment, Bijl et al. (2008) ont démontré que certains gènes *Hox* collaborent de manière oncogénique avec *E2A-PBX1*, et que ces interactions sont cellules-spécifiques et varient en fonction du gène *Hox* impliqué. Une mutagénèse d'insertion provirale suggère et supporte la collaboration des gènes *Hoxa* et *E2A-PBX1* lors de la leucémogénèse des cellules B. La présence de ces interactions dans les cellules B et leur implication dans l'induction des B-ALL est pertinente pour la compréhension de la maladie humaine, et reste encore mal comprise. Notre étude démontre qu'*Hoxa9* confère un avantage prolifératif aux cellules B *E2A-PBX1*. Des expériences de transplantation à l'aide de cellules B *E2A-PBX1/Hoxa9* positives isolées de chimères de moelle osseuse démontrent qu'*Hoxa9* collabore avec *E2A-PBX1* en contribuant à la transformation oncogénique des cellules, et qu'*Hoxa9* seul n'induit aucune transformation. Une analyse par Q-RT-PCR nous a permis de démontrer une forte inhibition de gènes spécifiques aux cellules B dans les leucémies co-exprimant *Hoxa9* et *E2A-PBX1*, en plus d'une activation de *Flt3*, suggérant une inhibition de la différenciation des cellules B accompagnée d'une augmentation de la prolifération. De plus, la surexpression de *Hoxa9* dans des cellules leucémiques de souris transgéniques *E2A-PBX1*, confère aussi un avantage prolifératif aux cellules in vitro, qui semblent être influencé par une augmentation de l'expression de *Flt3* et *Pdgfδ*. En conclusion, nous démontrons pour la première fois à l'aide d'un modèle murin qu'*Hoxa9* collabore avec *E2A-PBX1* lors de la transformation oncogénique des

cellules B et que la signalisation via *Flt3* est impliquée, ce qui est potentiellement pertinent pour la maladie humaine.

Mots-clés : E2A-PBX1, *Hoxa9*, leucémie des cellules B, modèle murin, *Flt3*

Abstract

The fusion protein E2A-PBX1 induces pediatric B cell leukemia in human. It has strong transactivating properties and can bind to DNA and homeobox (HOX) proteins through conserved domains in the PBX1 portion, suggesting that deregulation of HOX/PBX target genes contribute to leukemogenesis. Previously, we reported oncogenic interactions between *Hox* genes and *E2A-PBX1*, which are dependent on cell type as well as on the particular *Hox* member. A proviral insertional mutagenesis screen provided support for collaboration between *Hoxa* genes and *E2A-PBX1* in B cell leukemogenesis. Whether these interactions occur in B cells and lead to B-ALL, relevant for human disease is still not clear. Here we report that *Hoxa9* confers a proliferative advantage to *E2A-PBX1* B cells. Transplantation experiments with *E2APBX1/Hoxa9* positive B cells isolated from bone marrow (BM) chimeras showed that *Hoxa9* interacts with *E2A-PBX1* contributing to the oncogenic transformation of B cells, but is unable to transform B cells alone. Q-RT-PCR analysis demonstrated a strong repression of B cell specific genes in leukemias co-overexpressing *Hoxa9* and *E2A-PBX1* in addition to *Flt3* activation, indicating inhibition of B cell differentiation in combination with enhanced proliferation. Overexpression of *Hoxa9* in *E2A-PBX1* mouse leukemic B cells also resulted in a growth advantage *in vitro*, likely mediated by the enhanced expression of *Flt3* and *Pdgf δ* . In conclusion we show for the first time that *Hoxa9* collaborates with *E2A-PBX1* in the oncogenic transformation of B cells in a mouse model that involves *Flt3* signaling, which is potentially relevant to human disease.

Keywords: E2A-PBX1, *Hoxa9*, B cell leukemia, mouse model, *Flt3*

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	x
Liste des abréviations utilisées.....	xii
Remerciements.....	xv
Chapitre 1. Introduction	1
Hématopoïèse normale.....	1
1.1.1 Développement et différenciation des lymphocytes B	3
1.1.2 Régulation de la différenciation des lymphocytes B par les cytokines... 4	
1.1.3 Contrôle transcriptionnel de la différenciation des cellules B	6
1.2 Leucémie lymphoblastique aigüe.....	11
1.2.1 Translocation chromosomique t(1;19)(q23;p13)	12
1.3 Structure et fonction du gène <i>E2A</i>	12
1.4 Structure et fonction de <i>PBX1</i>	13
1.5 E2A-PBX1 est un activateur transcriptionnel oncogénique	15
1.5.1 Contribution oncogénique de E2A.....	16
1.5.2 Contribution oncogénique de PBX1	17
1.5.3 Gènes cibles et voies de signalisation affectées par E2A-PBX1	18
1.6 Les gènes <i>Hox</i>	19
1.6.1 Caractérisations moléculaires générales des gènes <i>Hox</i>	20
1.6.2 Cofacteurs des gènes <i>Hox</i>	21
1.6.3 Implication des gènes <i>Hox</i> lors de l'hématopoïèse normale.....	23
1.6.4 Dérégulation des gènes <i>Hox</i> et leucémie	24
Développement d'une hypothèse	25
1.7.1 Hypothèse de recherche	27
1.7.2 But et objectifs spécifiques	27

Chapitre 2. Matériel et Méthodes.....	29
Chapitre 3. Résultats	33
3.1 Les gènes <i>Hoxa</i> sont exprimés à différents niveaux dans les B-ALL E2A-PBX1 humaines.....	33
3.2 Expression des gènes <i>Hoxa</i> dans des cellules B murines <i>E2A-PBX1</i> leucémiques et <i>E2A-PBX1</i> non-leucémiques.....	35
3.3 Cultures in vitro de cellules B <i>E2A-PBX1</i> surexprimant <i>Hoxa9</i>	37
3.4 Évaluation de l'interaction entre <i>E2A-PBX1</i> et <i>Hoxa9</i> lors de la leucémogénèse des cellules B	40
3.5 Surexpression de <i>Hoxa9</i> dans les leucémies <i>E2A-PBX1</i> primaires établies	46
3.6 Altération des profils d'expression des gènes en présence de <i>Hoxa9</i>	51
3.7 Identification de gènes cibles de la protéine de fusion E2A-PBX1 dans des B-ALLs murines primaires par microarray.....	53
Chapitre 4. Discussion	64
4.1 Dérégulation de l'expression des gènes <i>Hoxa</i> lors de B-ALLs murines et humaines induites par E2A-PBX1	64
4.2 <i>Hoxa9</i> confère un avantage prolifératif aux cellules B <i>E2A-PBX1</i> in vitro.	66
4.3 Collaboration entre <i>Hoxa9</i> et <i>E2A-PBX1</i> lors de B-ALL murine.....	67
4.4 La collaboration entre <i>E2A-PBX1</i> et <i>Hoxa9</i> lors de la B-ALL implique l'activation de <i>Flt3</i>	69
4.5 <i>Hoxa9</i> induit une dérégulation des gènes lymphoïde-spécifiques en présence de E2A-PBX1	72
4.6 Dérégulation de l'expression de <i>Zap70</i> et <i>Egr1</i> en présence de l'oncogène E2A-PBX1	73
4.7 Directions futures.....	76
4.7.1 Évaluation de la dépendance des gènes <i>Hoxa</i> lors de la génération et le maintien de la leucémie des cellules B induite par E2A-PBX1.....	76
4.7.2 Caractérisation des interactions HOX-E2A-PBX1 au niveau protéique	77
4.8 Conclusion	77

Bibliographie..... 80

Liste des tableaux

Table I. Collaboration entre <i>Hoxa9</i> et <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} lors de la leucémogénèse des cellules B.	43
Table II. Immunophénotype des leucémies primaires et de leurs leucémies secondaires correspondantes exprimant <i>Hoxa9</i> ou contrôles.	44
Table III. Caractérisation hématopoïétique et potentiel de croissance in vitro de B-ALL <i>E2A-PBX1</i> primaires.	49
Table IV. Gènes différentiellement exprimés dans les cellules leucémiques #225 et #111 surexprimant <i>Hoxa9</i>	52
Table V. Différents groupes expérimentaux de cellules pré-B soumis à l'analyse par microarray.	54
Table VI. Cellules <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} leucémiques provenant des tissus hématopoïétiques primaires leucémiques soumises à l'analyse par microarray.	54
Table VII. Gènes différentiellement exprimés entre les cellules pré-B <i>E2A-PBX1</i> pré-leucémiques et contrôles.	56
Table VIII. Processus biologiques impliquant des gènes qui sont différentiellement exprimé entre les cellules <i>E2A-PBX1</i> leucémiques et pré-B <i>E2A-PBX1</i> pré-leucémiques présentant un taux d'enrichissement significatif déterminés à l'aide de la plateforme D.A.V.I.D.	58
Table IX. Top 10 des voies de signalisation KEGG impliquant des gènes qui sont différentiellement exprimé entre les cellules <i>E2A-PBX1</i> leucémiques et pré-B <i>E2A-PBX1</i> pré-leucémiques.	59
Table X. Processus biologiques impliquant des gènes qui sont différentiellement exprimé entre les cellules <i>E2A-PBX1</i> leucémiques et contrôles présentant un taux d'enrichissement significatif déterminés à l'aide de la plateforme D.A.V.I.D.	62

Table XI. Gènes impliqués dans les processus biologiques les plus enrichis entre les cellules E2A-PBX1 leucémiques et contrôles présentant un taux d'enrichissement significatif déterminés à l'aide de la plateforme D.A.V.I.D.
..... 63

Liste des figures

Figure 1. Hématopoïèse et facteurs de transcription.....	2
Figure 2. Développement des cellules B.....	4
Figure 3. Spécification et restriction de la lignée B par la répression de <i>Flt3</i> par <i>Pax5</i>	10
Figure 4. Fusion de <i>E2A</i> et <i>PBX1</i> lors de la translocation t(1;19) causant la B-ALL de type pré-B.....	16
Figure 5. Représentation schématisée de l'organisation chromosomique des gènes à homéodomaine de Classe I (<i>Hox</i>).....	21
Figure 6. Liaison des protéines <i>Hox</i> de chaque groupe paralogue avec un partenaire à homéodomaine non- <i>Hox</i>	22
Figure 7. Expression des gènes <i>HOXA</i> dans les cellules de moelle osseuse provenant de patient atteints de B-ALL induites par <i>E2A-PBX1</i>	34
Figure 8. Expression des gènes <i>Hoxa</i> pour des cellules B provenant de souris transgéniques <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} leucémiques, pré-leucémiques ou contrôles.....	36
Figure 9. Analyse des cellules B <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} surexprimant <i>Hoxa9</i> ou contrôle GFP.....	39
Figure 10. Analyse In vivo de cellules B <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} infectées de manière rétrovirale avec <i>Hoxa9</i> ou contrôles.....	41
Figure 11. Expression différentielle des gènes impliqués dans la différenciation des cellules B <i>Flt3</i> , <i>Ebfl</i> et <i>Pax5</i> dans des leucémies induites par <i>E2A-PBX1/Hoxa9</i>	45
Figure 12. Analyse de cellules leucémiques <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} sur exprimant <i>Hoxa9</i> ou contrôle.....	47
Figure 13. Analyse phénotypiques des leucémies murines induite par des cellules leucémiques <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} surexprimant <i>Hoxa9</i> ou contrôle GFP.....	50

Figure 14. Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés en présence d' <i>E2A-PBX1</i>	55
Figure 15. Voie de signalisation KEGG des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs).....	60
Figure 16. Modèle d'une collaboration oncogénique entre E2A-PBX1 et Hoxa9 lors de l'induction de B-ALL.....	79

Liste des abréviations utilisées

- AD1 ou AD2: Domaine d'activation situé sur E2A
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ALL: Leucémie lymphoblastique aigüe
- AML : Leucémie myéloïde aigue
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- AT : Activité acétyle-transférase
- B-ALL: Leucémie lymphoblastique aigüe des cellules B
- B-CFC : Essai de *colony forming cell* pour déterminer le total de progéniteurs de cellules B
- bHLH: Motif basique de type hélice-boucle-hélice
- BM: Moelle osseuse
- CAM : Molécule d'adhésion cellulaire
- cDNA : ADN complémentaire
- ChIP : Essai d'immunoprécipitation de chromatine
- CLP : Progéniteur lymphoïde commun
- CMP : Progéniteur commun myéloïde
- DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery
- EMSA : Essai de retard sur gel (*Electrophoretic mobility shift assay*)
- FACS : Cytométrie en flux
- FBS : Sérum de Fœtus Bovin
- FC: Différence d'expression
- FDR: Méthode de contrôle statistique *False Discovery Rate*
- FL: Ligand du récepteur tyrosine kinase Flt3 (aussi appelé Flk-2L pour *fetal liver kinase 2 ligand*)
- GFP : Protéine de fluorescence verte (*Green Fluorescent Protein*)
- GMP : Progéniteur granulocyte/monocyte

HAT: Activité d'histone acétyl-transférase
HCM : HOX cooperativity motif (motif de coopération des gènes Hox)
HD : Homéodomaine ou domaine homéotique
Hox : Gène homéotique de classe I
HSC: Cellule souche hématopoïétique
IDT : Duplication en tandem interne
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IL-7R : Récepteur à l'interleukine-7
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L : Cellules E2A-PBX1 malignes (leucémiques)
LT-HSC : Cellule souche hématopoïétique de long-terme
MEP : Progéniteur mégacaryocyte/érythrocyte
MLL : Gène de Leucémie Myéloïde/Lymphoïde ou de Lignée Mixte
MMLV: Virus de la leucémie murine (Murine Moloney leukemia virus)
MPP : Progéniteur multipotent
MxCre : Système inductible de Recombinase Cre
NK : Cellule Natural Killer
Pb : Paire de base
PBX1 : Pre-b cell leukemic homeobox 1
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
PDGF: Platelet-derived growth factor
PEG : Profil d'expression génétique
PL : Cellules non-malignes pré-B, positives pour E2A-PBX1 (pré-leucémique)
Q-RT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel
S17 : Cellules stromales
SCF : Stem cell factor (ligand du récepteur c-kit)
ST-HSC : Cellules souches hématopoïétiques de court-terme
SWI/SNF : Complexe de remodelage de la chromatine SWItch/Sucrose Non Fermentable

TALE: Three amino acid extension loop

T-ALL: Leucémie lymphoblastique aigüe des cellules T

TKD : Mutation du domaine tyrosine kinase

TPO : Trombopoïétine

WT : Cellules sauvages

Remerciements

Je remercie dans un premier temps ma directrice de recherche, Dr. Janetta Bijl, qui m'a donné la chance d'entreprendre cette maîtrise, et de la compléter avec succès. Merci pour cette opportunité Janet, j'ai beaucoup appris au cours de ces deux dernières années.

Je remercie de tout mon cœur tous les membres du laboratoire avec lesquels j'ai travaillé pendant plus de deux ans, Charles-Étienne, Elena, Marilaine, et Héloïse, qui ont tous contribué à ma formation grâce à leur aide et conseils à mon arrivé, ainsi que tout au long de mon parcours. Merci aussi à Gracianne et Gloria, la nouvelle relève du laboratoire. Un merci particulier à Elena avec qui j'ai travaillé sur le projet E2A-PBX1 et qui a généreusement partagé avec moi son expertise; ainsi qu'à Charles-Étienne, rarement ai-je vu une personne aussi généreuse de son temps, de son aide et de ses connaissances (en toute modestie, toujours). Merci à tous pour ces moments, ces rires et ces discussions toujours très scientifiques. Vous côtoyer au quotidien va sincèrement me manquer.

Un grand merci à tous les membres du Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont qui ont contribué à ma formation, ainsi qu'au personnel, qui fait en sorte que notre travail soit plus agréable.

Finalement, je remercie de tout mon cœur mes parents, mes sœurs et mon frère, toujours présents, pour leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

Chapitre 1. Introduction

Hématopoïèse normale

Le sang consiste en une grande variété de cellules hétérogènes, qui peuvent être classées en différentes lignées et présentes à différents stades de différenciation. Chez l'humain, plus de 10^{12} cellules émergent de la moelle osseuse (BM) adulte quotidiennement [1] afin de remplacer les pertes de cellules matures ayant un court temps de vie. L'hématopoïèse est le processus continu, et hautement régulé, par lequel les cellules du sang sont produites à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSCs). Les HSCs sont caractérisées par leur pluripotence et leur capacité à s'auto-renouveler. Elles sont les seules cellules du système hématopoïétique capables d'auto-renouvellement tout au long de la vie et génèrent ainsi des progéniteurs, qui à leur tour prolifèrent et se différencient en cellules matures de toutes les lignées hématopoïétiques. Afin de maintenir cette capacité de générer toutes les cellules matures, seule une fraction des HSCs entrent dans le cycle cellulaire, la majorité restant dans un état quiescent. La régulation du cycle cellulaire chez les HSCs est cruciale. Elle se fait au niveau de diverses cytokines, qui sont en partie fournies par les cellules stromales, telles l'interleukine-3 (IL-3), l'interleukine-6 (IL-6), SCF (stem cell factor), FL (Flt3 ligand) et la thrombopoïétine (TPO), qui régulent la croissance, la différenciation et la survie des HSCs [2]. En plus des facteurs externes, des facteurs de transcription intrinsèques tels, c-Myb, GATA-2, les facteurs de transcription de la famille Hox et Bmi-1, régulent le cycle cellulaire des HSCs [2].

Au cours de l'hématopoïèse, les HSCs se divisent afin de former les progéniteurs multipotents (MPP), qui vont se diriger, soit vers la lignée lymphoïde, soit vers la lignée érythro-myéloïde, résultant en la formation des premiers progéniteurs communs myéloïdes (CMP) et lymphoïdes (CLP), qui vont ensuite de différencier

en cellules B, T ou NK (natural killer) de la lignée lymphoïde, ou en progéniteurs granulocytes/monocytes (GMP) et progéniteurs mégakaryocytes/érythrocytes (MEP) de la lignée myéloïde [3]. Lorsque les progéniteurs multipotents (MPP) se différencient, les cellules résultantes acquièrent à un certain point une potentialité restreinte; elles sont déterminées, c'est-à-dire qu'elles sont engagées dans une seule direction. L'acquisition du phénotype définitif des cellules matures est le résultat de l'action concertée de différents gènes de manière cellule-spécifique et de l'expression de différents facteurs de croissance.

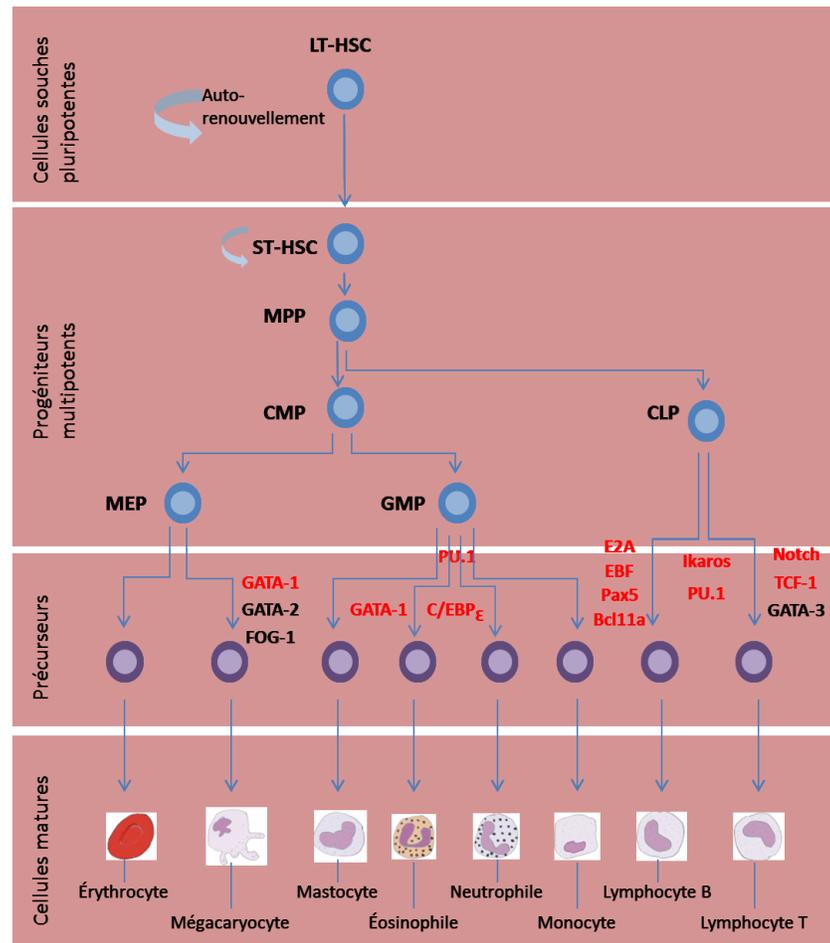


Figure 1. Hématopoïèse et facteurs de transcription.

Les facteurs de transcription en rouge ont été associés à l'oncogenèse. LT-HSC, cellule souche hématopoïétique de long-terme; ST-HSC, cellules souches

hématopoïétiques de court-terme; MMP, progéniteurs multipotent; CMP, progéniteur myéloïde commun; CLP, progéniteur lymphoïde commun; MEP, progéniteur des mégacaryocytes et des érythrocytes; GMP, progéniteur des granulocytes et des macrophages. Adaptée de Orkin SH. et Zon LI. 2008. Cell. 132: 631–644.[4]

C'est l'activation de facteurs de transcription spécifiques qui détermine le destin d'un progéniteur vers une lignée cellulaire ; par exemple GATA-1 favorise la différenciation des MEPs, tandis que l'expression de PU.1 favorise celle des GMPs, et celle de Ikaros la différenciation des CLPs en lymphocytes matures, comme illustré dans la **Figure 1**[4]. Certains facteurs de transcription jouent aussi un rôle d'antagonistes en interagissant physiquement avec d'autres protéines, comme c'est le cas de GATA-1 et PU.1; en s'y liant, GATA-1 empêche la transcription par PU.1 [5]. Outre les facteurs de transcription qui initient la différenciation des progéniteurs, d'autres en aval sont essentiels afin de restreindre les cellules vers une lignée définie. C'est le cas du facteur de transcription Pax5, qui est essentiel pour définir irrémédiablement la lignée lymphoïde B, comme il sera expliqué plus loin. Il est important de noter que parmi tous les facteurs de transcriptions identifiés à ce jour, plus de la moitié de ces gènes sont impliqués dans des translocations chromosomiques associés à des leucémies ou sont oncogéniques [6].

1.1.1 Développement et différenciation des lymphocytes B

La BM d'un adulte contient des lymphocytes B à tous les stades de différenciation, c'est-à-dire des progéniteurs aux cellules matures. Les différents sous-groupes de cellules sont caractérisés et peuvent être isolés à différents stades de différenciation grâce à leurs marqueurs de surface distinctifs.

Les cellules B, T et NK sont dérivés d'un même progéniteur lymphoïde commun (CLP), qui peut être caractérisé par l'expression des marqueurs de surface c-kit et CD127, la chaîne α du récepteur de l'interleukine-7 (Il-7) [7]. La classification

classique de Hardy [7], permet de classer les cellules B en 7 fractions distinctes, selon les marqueurs de surface qui les caractérisent à différents stades de différenciation, comme schématisé dans la **Figure 2**.

Suivant le stade CLP, c'est la co-expression des marqueurs de surface CD45R/B220 et CD43 qui permet initialement de distinguer et restreindre la lignée B au stade le plus précoce. De plus, ces cellules pré-pro B n'expriment pas le marqueur de surface CD19, dont l'expression caractérise tous les stades ultérieurs de différenciation. En plus du marqueur de surface CD19 caractéristique de la lignée B, l'anticorps monoclonal AA4.1 est aussi exprimé à partir des premiers progéniteurs aux cellules B immatures [7].

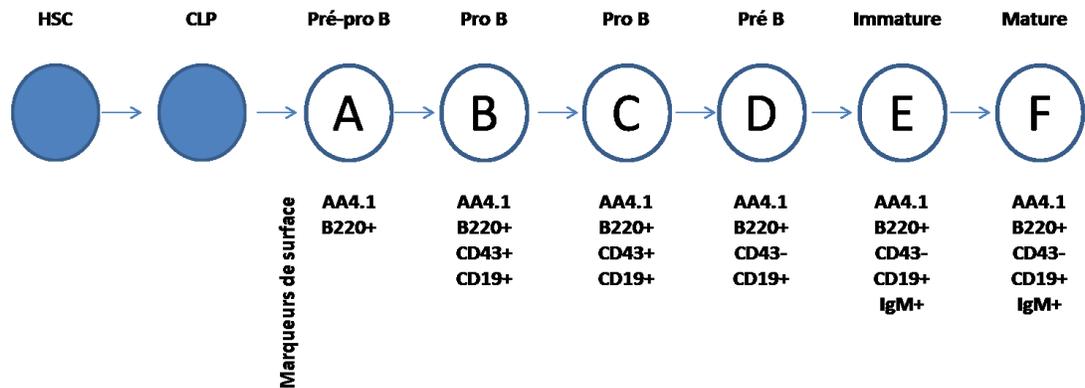


Figure 2. Développement des cellules B.

Schéma des différentes fractions de cellules B qui peuvent être définies par la combinaison de divers marqueurs de surface (les fractions A à F correspondent aux populations de cellules B identifiées par ces marqueurs). Adaptée de Hardy RR. et Hayakawa K. 2001. Annu. Rev. Immunol.19:595–621 [7].

1.1.2 Régulation de la différenciation des lymphocytes B par les cytokines

La génération des lymphocytes B et T à partir des HSCs est un processus hautement régulé, au niveau de la signalisation par différentes cytokines et leurs

récepteurs, et au niveau génétique par différents facteurs de transcription. Le développement des progéniteurs lymphoïdes dans la moelle osseuse adulte dépend de la signalisation via l'expression de 3 cytokines principales : l'interleukine 7 (IL-7), le ligand de c-kit, aussi appelé SCF (stem cell factor), et Flt3 ligand (aussi appelé appelé Flk-2L, pour fetal liver kinase 2 ligand) [8].

La signalisation via le récepteur à l'IL-7 (IL-7R) joue un rôle central pour la détermination, la survie, la prolifération et la maturation des cellules B [9]. Le récepteur à l'IL-7 est un dimère composé de la chaîne commune γ (γ_c) et de la protéine IL-7R α [10]. L'activité de IL-7R est essentielle et suffisante pour la différenciation des CLPs en cellules B B220+CD19+. Chez des souris mutantes $\gamma_c^{-/-}$ ou IL-7R $\alpha^{-/-}$, déficientes pour IL-7R, une fréquence normale de CLPs est générée, mais la différenciation des cellules en aval des précurseurs est sévèrement altérée, ne dépassant pas le stade pro-B [11]. Ainsi, le développement des CLP ne requiert pas l'activité de IL-7R, mais la cytokine IL-7 est un facteur essentiel pour induire la différenciation des CLP en cellules B matures [11]. Pourtant, chez l'humain le rôle de l'IL-7 lors de la lymphopoïèse reste controversé, puisque le développement des lymphocytes B semble être indépendant de l'IL-7. En effet, des études cliniques ont démontré que des patients présentant une signalisation IL-7R/IL-7 défectueuse en raison d'une mutation du locus γ_c , avait un nombre de cellules T et NK réduit, mais présentait un nombre cellules B normal [12]. *In vitro*, le développement de HSCs en cellules CD19+ n'est pas influencé par l'addition d'IL-7 ou d'anticorps anti-IL7 [13]. Cependant, les précurseurs des cellules B humaines expriment IL-7R, et semble répondre à l'IL-7 selon certaines conditions expérimentales, qui utilisent des co-cultures de HSCs/cellules stromales humaines uniquement [9, 14]. Ainsi, la cytokine lymphoïde IL-7 est un facteur critique pour la différenciation en cellules B des CLPs murins, en plus de promouvoir la survie des cellules pro-B [11].

Au cours de l'hématopoïèse, l'action de IL-7 est précédée par celle des ligands SCF et Flk-2L, dont l'action est essentielle pour la génération des progéniteurs. C-

kit est un récepteur tyrosine-kinase exprimé sur les HSCs et sur les progéniteurs multipotents des différentes lignées dans la moelle osseuse, tandis que son ligand SCF est exprimé par les cellules stromales hématopoïétiques [15, 16]. Différentes études avec des souris mutante pour le récepteur c-kit indiquent que l'interaction entre c-kit et son ligand SCF n'est pas requise pour le développement normal des cellules B *in vivo* [17], mais que le récepteur joue un rôle critique pour le maintien et la génération des CLPs, avec une perte des progéniteurs et des cellules pro-B et pro-T avec le temps chez les souris adultes mutantes pour le récepteur [18]. La perte de la capacité de renouvellement à long-terme des cellules est accompagnée de l'expression du récepteur tyrosine kinase FLT3 (aussi connu en tant que FLK2 et CD135) dans les cellules MPPs. Les cellules MPP FLT3+ vont ultimement se différencier en CLPs dans la moelle osseuse [10]. Les souris mutantes pour FLT3 ou son ligand présentent une déficience sévère en progéniteurs de cellules B, et une diminution importante des cellules pro-B et pré-B, indiquant l'importance de la signalisation via les récepteur FLT3 pour la formation des CLP et le développement normal subséquent des cellules B [19, 20].

Les souris double-mutantes pour FLT3 et IL-7R α sont déficientes en cellules B, démontrant le rôle primordial que jouent ces deux récepteurs sur le développement de tous les lymphocytes B au niveau fœtal et adulte [21].

1.1.3 Contrôle transcriptionnel de la différenciation des cellules B

En plus de la signalisation à travers les récepteurs IL-7R et FLT3, 6 autres facteurs de transcription jouent un rôle critique lors du développement des précurseurs des cellules B : Ikaros(Ik), PU.1, E2A, Bcl11a, EBF1 et Pax5 [10, 22] (**Figure 1**). Le développement des lymphocytes B à partir des HSCs implique plusieurs facteurs de transcription qui contrôlent divers aspects du développement et de la restriction à la lignée B. La modulation des gènes qui codent pour ces facteurs de transcription, que ce soit *in vitro* par surexpression rétrovirale, ou *in*

in vivo à l'aide de mutants, a permis d'assigner leurs rôles à des lignées spécifiques et à différents stades de différenciation.

Dans un premiers temps, Ikaros et PU.1 permettent la spécification de la lignée lymphoïde en contrôlant le développement des progéniteurs lymphoïdes. Les facteurs E2A et EBF contrôlent ensuite l'expression de gènes cellules B-spécifiques, permettant de spécifier et de déterminer la lignée B. Finalement, Pax5 jouent un rôle crucial en réprimant les gènes non-spécifiques à la lignée B, et en activant l'expression de molécules lymphoïdes-spécifiques.

Ikaros est exprimé dans toutes les lignées hématopoïétiques, incluant les HSCs et les progéniteurs multipotents [10]. Le gène *Ikaros* code pour le facteur de transcription Ikaros, qui appartient à la superfamille des facteurs de transcription à doigts de zinc [23]. Ikaros fonctionne en tant qu'activateur ou répresseur en recrutant divers complexes de remodelage de la chromatine, incluant les complexes SWI/SNF et NuRD, aux différents éléments régulateurs de l'ADN [24]. Ikaros fonctionne ainsi en tant que régulateur épigénétique en modulant la structure de la chromatine ou en se co-localisant sur l'hétérochromatine des gènes qu'il réprime [25].

PU.1, codé par le gène *Spi-1*, est exprimé dans les HSCs et les progéniteurs multipotents et est essentiel pour développement des lignées lymphoïdes et myéloïdes[10]. PU.1 régule les progéniteurs hématopoïétiques et leur descendance en contrôlant l'expression des récepteurs à cytokines essentiels, IL-7R et FLT3 [26]. Les progéniteurs hématopoïétiques *PU.1^{-/-}* présentent une expression réduite des transcrits pour *Flt3*, et une absence d'expression pour *IL-7R*, indiquant une absence de progéniteurs lymphoïdes [27]. De plus, il a été démontré que le gène murin *IL-7R α* possède un site de liaison fonctionnel de forte affinité pour PU.1, indiquant que PU.1 active la transcription du gène *IL-7R α* de manière directe [27].

E2A, EBF et Pax5 sont essentiels pour la différenciation des CLPs en cellules pro-B [10]. L'initiation de la lymphopoïèse B dans la moelle osseuse dépend des deux

facteurs de transcription E2A et EBF, qui coopèrent afin d'induire l'expression de plusieurs gènes spécifiques aux cellules B [28]. Diverses études ciblant ces deux gènes individuellement ont démontré que ces deux facteurs de transcription sont requis pour le développement des cellules pro-B avant le réarrangement du gène d'immunoglobuline (*Ig*), mais après l'initiation de la lignée B, en raison de la présence de progéniteurs B en absence de ces gènes [29, 30]. Les souris hétérozygotes *E2A^{+/-}EBF^{+/-}* présentent une différenciation défectueuse des cellules pro-B de la fraction B à C, ainsi qu'une réduction de la transcription de plusieurs gènes lymphoïdes-spécifiques, *Pax5*, *Rag1*, *Rag2*, and *mb-1* [28]. De plus, il semble que E2A agit en amont de EBF, puisque des cellules *EBF^{-/-}* expriment des niveaux normaux d'ARN messager (ARNm) de E2A [29], tandis que l'expression du gène *Ebfl* est réduite dans des cellules *E2A^{-/-}* [31]. E2A possède un site de liaison fonctionnel dans le promoteur d'EBF [32], et PU.1 se lie *in vivo* et *in vitro* à un site conservé situé dans le premier intron [26], suggérant qu'E2A et PU.1 sont directement impliqués dans la régulation d'EBF. Une sévère réduction de progéniteurs lymphoïdes Flt3+, IL-7R+ est observée en absence de PU.1, en plus d'une expression réduite de EBF et Pax5 [26]. En plus d'E2A et PU.1, EBF est régulé par le gène *Bcl11a*, un gène requis pour la différenciation et des progéniteurs des cellules B et la maturation des cellules T [33]. Des études phénotypiques et d'expression ont permis de démontrer que *Bcl11a* est fonctionnel en amont des facteurs de transcription *Ebfl* et *Pax5* lors de la lymphopoïèse B [33].

Une fois les progéniteurs lymphoïdes formés, E2A et EBF collaborent afin d'induire l'expression de plusieurs gènes spécifiques aux cellules B, dont *Pax5* (aussi connu sous le nom de *BSAP*, B-cell specific activator protein) [28]. *Pax5* est un facteur de transcription exclusivement exprimé dans le système hématopoïétique, à partir des lymphocytes pro-B aux cellules B matures [34, 35]. Il n'est pas exprimé dans les progéniteurs multipotents et est absent dans la majorité des CLPs [36]. En plus de présenter une différenciation défectueuse des

cellules pro-B, les souris $E2A^{+/-}EBF^{+/-}$ présentent une expression réduite de transcrits lymphoïdes-spécifiques, incluant *Rag1*, *Rag2*, *mb-1* et *Pax5*, suggérant que ce dernier agit génétiquement en aval de EBF et E2A [28]. De plus, il a été démontré qu'EBF régule directement l'expression de *Pax5* en se liant et en activant son promoteur [28]. Plusieurs modèles murins déficients en *Pax5*, en raison d'une mutation ou par inactivation conditionnelle dans les cellules B, ont permis de déterminer le rôle de *Pax5*. Chez ces souris, on note un blocage de la différenciation des cellules B au stade pro-B [37]. *In vitro*, les cellules $Pax5^{-/-}$ ne se différencient pas au-delà du stade pro-B, et ont la capacité de se différencier en différents types de cellules fonctionnelles (NK, cellules dendritiques, macrophages, ostéoclastes et granulocytes) en présence des cytokines appropriés [38]. Ainsi, les cellules pro-B $Pax5^{-/-}$ peuvent être considérées comme des progéniteurs hématopoïétiques qui possèdent à la fois un potentiel lymphoïde et myéloïde [38]. Ce potentiel multipotent est supprimé par la restauration rétrovirale de l'expression de *Pax5*, qui permet de rétablir la différenciation des cellules pro-B en cellules B matures [38]. Ces données expérimentales permettent d'identifier *Pax5* comme étant un facteur essentiel et critique qui permet de restreindre les options développementales des CLPs à la lignée des cellules B, en supprimant les voies de différenciation alternatives. Lors de la différenciation des cellules B, *Pax5* permet la restriction à la lignée B, en activant des gènes lymphoïdes-B spécifiques (tels *BLNK*, *mb-1*, *CD19*) et en réprimant les gènes associés à d'autres lignées (tels *MPO*, *Notch1*, *M-SCFR*) [38]. Récemment, il a été démontré qu'une des fonctions clé de *Pax5* est de réprimer directement l'expression du récepteur tyrosine kinase FLT3, un processus essentiel pour le développement normal des cellules B [39], comme illustré dans la **Figure 3**.

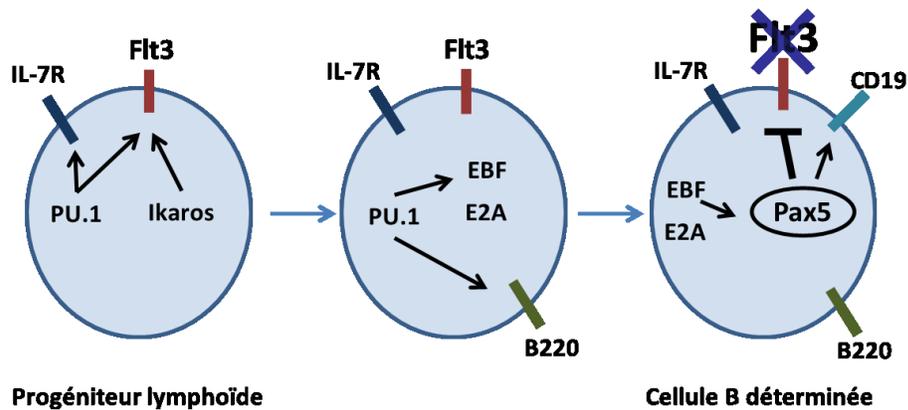


Figure 3. Spécification et restriction de la lignée B par la répression de Flt3 par Pax5.

Les régulateurs transcriptionnels clés et les molécules de surface cellulaire sont montrés. Adaptée de Holmes, M. et al. 2006. *Genes Dev.* 20: 933-93 [39].

Au cours des dernières années la régulation au niveau transcriptionnel du développement des cellules B a fait l'objet de plusieurs recherches et le modèle qui en émerge est illustré dans la **Figure 3**. Ce modèle implique les facteurs Ikaros et PU.1 qui sont requis pour le développement et la spécification des progéniteurs lymphoïdes, en partie en régulant l'expression des récepteurs de signalisation essentiels Flt3 et IL-7R α . La génération des CLPs dépend ensuite des facteurs de transcription E2A et EBF, qui sont requis pour l'activation du programme d'expression des gènes spécifiques aux cellules B, ainsi que pour le réarrangement du locus IgH. L'activité coordonnée d'E2A et EBF induit aussi l'expression de Pax5, un facteur essentiel pour la restriction des progéniteurs lymphoïdes à la lignée B, qui agit simultanément en activant et réprimant certains gènes, limitant ainsi les options développementales. Pax5 réprime ensuite l'expression du récepteur tyrosine kinase Flt3, qui est essentiel au maintien du potentiel multipotent des progéniteurs, favorisant ainsi une différenciation lignée-spécifique.

1.2 Leucémie lymphoblastique aigüe

La leucémie est le résultat d'un processus hématopoïétique anormal fréquemment initié par des oncogènes, qui sont souvent des protéines de fusion. Les cellules cancéreuses sont des cellules qui ont acquis et maintenu la capacité de proliférer indéfiniment de manière clonale, grâce à l'accumulation de mutations et/ou de changements épigénétiques [40]. C'est l'accumulation de divers lésions génétiques qui confère aux cellules cancéreuses leur capacité d'auto-renouvellement, de prolifération et ultimement de transformation maligne. La leucémie lymphoblastique aigüe (ALL) est caractérisée par un blocage de la différenciation des précurseurs T et B et une prolifération aberrante des cellules, résultant en une accumulation de cellules blastiques lymphoïdes T ou B dans la moelle osseuse et le sang [41]. Selon la Société canadienne du cancer, 400 nouveaux cas d'ALL ont été diagnostiqué en 2007. Il s'agit du cancer infantile le plus commun; environ trois quart des leucémies pédiatriques (0-19 ans) sont de type lymphoblastique [42]. La caractérisation cytogénétique des ALLs est importante lors du diagnostic, puisqu'elle permet de classer les patients en sous-groupes, en plus d'avoir un impact sur le pronostic et le choix du traitement. Près de 80% des enfants atteints d'ALL présentent un karyotype anormal [43]. Les anomalies chromosomiques peuvent être au niveau du nombre et/ou au niveau de la structure des chromosomes [43]. Environ un tiers des cas de ALL présentent un nombre anormalement élevé de chromosomes (i.e. hyperdiploïdie >47 chromosomes et hyperdiploïdie élevée >50 chromosomes) [44]. Les anomalies chromosomiques structurales établies sont présentes chez plus de 50% des patients atteint d'ALL [43]. Ces défauts de structures incluent les translocations chromosomiques, qui souvent fusionnent deux gènes normalement situés sur des chromosomes séparés, formant une protéine chimérique avec des propriétés uniques. Les proto-oncogènes ainsi affectés par translocation impliquent souvent des facteurs de transcription ou des kinases impliqués dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. Ces réarrangements donnent lieu à des

protéines de fusion, dérèglent les voies de signalisations cellulaires critiques et mènent ultimement à la transformation oncogénique.

1.2.1 Translocation chromosomique t(1;19)(q23;p13)

La translocation t(1;19)(q23;p13) a initialement été décrite en 1984, et elle est fortement associée à un immunophénotype de type pré-B [45]. Il s'agit d'une des translocations les plus récurrentes parmi les ALLs pédiatriques; elle est retrouvée dans 25% des cas d'ALL de type pré-B, en raison de la présence cytoplasmique, et non à la surface, d'immunoglobuline [46, 47]. Cette translocation fusionne le gène *E2A* présent sur le chromosome 19 avec le gène *PBX1* présent sur le chromosome 1, produisant la protéine chimérique E2A-PBX1. La protéine E2A-PBX1 ainsi produite a une incidence sur l'arrêt de la différenciation cellulaire et possède des propriétés oncogéniques, menant à la transformation des cellules [48]. *E2A* code pour les deux facteurs de transcription E12 et E47, qui sont requis lors de la lymphopoïèse normale et la régulation du développement des cellules B. Lors de la translocation, le segment de *PBX1* qui permet l'interaction avec les protéines Hox est conservée, et est critique pour l'activité oncogénique de la protéine chimérique E2A-PBX1.

1.3 Structure et fonction du gène *E2A*

Le gène *E2A* se retrouve sur le chromosome 19 et code pour 2 protéines, E12 et E47, communément appelées les protéines E2A, via l'épissage différentiel d'un même exon. Les produits géniques d'*E2A* appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH (basic Helix-Loop-Helix) de Classe I. Le motif bHLH est composé de deux hélices amphipatiques liés entre elles par une structure en boucle, en plus d'un groupement d'acides aminés basiques adjacents qui permettent la liaison à l'ADN. Les deux hélices du motif bHLH sont essentielles pour l'homo- ou l'hétérodimérisation de différentes protéines possédant un domaine bHLH. La dimérisation des protéines bHLH est requise pour leur liaison à l'ADN, qui se fait via la séquence consensus CANNTG, aussi

appelée “Boîte-E”. L’expression des protéines bHLH, incluant E2A, est ubiquitaire et elles semblent promouvoir la différenciation tissu-spécifique via leur hétérodimérisation avec des protéines bHLH de Classe II, dont l’expression est restreinte à certains tissus. Comme les autres protéines bHLH, les protéines E2A, agissent en tant qu’activateur transcriptionnel, et permettent l’activation de leur gènes cibles, en se liant à l’ADN en tant que dimères avec des protéines bHLH se classes II, dont l’expression est tissu-spécifique, incluant des facteurs myogéniques et neurogéniques [49, 50]. C’est ainsi que E2A promeut l’expression du gène de l’insuline, par son hétérodimérisation avec la protéine bHLH de Classe II BETA2, exprimée spécifiquement dans les cellules β pancréatique [51]. Même si la protéine E2A est ubiquitaire, elle semble être préférentiellement exprimée dans les tissus lymphoïdes [52], où elle fonctionne sous forme de complexes homodimérique dans les populations de lymphocytes B [53, 54].

Les protéines E2A possèdent 2 domaines d’activation, AD1 et AD2, qui sont requis pour une activation transcriptionnelle optimale [55], comme démontré lors d’expériences à l’aide de gènes rapporteurs [56, 57]. Le domaine AD2 situé de manière centrale sur la protéine (a.a 349-406), semble posséder une activité restreinte aux cellules pancréatiques β [55]. Le domaine AD1 est situé à l’extrémité amino-terminale (99 premiers acides-aminés), et fonctionne, contrairement à AD2, dans une variété de cellules, incluant les cellules B [52]. Le domaine AD1 contient un motif essentiel de 4 acides aminés LDFS, qui est requis pour l’activation transcriptionnelle d’E2A. Ce motif LDFS présent chez les vertébrés active la transcription en recrutant directement le complexe SAGA de type acétyl-transférase [58].

1.4 Structure et fonction de *PBX1*

Le gène *PBX1* (pre-B cell leukemic homeobox1) présent sur le chromosome 1 code pour une protéine à homéodomaine, un motif constitué de 3 hélices α

entourant une région hydrophobique centrale, qui permet la liaison à l'ADN [59]. Le gène *PBX1* fait partie du groupe PBC qui appartient à la famille de protéines à homéodomaine TALE (three amino acid extension loop). Cette famille inclut aussi les gènes *PBX2*, *PBX3* et *PBX4*, qui sont paralogues à *PBX1*, et qui présentent une forte homologie de séquence avec ce dernier [60, 61]. Contrairement à *E2A*, qui est exprimé et joue plusieurs rôles lors du développement normal des cellules B, *PBX1* n'est pas exprimé dans les cellules B et T, tandis que ses gènes homologues *PBX2* et *PBX3* sont exprimés de manière ubiquitaire [60]. *PBX1* reste néanmoins impliqué lors de l'hématopoïèse puisqu'il est exprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques lors du développement embryonnaire murin, et que son absence cause une anémie sévère, en plus d'une réduction du nombre et du potentiel clonogénique de progéniteurs hématopoïétiques [62]. Plus récemment, Sanyal et al. (2007) [63], ont démontré que *PBX1* est un facteur essentiel à la formation de CLPs, puisque l'inactivation conditionnelle de *PBX1* dans les cellules ES, empêche la formation de CLP, et résulte en une absence complète de cellules B. Cependant, l'inactivation de *PBX1* au stade pro-B n'affecte pas le développement des cellules B, indiquant que l'expression de *PBX1* est requise plus tôt lors de la lymphopoïèse, entre le développement des HSC et l'origine des CLPs [63]. Ainsi, *PBX1* est impliqué lors du développement des cellules lymphoïdes, mais n'est pas impliqué lors de la différenciation des cellules B au-delà du stade pro-B.

PBX1 a initialement été découvert en raison de sa présence lors de la translocation t(1;19), qui le fusionne au gène *E2A*, causant la protéine chimérique E2A-PBX1 impliquée lors de ALL [64]. Il a été identifié comme étant le gène contribuant à la liaison à l'ADN de E2A-PBX1 lors de pré-B ALL [47]. Ce sont des études génétiques sur son homologue *extradenticle (exd)* chez la drosophile, qui ont permis de déterminer la fonction de *PBX1* [65]. Ces études ont démontrées qu'EXD est un cofacteur des protéines à homéodomaine HOM (orthologues des protéines HOX), qui augmente leur spécificité de liaison à l'ADN, et est requis pour leur activité [66]. *Exd* code pour une protéine à homéodomaine qui possède

70% d'homologie avec la protéine humaine PBX1 [65], et des études subséquentes ont démontré que les protéines HOX coopèrent de la même façon avec PBX1 et E2A-PBX1 [67, 68].

Comme décrit en détail dans la section suivante, les protéines HOX se lient à PBX1 via un motif peptidique conservé, situé à l'extrémité N-terminale de l'homéodomaine [69, 70]. La liaison de PBX1 aux protéines HOX requiert l'homéodomaine, ainsi qu'un motif situé en C-terminale, appelé HOX Cooperativity Motif (HCM) [71]. L'affinité et la spécificité de liaison à l'ADN des hétérodimères PBX1/HOX est augmentée comparativement aux protéines mono- ou homo-dimériques, et permet la régulation de gènes cibles spécifiques [69]. En plus des protéines PBX, la famille TALE compte parmi ses membres les protéines MEIS1 et PREP1 (protéines MEIS), qui peuvent aussi interagir avec PBX1. Il semble que la localisation nucléaire de PBX dépend des protéines MEIS, qui induisent un changement conformationnel qui expose le signal de localisation nucléaire de PBX1, augmentant ainsi son affinité à l'ADN [72].

1.5 E2A-PBX1 est un activateur transcriptionnel oncogénique

La protéine chimérique E2A-PBX1 produite par la fusion de l'extrémité 5' du gène *E2A* sur le chromosome 19 à la portion 3' du gène *PBX1* sur le chromosome 1, est un oncogène qui possède la capacité de transformer divers types de cellules *in vitro* ou *in vivo*, en raison de ses propriétés d'activation transcriptionnelles. Des analyses de structures des domaines fonctionnels de E2A-PBX1 ont permis de mettre en évidence les éléments critiques présents sur *E2A* et *PBX1* qui sont essentiels pour la transformation par E2A-PBX1 [71, 74]. Lors de la translocation 1;19, l'extrémité C-terminale de *E2A* incluant le domaine bHLH, est remplacé par la majorité de *PBX1*. Les domaines d'activation transcriptionnelle AD1 et AD2 de E2A sont retenues, de même que l'homéodomaine et le motif HCM de *PBX1* (**Figure 4**).

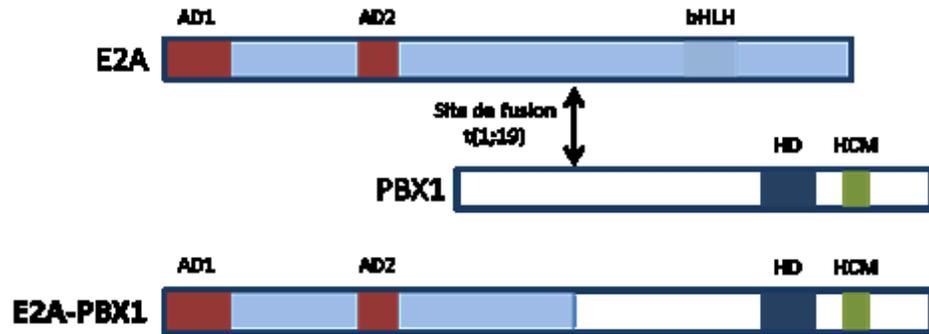


Figure 4. Fusion de E2A et PBX1 lors de la translocation t(1;19) causant la B-ALL de type pré-B.

Les domaines d'activation transcriptionnelle de *E2A*, mais non le motif bHLH sont conservés lors de la fusion avec *PBX1*, qui conserve son homéodomaine de liaison à l'ADN ainsi que son motif HCM. AD, domaine d'activation; bHLH, motif basique hélice-boucle-hélice; HD, homéodomaine; HCM, motif de coopération des gènes hox (Hox cooperativity motif). Adaptée de Rabbitts T.H. 1994. Nature. 10;372(6502):143-9 [73].

1.5.1 Contribution oncogénique de E2A

L'oncogenèse par E2A-PBX1 dépend du domaine d'activation AD1 de E2A [75]. Les domaines d'activation d'E2A sont essentiels à l'activité transcriptionnelle d'E2A-PBX1, la délétion d'un des deux domaines empêchant la transformation de lignées de cellules lymphoïdes ou fibroblastiques [74]. En effet, la délétion du domaine d'activation AD1 abolit la formation de foci dans des fibroblastes, contrairement à PBX1 qui est dispensable dans ce cas-ci [74]. Récemment, il a été montré qu'E2A-PBX1 interagit directement via son domaine AD1 avec le domaine KIX du complexe CBP/300, un co-régulateur transcriptionnel qui possède une activité (acétylase) AT intrinsèque [76]. La substitution d'un seul résidu leucine dans le motif LXXLL de AD1 abolit l'immortalisation des cellules hématopoïétiques primaires *in vitro* et l'induction de leucémie induites par E2A-PBX1 [76, 77]. L'un des effets primaires de la translocation 1;19 est la perte d'un allèle de *PBX1* et *E2A*. En raison de l'importance de E2A lors de la lymphopoïèse des cellules B, le potentiel

oncogénique résultant de la translocation t(1;19) pourrait être dû en partie à la diminution des niveaux d'expression de *E2A*. Une réduction de l'activité de E2A en raison de la perte d'un allèle pourrait résulter en une dérégulation de la différenciation et de la maturation de la lignée lymphoïde, en favorisant l'expansion d'une population de cellules au dépend d'une autre, par exemple. Divers études indiquent que E2A pourrait fonctionner à titre de suppresseur de tumeur, en plus de son rôle d'activateur transcriptionnel des gènes lymphoïdes-spécifiques. Des souris mutantes pour *E2A* présentent un arrêt complet de la différenciation des cellules B au-delà du stade pro-B et développent de thymomes, indiquant que E2A fonctionne en tant que régulateur négatif de la tumorigénèse *in vivo* [78]. De plus, les lignées de cellules dérivées des tumeurs de ces souris rentrent rapidement en apoptose lors de l'expression ectopique de E12 ou E47 [79], confirmant que les produits du gène *E2A* peuvent agir en tant que suppresseurs de tumeurs. La translocation chromosomique t(1;19) pourrait réduire les niveaux normaux de E2A fonctionnels disponibles qui pourrait agir à titre de suppresseurs de tumeurs. Ainsi, l'hétérozygotie du gène *E2A* dans la maladie humaine pourrait contribuer au développement de la leucémie.

1.5.2 Contribution oncogénique de PBX1

Contrairement à E2A et E2A-PBX1, PBX1 n'est pas un activateur transcriptionnel. L'activité transcriptionnelle de répression ou d'activation des hétérodimères HOX/PBX1 est déterminée en fonction de diverses voies de signalisation cellulaires [80]. Cependant, PBX1 est converti en activateur transcriptionnel lorsque fusionné à l'extrémité N-terminale de E2A [75, 81]. En effet, des promoteurs contenant les sites de liaison de PBX1, sont activés par E2A-PBX1, mais non par PBX1 [75]. Les domaines requis pour l'activation transcriptionnelle de E2A-PBX1 semblent être cellules-spécifique. En effet, la transformation de fibroblastes NIH 3T3 par E2A-PBX1 est dépendante des motifs AD1 et AD2, tandis que l'homéodomaine de PBX1 est facultatif [74], contrairement aux cellules myéloïdes, où il est requis en plus des domaines

d'activation de E2A pour l'immortalisation de progéniteurs myéloïdes [82]. L'activité oncogénique d'E2A-PBX1 dépend aussi de PBX1 puisque la délétion de toutes les séquences de PBX abolit la transformation des cellules NIH 3T3 [74]. Chang et al. (1997) ont défini le motif HCM (Hox Cooperativity Motif) comme étant l'élément nécessaire et suffisant de PBX1 pour l'activité transcriptionnelle et le potentiel oncogénique d'E2A-PBX1 dans les fibroblastes [71]. Dans les cellules murines de moelle osseuse, l'arrêt de la différenciation et l'immortalisation des cellules dépend de l'homéodomaine et du motif HCM [82]. Ces diverses études suggèrent que la liaison à l'ADN via l'homéodomaine est facultative lors de la transformation de fibroblastes, mais que l'arrêt de différenciation des cellules primaires de moelle osseuse et leur transformation induite par l'oncogène E2A-PBX1, requièrent à la fois l'homéodomaine et le motif HCM de PBX1.

Divers études ont démontrées qu'E2A-PBX1 se lie au même motif d'ADN ATCAATCAA que les complexes PBX1/HOX [67, 69], suggérant que E2A-PBX1 transforme les cellules en activant constitutivement les gènes normalement régulés par PBX1. La nécessité de l'homéodomaine lors de la transformation des cellules myéloïdes [74] suggère fortement que l'activité oncogénique d'E2A-PBX1 se fait via la transcription génique, et qu'une dérégulation des gènes cibles de HOX/PBX joue un rôle critique dans l'induction de la leucémie myéloïde.

1.5.3 Gènes cibles et voies de signalisation affectées par E2A-PBX1

Le mécanisme moléculaire par lequel E2A-PBX1 induit la leucémie lymphoblastique aigüe de type pré-B reste encore mal compris. En raison des rôles importants que jouent les facteurs de transcription E2A et PBX1 lors de l'hématopoïèse normale, la dérégulation au niveau transcriptionnelle de gènes cibles clés par E2A-PBX1 semble être l'hypothèse la plus répandue, d'autant plus que l'expression ectopique que E2A ou PBX seuls n'est pas oncogénique. Divers études ont tentés d'identifier les gènes cibles activés par E2A-PBX1. Des lignées

de cellules humaines leucémiques pré-B portant ou non la translocation t (1;19), ont permis de mettre en évidence des gènes spécifiquement activés par E2A-PBX1, parmi lesquels *EB-1* [83] et *WNT16* [84]. *EB-1* code pour une molécule de signalisation qui possède un domaine de liaison phosphotyrosine et dont l'expression est tissu spécifique. Son expression aberrante dans les cellules pré-B t(1;19) pourrait contribuer à déréguler les voies de signalisation normales contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire [83]. Le gène *WNT16* code pour un facteur de croissance de la famille WNT/WG. Les récepteurs WNT sont exprimés lors de l'hématopoïèse et à différents stades lors de la différenciation des cellules B. *WNT16* est exprimé dans les organes lymphoïdes périphériques tels la rate et les ganglions, mais non dans la moelle osseuse. Cependant, il est exprimé dans la moelle osseuse et des lignées de cellules provenant de patients atteints de pré-B ALL induite par E2A-PBX1. Dans ces cas-ci, l'inhibition d'E2A-PBX1 induit une diminution significative de *WNT16* au niveau de l'ARNm [84]. Ainsi, l'activation spécifique de *Wnt-16* semble contribuer au développement des ALLs de type pré-B induite par E2A-PBX1.

1.6 Les gènes *Hox*

Les gènes *Hox* ou gènes homéotiques de classe I, sont des facteurs de transcription qui jouent un rôle primordial lors du développement embryonnaire. Initialement découvert chez la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* [85], les homologues de ces gènes, hautement conservés lors de l'évolution, ont aussi été identifiés chez les mammifères comme étant des régulateurs clés lors du développement de l'axe antéro-postérieur (A-P) pendant l'embryogénèse [86, 87] et lors de l'hématopoïèse [88, 89]. L'importance des gènes *Hox* lors de l'hématopoïèse normale et leur expression préférentielle dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques leur confère un puissant potentiel oncogénique si les voies de signalisation ou des cofacteurs les entourant sont dérégulés.

1.6.1 Caractérisations moléculaires générales des gènes *Hox*

Chez l'humain, 39 gènes *Hox* ont été identifiés. Les gènes *Hox* sont distribués sur 4 clusters (HOXA-HOXD), localisés sur 4 chromosomes. Chaque cluster est organisé en 13 groupes paralogues, contenant de 9 à 11 membres (**Figure 5**) [86]. Cette organisation du complexe au cours de l'évolution découle de l'amplification en *cis* d'un unique gène *Hox* pour produire 13 membres, suivie d'une duplication en *trans*, donnant lieu aux 4 différents clusters [90, 91]. Ainsi, les gènes d'un groupe paralogue situés sur des chromosomes différents sont plus homologues entre eux que les gènes d'un même cluster présents sur le même chromosome. En effet, plusieurs études ont démontrés que les gènes *Hox* d'un même groupe paralogue (par exemple *Hoxa11* et *Hoxd11*) présentent souvent une redondance fonctionnelle [92]. Lors du développement embryonnaire, les gènes *Hox* sont exprimés de manière colinéaire dans l'espace et dans le temps, c'est-à-dire de manière séquentielle le long de l'axe A-P, et dans le sens 3' vers 5'. Les gènes en 3' (*Hoxa1* par exemple) sont exprimés en premier et de manière plus antérieure, tandis que les gènes en 5' (*Hoxa13* par exemple) sont exprimés plus tardivement. Les gènes *Hox* sont caractérisés par la présence d'une boîte homéotique qui consiste en une séquence d'ADN conservée de 183 paires de bases (pb), qui code pour un domaine homéotique hautement conservé de 61 acides aminés capable de se lier à l'ADN. Le domaine homéotique reconnaît une séquence consensus d'un minimum de 4 nucléotides, soit TGAT, TAAT, TTAT ou TTAC.

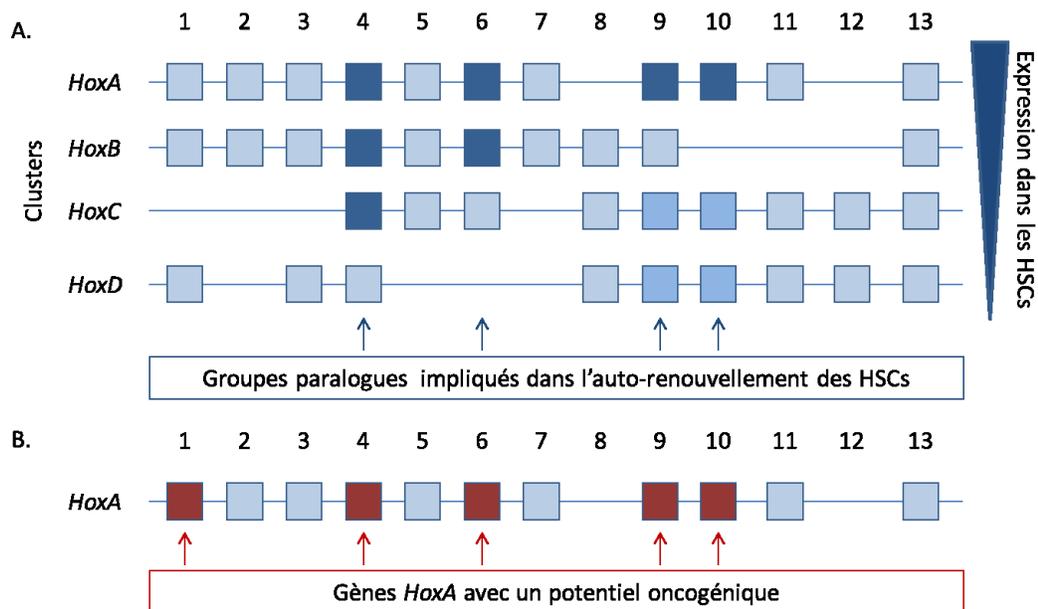


Figure 5. Représentation schématisée de l'organisation chromosomique des 39 gènes à homéodomaine de Classe I (*Hox*).

(A) Les gènes *Hox* sont organisés en clusters qui sont localisés sur 4 chromosomes différents, indiqués par A, B, C et D. Les treize groupes paralogues (1-13) sont identifiés pour chaque cluster en fonction de la position chromosomique et de l'homologie de séquences. Les groupes paralogues en bleu foncé sont impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules souches, à l'exception des gènes en bleu pâle, dont l'activité n'a pas été confirmée. Le triangle bleu inversé représente la diminution des niveaux d'expression généralisée des gènes *Hox* dans les cellules hématopoïétiques primaires à partir du cluster A à D. (B) Les gènes du cluster *HoxA* ont démontré un potentiel oncogénique lors de l'induction de leucémie dans des modèles murins d'expression rétrovirale et de transplantation. Adaptée de Lebert-Ghali CE et al. 2012. Stem Cells and Cancer Stem Cells Volume 4, pp 19-29. [130]

1.6.2 Cofacteurs des gènes *Hox*

En plus de leur domaine homéotique caractéristique, il est maintenant bien établi que la spécificité de liaison des gènes *Hox* est modifiée par l'interaction d'autres protéines de liaison à l'ADN, qui agissent à titre de cofacteurs des gènes *Hox*. Parmi ces cofacteurs, on retrouve les protéines des familles PBX et MEIS, appartenant à la superfamille des protéines à homéodomaine TALE (three-amino-

acid-loop-extension). De manière générale, les protéines PBX interagissent physiquement avec les gènes *Hox* des groupes paralogues 1 à 10 [93], tandis que les gènes des paralogues 9 à 13 interagissent avec MEIS. Les gènes *Hox* des paralogues 9 et 10 peuvent lier à la fois PBX1 et MEIS1 comme schématisé dans la **Figure 6** [94].

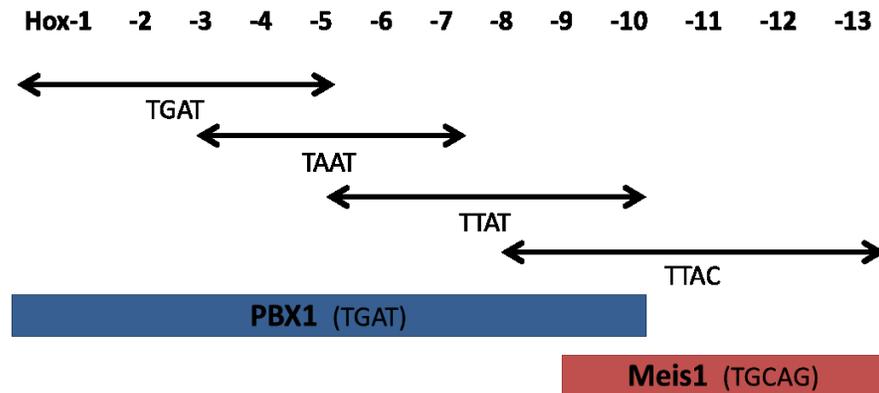


Figure 6. Liaison des protéines Hox de chaque groupe paralogue avec un partenaire à homéodomaine non-Hox.

Les protéines Hox des groupes paralogues 1 à 10 acquièrent une spécificité de liaison à l'ADN en se liant à PBX1. Les sites de reconnaissance principaux sont identifiés sous chaque groupe de gènes *Hox* même s'il y a un chevauchement considérable entre les différents groupes paralogues pour les sites de liaison à l'ADN. Les groupes paralogues 9 à 13 se lient à Meis1 via la même séquence. Les protéines Hox-9 et Hox-10 se lient aux deux partenaires. Adaptée de Shen WF et al. 1997. *Mol Cell Biol.* 17(11):6448-58.

Pbx1 (décrit dans la section 1.4) est le premier facteur des gènes *Hox* à avoir été caractérisé. L'interaction des gènes *Hox* avec ce cofacteur se fait via une séquence hexapeptidique conservée de 6 acides aminés contenant la séquence consensus Tyrosine-Proline-Tryptophane-Méthionine (YPWM) située à l'extrémité N-terminale du domaine homéotique pour les gènes *Hox* des groupes paralogues 1-8 [69, 70]. L'interaction de Pbx1 avec les gènes *Hox* des groupes paralogues 9 et 10 dépend quant à elle d'un résidu conservé de Tryptophane [69, 95]. L'hétérodimère formé par le complexe PBX1/HOX se lie à la séquence consensus 5'-ATGATTNATNN-3', avec *PBX1* se liant à l'extrémité 5' (ATGAT) et la

composante HOX se liant à l'extrémité plus variable en 3' (TGACAG); le 7^e nucléotide étant critique pour la spécificité [93]. L'interaction avec PBX1 augmente grandement l'affinité et la spécificité de liaison à l'ADN des gènes *Hox* en modulant l'homéodomaine du bras N-terminal [93]. L'interaction des protéines Hox avec Meis1 ne requiert pas les résidus conservés qui médient l'interaction avec Pbx1, mais implique plutôt une région en N-terminale des gènes *Hox*. Les protéines Hox stabilisent ainsi grandement l'interaction des protéines Meis1 avec leur ADN cible; les complexes Meis1-HOX avec l'ADN sont plus stable et se dissocient beaucoup plus lentement que les complexes formés d'ADN et Meis1 seul [94]. En plus de former des dimères avec les protéines HOX et moduler leurs interactions avec l'ADN, PBX1 et MEIS1 interagissent pour former des hétérodimères qui lient l'ADN. Cette interaction requiert la séquence des 89 premiers acides aminés de PBX1 et la région N-terminale conservée de MEIS [96]. Pbx1 augmente l'affinité de liaison à l'ADN de Meis1, comme il le fait pour les protéines Hox, mais ne semble avoir aucun effet sur la spécificité de liaison de Meis1 à l'ADN [97]. Lors de la translocation t (1;19) qui produit la protéine chimérique E2A-PBX1, l'extrémité amino-terminale de PBX1 est perdue, empêchant l'interaction de l'oncogène avec Meis1 [96].

1.6.3 Implication des gènes *Hox* lors de l'hématopoïèse normale

L'expression des gènes *Hox* lors de l'hématopoïèse primitive et leur expression aberrante dans plusieurs leucémies, supporte le rôle important que jouent ces gènes lors de la régulation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques. Dans la moelle osseuse adulte humaine, la majorité des gènes *Hox* sont exprimés dans le compartiment cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques, plus précisément dans différentes sous-populations de cellules CD34+, qui représentent des compartiments distincts de cellules souches et progéniteurs [98]. En effet, plusieurs études supportent fortement l'hypothèse selon laquelle les gènes *Hox* jouent principalement un rôle dans la fonction des

cellules hématopoïétiques primaires. L'expression des gènes *Hox*, initialement déterminée dans des cellules humaines primitives CD34+ par RT-PCR semi-quantitative, a révélé une expression plus prononcée du locus HOXA, suivit des locus HOXB et HOXC. Les gènes *Hox* des locus A et B sont préférentiellement exprimés dans les sous-populations de cellules plus primitives, avec une réduction de l'expression au cours de la différenciation et de la maturation [99]. Plusieurs études effectuées à l'aide d'expressions rétrovirales et de modèles murins ont permis de mettre en évidence que le rôle crucial des gènes *HOX* lors de l'hématopoïèse normale, et lors du renouvellement des cellules souches [100, 101]. Plusieurs gènes *Hox* sont connus pour leur capacité à augmenter l'auto-renouvellement des HSCs dans les modèles murins, *Hoxb4* étant le facteur favorisant les divisions d'auto-renouvellement des HSCs le plus connu. Le rôle des gènes *Hox* lors de l'hématopoïèse normale, plus spécifiquement au niveau des HSCs et de leur auto-renouvellement, implique leur rôle potentiel lors de la leucémie.

1.6.4 Dérégulation des gènes *Hox* et leucémie

En raison de leur rôle lors de la différenciation et l'auto-renouvellement des cellules hématopoïétiques, une expression ectopique des gènes *Hox* a de profondes conséquences sur l'hématopoïèse. Une dérégulation des gènes *Hox* est caractéristique de plusieurs maladies hématologiques. Une surexpression des gènes *Hox*, particulièrement ceux du locus HOXA, est fréquemment observée chez les patients atteints d'AML, et est accompagnée d'un mauvais pronostic [102, 103]. C'est aussi le cas lors de certaines leucémies lymphoblastiques [104, 105]. Dans le cas des AMLs humaines, *HOXA9* a été identifié comme étant le facteur (parmi environ 7000 gènes) dominant de pronostic. De plus, une surexpression rétrovirale de plusieurs gènes *Hox* individuels (i.e. *Hoxa9*, *-a10*, *-b3*, *-b6*, et *-b8*) confère un avantage prolifératif *in vitro* et est suffisante pour induire des leucémies *in vivo* [106-108] . Récemment il a été démontré que tous les gènes *Hoxa*, à l'exception de *Hoxa2* et *-a5*, possèdent un potentiel oncogénique et

peuvent transformer des cellules de moelle osseuse en culture [109]. Les translocations chromosomiques impliquant le gène *MLL* (pour gène de Leucémie Myéloïde/Lymphoïde ou de Lignée Mixte) (qui est associé à plus de 70 différents partenaires génétiques) sont les plus présentes lors des leucémies humaines, et mènent à une surexpression des gènes *HOX*, plus précisément de *HOXA9* et *HOXA10* dans le cas des T- et B-ALLs [110]. Une expression aberrante de certains gènes *HOXA* a aussi été constatée pour divers sous-types de ALLs présentant divers anomalies cytogénétiques [105, 111], suggérant le rôle important que pourrait jouer l'activation du cluster des gènes *HOXA* lors de la leucémogénèse des lymphocytes.

1.7 Développement d'une hypothèse

Les protéines de fusion issues de translocations chromosomiques représentent les oncogènes qui induisent près de 50% des leucémies [112]. Même si elles donnent un aperçu des mécanismes moléculaires de la leucémogénèse, elles sont en soit insuffisantes pour induire les transformations oncogéniques. La protéine de fusion E2A-PBX1 est présente dans 5% de tous les cas d'ALLs chez l'enfant. Cette oncoprotéine de fusion est le résultat du réarrangement entre le gène *E2A* situé sur le chromosome 19 et *PBX1* sur le chromosome 1, et cause près d'un quart des leucémies pédiatrique de type pré-B. Comme décrit précédemment, E2A-PBX1 est un puissant activateur transcriptionnel en raison des deux domaines d'activation d'E2A qui sont retenus lors de la translocation, et qui assurent ses propriétés de transactivation. De plus, lors de la translocation $t(1;19)$, l'homéodomaine du gène *PBX1*, ainsi que son *HOX* Cooperative Motif (HCM) sont conservés, permettant de former des hétérodimères avec les protéines HOX. Des expériences EMSA (electrophoretic mobility shift assay) ont démontrées qu'E2A-PBX1 interagit avec les protéines HOX pour former des complexes multi-protéiques qui participent à la régulation de l'expression génique. L'interaction entre les protéines PBX1 et HOX augmente l'affinité et la spécificité de liaison à l'ADN des gènes *Hox*, et est requise pour divers fonction de ces derniers. De plus,

des analyses fonctionnelles ont démontrées que le motif HCM est requis pour la liaison conjointe à l'ADN de E2A-PBX1 et des protéines HOX, et qu'il est nécessaire et suffisant pour l'oncogenèse [71], indiquant le rôle potentiel que pourrait jouer les interactions E2A-PBX1/HOX lors de l'induction de la leucémie induite par E2A-PBX1. Plusieurs études suggèrent que les transformations cellulaires induites par E2A-PBX1 résultent d'une collaboration avec les gènes *Hox*. Thorsteindottir et al. (1999) ont été les premiers à démontrer la collaboration entre E2A-PBX1 et *Hoxa9*, résultant en une leucémie myéloïde avec une latence réduite en présence des deux protéines, comparativement à l'expression individuelle de chacune [113]. Récemment, Bijl et al. (2008) ont démontré une collaboration oncogénique entre E2A-PBX1 et *Hoxb4* lors de l'induction de leucémies des cellules T [114]. Ces études supportent le modèle selon lequel la protéine de fusion E2A-PBX1 induit la dérégulation des gènes cibles des complexes PBX1/HOX, menant à une transformation maligne.

Au laboratoire, nous avons à notre disposition des souris transgéniques lymphoïde-spécifiques *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-}*, mutante pour le gène *CD3 ϵ* (*CD3 ϵ ^{-/-}*) et déficientes en cellules T [115]. Ces souris transgéniques développent une leucémie lymphoblastique de type pré-B (B220+CD19+CD43-IgM-), similaire à la maladie humaine [115]. Précédemment, une mutagenèse d'insertion provirale à l'aide du virus MMLV (murine Moloney leukemia virus) a été effectué à l'aide de ce modèle afin d'identifier de potentiels collaborateurs oncogéniques de E2A-PBX1. Les B-ALLs induites par E2A-PBX1 présentaient principalement des intégrations provirales dans une région du locus *Hoxa*, entre *Hoxa7* et *Hoxa9* [115]. Ces intégrations étaient aussi accompagnées d'une expression accrue au niveau de l'ARNm de la plupart des gènes du locus *Hoxa*, suggérant que les gènes *Hoxa* collaborent avec E2A-PBX1 dans l'induction de B-ALL.

1.7.1 Hypothèse de recherche

L'hypothèse de cette étude est qu'E2A-PBX1 dépend de collaborateurs oncogéniques pour le développement de leucémies de cellules B. Des études précédentes ont identifié les gènes *Hoxa* comme des collaborateurs potentiels d'E2A-PBX1 et suggèrent que les gènes *Hoxa* puissent interagir génétiquement avec E2A-PBX1 lors de l'induction de la leucémie des cellules B [115]. De plus, les T-ALLs induites par E2A-PBX1 présentent des niveaux d'expression des gènes *Hoxa* beaucoup plus élevés que les T-ALL induites par MMLV, suggérant le rôle de ces gènes lors de la transformation par E2A-PBX1 [114]. Puisque certains gènes *Hox* sont impliqués dans l'auto-renouveau des HSCs (*Hoxb4*, *Hoxa9*), les gènes *Hox* pourraient aussi être requis pour le maintien de la leucémie induite par E2A-PBX1 via l'expansion des cellules souches leucémiques. Nous posons donc l'hypothèse que l'activation de la voie *Hox* est essentielle lors de la génération et le maintien des B-ALLs induites par E2A-PBX1.

1.7.2 But et objectifs spécifiques

L'objectif général de cette étude est de déterminer s'il y a une collaboration oncogénique entre les gènes *Hoxa* et *E2A-PBX1* lors de l'induction de B-ALL. Nous tenterons de valider notre hypothèse à l'aide des objectifs spécifiques suivants :

- 1) Déterminer si il y a une dérégulation de l'expression des gènes *Hoxa* dans des cellules leucémiques induites par E2A-PBX1 issues de notre modèle murin *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* et dans des cellules humaines leucémiques positives pour la translocation t(1;19) par Q-RT-PCR.
- 2) (a) Tester l'effet d'une surexpression de gènes *Hoxa* individuels (dans ce cas-ci, *Hoxa9*) sur des cellules B E2A-PBX1 *in vitro*, à l'aide d'une surexpression rétrovirale de *Hoxa9* dans des cellules B E2A-PBX1.

- (b) Déterminer s'il y a une collaboration oncogénique directe *in vivo* entre *Hoxa9* et *E2A-PBX1* lors de l'induction de la leucémie des cellules B à l'aide de chimères *E2A-PBX1/Hoxa9*.
- 3) Déterminer si les gènes *Hoxa* (i.e. *Hoxa9*) peuvent augmenter le potentiel oncogénique de leucémies *E2A-PBX1* déjà établies, par surexpression rétrovirale de *Hoxa9* dans des cellules leucémiques *E2A-PBX1* ainsi que l'impact de *Hoxa9* sur le niveau d'expression de certains gènes lymphoïdes ou myéloïdes.
- 4) Dans un contexte plus général, identifier les gènes cibles de la protéine de fusion E2A-PBX1 dans les B-ALLs primaires par microarray.

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

Souris

Les souris sauvages (non-transgéniques) de lignées C57Bl/6 et/ou B6SJL proviennent de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Les souris transgéniques pour la protéine de fusion E2A-PBX1 ont été décrites précédemment [115]. En résumé, le fragment de cDNA de *E2A-PBX1* est cloné en aval d'un promoteur TCR β , d'élément de cis-activation d'immunoglobuline (*Ig*), et de séquences du promoteur proximal du gène *Lck*. Les animaux transgéniques surexprimant l'oncogène E2A-PBX1 de manière lymphoïde-spécifique développent une leucémie des cellules T agressive dans un laps de temps de 5 mois [115]. Les souris *E2A-PBX1* transgéniques ont été maintenues dans un environnement génétique déficient en cellules T, par croisement avec des souris C57Bl/6 mutantes pour la chaîne CD3 (*CD3E*^{-/-}), comme décrit ailleurs [115]. Ainsi, nous obtenons des souris de génotype *E2A-PBX1/CD3E*^{-/-}, qui sont déficientes en cellules T, nous permettant d'obtenir le phénotype de leucémie des cellules B désiré. Les souris ont été gardées dans un environnement exempt de pathogènes à l'animalerie du Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Pour l'induction de certaines leucémies des cellules B dans les souris mutantes *CD3E*^{-/-}, les nouveau-nés ont été injectés de manière intrapéritonéale avec 10 unités de MMLV infectieux [115, 116]. Tous les protocoles animaliers ont été approuvés par le Comité de Protection des Animaux du Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

RT-PCR quantitative

L'ARN a été isolé à l'aide du réactif Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) en combinaison avec les colonnes de purification RNeasy® (Qiagen, Toronto, ON), puis traité à la DNase I. Le cDNA a ensuite été produit à l'aide l'enzyme

Reverse Transcriptase MMLV (Invitrogen) et d'amorces (random primers) (Invitrogen) selon les protocoles du manufacturier. Les réactions de Q-PCR ont été effectuées à l'aide du réactif SYBR Green (Applied Biosystems). Les oligonucléotides (Invitrogen) pour les gènes *Hoxa* murins et les gènes *HOXA* humains ont été utilisés selon les séquences décrites précédemment [117]. Les autres réactifs pour les essais TaqMan GEx validés ont été obtenus par Applied Biosystems.

Cytométrie en flux et tri de cellules

La caractérisation phénotypique des cellules B en culture a été effectuée à l'aide des anticorps conjugués suivants : CD45R/B220-APCCy7, CD43-APC, IgM-biotine, CD11b (Mac-1)-PE (BioLegend, San Diego, CA). Les anticorps biotinylés ont été détectés avec PERCP5.5 conjugué à la streptavidine (BioLegend). Les niveaux de mortalités ont été déterminés à l'aide de Dapi (Invitrogen). Les analyses de FACS ont été effectuées sur un FACS LSRII à l'aide du logiciel FACSDiva (BD Bioscience, Mississauga, ON). Les données obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR). Tous les tris de cellules ont été effectués sur un FACS Aria II à l'aide du logiciel FACSDiva (BD Bioscience).

Culture cellulaire de cellules B et infections rétrovirales

Les cellules B pré-leucémiques et leucémiques ont été pré-stimulées pendant une nuit en présence d'IL-7 ou d'un cocktail de IL-7, Flt3 (Orf Genetics, Reykjavik, Iceland) et SCF (tous à une concentration de 10ng/ml), respectivement, suivit d'un transfert de gène rétroviral durant trois jours, par co-culture sur des cellules GP+E-86 [118] construites afin d'exprimer de manière stable les rétrovirus MSCV-*Hoxa9*-GFP ou contrôle GFP. Les cellules pré-leucémiques ont ensuite été mises en culture dans le milieu OptiMem (Invitrogen) enrichie de IL-7 (10ng/ml; Invitrogen), 10% de Sérum de Fœtus Bovin (FBS) testé pour les cellules B (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA), 5×10^{-5} M de β -Mercaptoéthanol

(Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ), de Pénicilline –Streptomycine 1X et de 50 µg/ml de Gentamycine (tous deux de Wisent Inc., St-Bruno, QC). Les cellules leucémiques ont été mises en culture sur une couche de cellules stromales S17 dans du milieu Iscove (Invitrogen). Les essais de progéniteurs clonogéniques ont été effectués comme décrit ailleurs [119]. En résumé, les cellules ont été étalées dans un pétri de 35mm contenant un milieu semi-solide contenant 1% de méthylcellulose dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium; Wisent) enrichi avec 30% de FBS (testé pour les cellules B), 10^{-4} de β -Mercaptoéthanol, 2 mM de Glutamine, et 10 ng/ml de IL-7. Les colonies ont été identifiées et comptées selon les critères standard [120].

Génération des chimères

Les souris *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-}* ont été injectées de manière intraveineuse avec 150mg/kg de 5-fluoracile (5-FU;Mayne Pharma, CA) afin de stimuler les HSCs à entrer en cycle cellulaire. Après 4 jours, les cellules de moelle osseuse ont été isolées à partir de ces souris, puis placées en co-culture pendant 3 jours sur une couche confluyente de cellules GP+E-86 irradiées qui expriment de manière stable les rétrovirus MSCV-*Hoxa9*-GFP ou contrôle GFP, dans du milieu DMEM (Wisent) enrichie de FBS 15% inactivé à la chaleur (Stem Cell Technologies), 6 ng/mL de IL-3, 10 ng/mL de IL-6, 100 ng/mL de SCF, 10^{-5} M β -mercaptoethanol, 50 mg/mL de Gentamycine, 10 mg/mL de Ciprofloxacine (Wisent Inc.), et 6 ng/mL de Polybrène (Tekniscience Inc., Terrebonne, QC). Les cellules *Hoxa9*-GFP ou MSCV-GFP ont ensuite été transplantées dans des souris *CD3 ϵ ^{-/-}*. Un mois post-transplantation, les chimères ont été sacrifiées et les cellules GFP positives ont été triées à partir de la moelle osseuse. Les cellules B transfectées ont ensuite été re-transplantées dans des souris C57BL/6, irradiées à dose létale, avec 2×10^5 de cellules de moelle osseuse totale provenant de souris congéniques B6SJL. Des analyses du sang périphérique ont été effectuées de manière bihebdomadaire suite à la transplantation, afin de suivre le développement de leucémie.

Microarray

Les essais de microarray utilisant la technologie BeadArray™ d'Illumina (Illumina, San Diego, CA) ont été effectuées au Centre d'Innovation Génomique de Génome Québec et de l'Université McGill (Montreal, QC, Canada). Pour chaque échantillon, l'ARN a été converti en cDNA puis placé par hybridation sur une puce MouseWG-6 contenant plus de 46,000 sondes dérivées de la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information Reference Sequence).

Analyse des résultats du microarray et génération des listes de gènes différentiellement exprimés

Les résultats obtenus à l'aide de la technologie BeadArray™ d'Illumina ont été analysés à l'aide du logiciel FlexArray (Michal Blazejczyk, Mathieu Miron, Robert Nadon (2007). FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays. Génome Québec, Montréal, Canada, URL <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>). L'analyse informatique des résultats de microarray a été effectuée uniquement par l'auteur de ce mémoire. Les listes de gènes ont été générées en comparant les différents groupes selon la même approche, c'est-à-dire en utilisant le test T statistique de Bayes, suivi de l'algorithme FDR (False discovery rate) de Benjamini Hochberg pour correction. Ces tests ont été appliqués afin de sélectionner les gènes différentiellement exprimés entre les différents groupes de souris expérimentales (L et PL; L et WT; PL et WT). Les listes de gènes ont été générées pour les différents groupes avec les gènes possédant une différence d'expression de plus ou moins 2 fois ($2 \leq FC \leq -2$) avec un $P \leq 0.005$. Le facteur de plus ou moins 2 a été considéré comme significatif, comme il est courant dans la littérature, et comme recommandé par le guide d'utilisation du logiciel FlexArray, mentionné plus haut.

Chapitre 3. Résultats

3.1 Les gènes *Hoxa* sont exprimés à différents niveaux dans les B-ALL E2A-PBX1 humaines

De récentes études ont mis en évidence le rôle que pourrait jouer une dérégulation de l'expression des gènes *Hox* dans différents sous-type de leucémies humaines et murines [105,111, 121]. Divers résultats précédents nous suggéraient fortement que les gènes *Hoxa* jouaient un rôle dans la B-ALL induite par E2A-PBX1. Pour cette raison, nous avons donc quantifié l'expression de tous les gènes *HOXA* sur l'ARN de cellules de moelle osseuse provenant de patients atteints de B-ALL induite par *E2A-PBX1* (n=4) par Q-RT-PCR (Figure 7).

(A)

Patients	<i>E2A-PBX1</i> B-ALL			
	#807	#808	#818	#840
<i>HOXA1</i>	134	36	32	63
<i>HOXA2</i>	1287	509	64	113
<i>HOXA3</i>	120	3566	27	1
<i>HOXA4</i>	1872	143	406	106
<i>HOXA5</i>	3	17682	24	1
<i>HOXA6</i>	109	37458	208	35
<i>HOXA7</i>	6123	2469	1388	13494
<i>HOXA9</i>	67	42354	52	74
<i>HOXA10</i>	51	27554	40	32
<i>HOXA11</i>	37	200	35	85
<i>HOXA13</i>	1	1	87	182

Expression Faible → Élevée (nombre de copies)

(B)

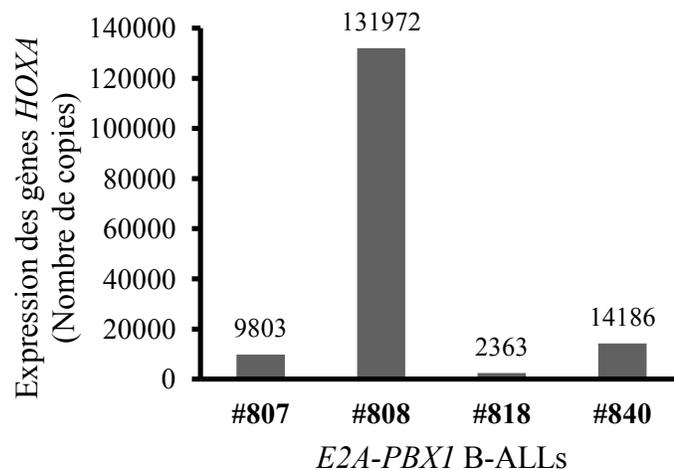


Figure 7. Expression des gènes *HOXA* dans les cellules de moelle osseuse provenant de patient atteints de B-ALL induites par *E2A-PBX1*.

(A) Les chiffres représentent le nombre moyen de copies pour chaque gène *Hoxa* pour des cellules humaines leucémiques de moelle osseuse positives pour la translocation $t(1;19)$ provenant de quatre patients (#807, #808, #818 et #840). Le nombre de copies correspond à la moyenne des triplicatas pour chaque échantillon.

Seuls les réplicas dont la valeur de C_T se situant dans un intervalle de $0.5C_T$ sont considérés pour les gènes *Hox* et de $0.2C_T$ pour le contrôle endogène *GAPDH*. L'expression des gènes *Hoxa* est effectuée sur 12.5 ng d'ARN total, normalisé pour *GAPDH* ($C_T=20$). Le nombre de copies générés à partir de la courbe standard pour chaque groupe est calculé selon la moyenne des valeurs de C_T pour chaque groupe à l'aide de la formule $2^{(38-C_T)}$. Un nombre de copies plus petit que 20 pour un gène est considéré comme non-exprimé.

(B) Représentation de la somme du nombre total de copies des 11 gènes *HOXA* pour chaque patient.

On note qu'au moins neufs gènes *HOXA* sont exprimés chez chaque patient, mais à des niveaux variables. *HOXA9* représente le gène le plus exprimé chez un des patients (#808, Figure 7(a)), tandis que *HOXA7* présente une expression moyenne à élevée constante chez les quatre patients. On note une très grande variabilité (Figure 7(b), la somme du nombre total de copies des 11 gènes *HOXA* pour chaque patient varie entre 2363 copies pour le patient #818 et 131 972 copies pour le patient #808) de l'expression des gènes *HOXA* chez ses patients, qui présentent tous une B-ALL induite par la translocation E2A-PBX1. Il serait néanmoins pertinent de comparer l'expression de ces gènes *HOXA* de patients atteints de B-ALLs à celle retrouvée dans des cellules B de moelle osseuse de patients sains, afin de confirmer s'il y a effectivement une surexpression des gènes *HOXA* en présence de la translocation t(1;19). Il s'agit de résultats préliminaires, mais somme toute, l'expression aberrante des gènes *HOXA* dans ces leucémies humaines induites par *E2A-PBX1*, renforce l'hypothèse selon laquelle les gènes *HOXA* sont des collaborateurs potentiels d'*E2A-PBX1*.

3.2 Expression des gènes *Hoxa* dans des cellules B murines *E2A-PBX1* leucémiques et *E2A-PBX1* non-leucémiques

Les souris transgéniques *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-}* développent une leucémie des cellules B après un temps de latence élevé (>9 mois), suggérant que d'autres événements génétiques sont requis pour le développement de la maladie. Dans un premier temps, afin de tester si les gènes *Hoxa* sont exprimés de manière

significative dans des cellules B *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* leucémiques ou pré-leucémiques (i.e. avant de développer une B-ALL), l'expression des 11 gènes *Hoxa* a été quantifiée par Q-RT-PCR sur des cellules B B220+, triées à partir de la moelle osseuse et de la rate de souris transgéniques leucémiques (>36 semaines), pré-leucémiques (15-25 semaines d'âge) et contrôles d'âges similaires. L'expression des gènes *Hoxa* est faible à moyenne pour la plupart des cellules B *E2A-PBX1* (Figure 8). Cependant, on note une surexpression marquée des gènes *Hoxa* pour quelques échantillons de cellules B transgéniques *E2A-PBX1* leucémiques ou pré-leucémiques, comparativement aux B-ALLs contrôles induites par MMLV, où les niveaux d'expression des gènes *Hoxa* sont négligeables (Figure 8). Cette dérégulation de l'expression des gènes *Hoxa* au niveau de l'ARNm dans des cellules B *E2A-PBX1* suggère que la voie de signalisation des gènes *Hox* contribue à l'induction de la leucémie induite par *E2A-PBX1*.

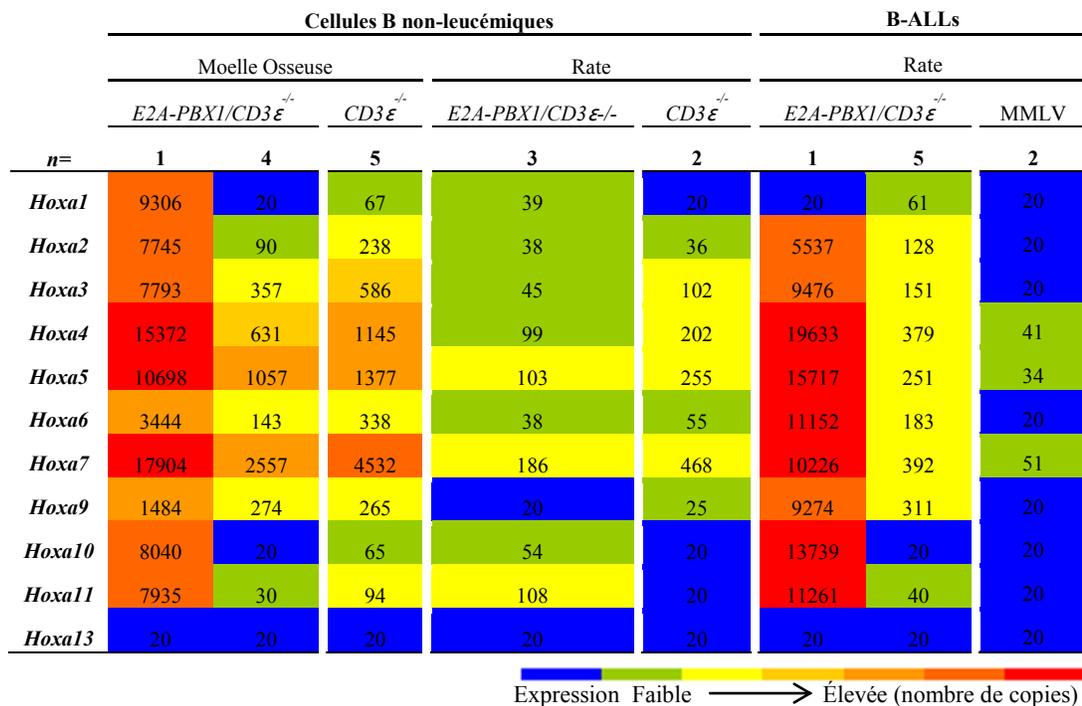


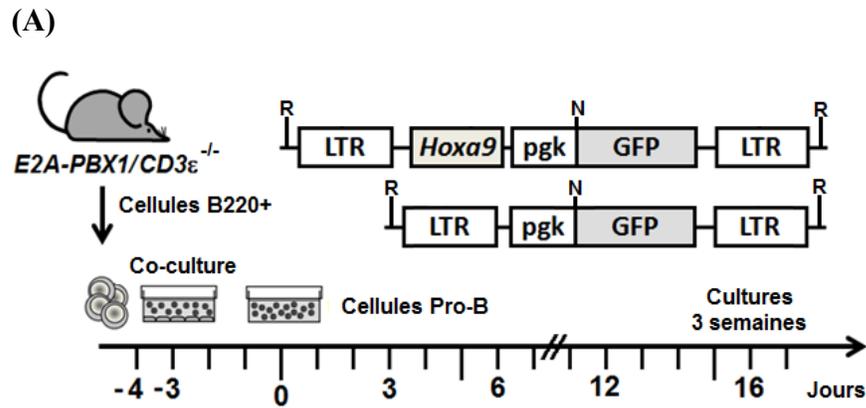
Figure 8. Expression des gènes *Hoxa* pour des cellules B provenant de souris transgéniques *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* leucémiques, pré-leucémiques ou contrôles.

Les chiffres représentent le nombre moyen de copies pour chaque gène *Hoxa* pour des cellules B B220 positives triées à partir de la moelle osseuse ou de la rate de souris transgéniques *E2A-PBX1/CD3ε*^{-/-} en santé et de souris contrôles (colonnes 2-4 et 5,6 respectivement), et pour des cellules B leucémiques induites par *E2A-PBX1/CD3ε*^{-/-} (colonnes 7,8) ou par MMLV (colonne 9) provenant de la rate hautement infiltrée (>95%) de souris malades. Le nombre de copies correspond à la moyenne des triplicatas pour le nombre d'échantillon indiqué en haut des colonnes. Seuls les répliquas dont la valeur de C_T se situant dans un intervalle de 0.5C_T sont considérés pour les gènes *Hoxa* et de 0.2C_T pour le contrôle endogène *GAPDH*. L'expression des gènes *Hoxa* est effectuée sur 25 ng d'ARN total, normalisé pour *GAPDH* (C_T=19). Le nombre de copies générés à partir de la courbe standard pour chaque groupe est calculé selon la moyenne des valeurs de C_T pour chaque groupe à l'aide de la formule $2^{(38-C_T)}$. Un nombre de copies plus petit que 20 pour un gène est considéré comme non-exprimé.

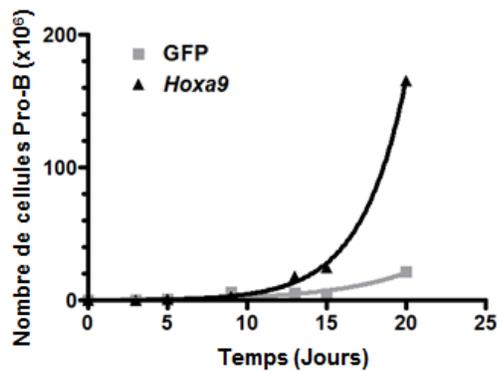
3.3 Cultures in vitro de cellules B *E2A-PBX1* surexprimant *Hoxa9*

Afin de tester directement l'effet d'une surexpression des gènes *Hoxa* sur la croissance en culture de cellules B *E2A-PBX1* en réponse à l'IL-7, nous avons trié des cellules B B220+ à partir de la moelle osseuse de souris transgéniques *E2A-PBX1* pré-leucémiques/asymptomatiques (15-25 semaines d'âge). Au préalable, l'analyse par Q-RT-PCR de ces cellules B nous a permis de confirmer une expression des gènes *Hoxa* faible à modérée. Les cellules triées ont été transfectées avec *Hoxa9* ou GFP de manière rétrovirale, puis mise en culture dans un milieu spécifique aux cellules B (Figure 9A). Lors de chacune de 3 expériences indépendantes, les cellules B *E2A-PBX1* surexprimant *Hoxa9* présentèrent une croissance significativement plus rapide en culture comparativement aux contrôles, atteignant jusqu'à 800 fois la population initiale de cellules en 20 jours (Figure 9B). De plus, 2 des 3 cultures contrôles GFP étaient épuisées au 20^e jour, avec un maximum d'expansion observé au jour 11, atteignant seulement 8 fois la population initiale de cellules en culture. Le temps de doublement des cellules, un calcul basé sur la croissance exponentielle des cellules en culture, était de 1 à 5 jours plus court pour les cultures de cellules B *E2A-PBX1* surexprimant *Hoxa9* que

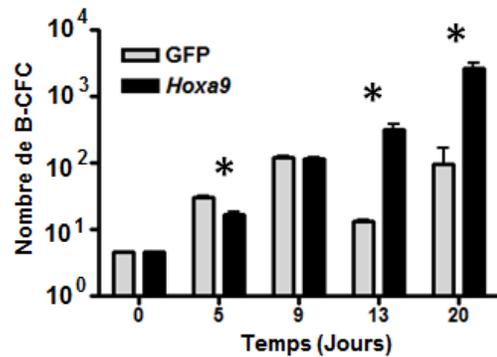
pour les cellules contrôles correspondantes (Figure 9C; $P = 0.03$). La prolifération des cellules B *E2A-PBX1/Hoxa9* était supportée par une augmentation du nombre de progéniteurs clonogéniques en culture, tandis que le nombre de progéniteurs dans les cultures contrôles *E2A-PBX1/GFP* s'est mis à diminuer après le 9^e jour (Figure 9D). Une analyse par cytométrie en flux a permis de caractériser les cellules en culture *E2A-PBX1* transfectées avec *Hoxa9* ou GFP. Dans les deux cas, les cellules avaient un phénotype B220⁺/CD43⁻/IgM⁻/BP⁺ (Figure 9E).



(B)



(D)



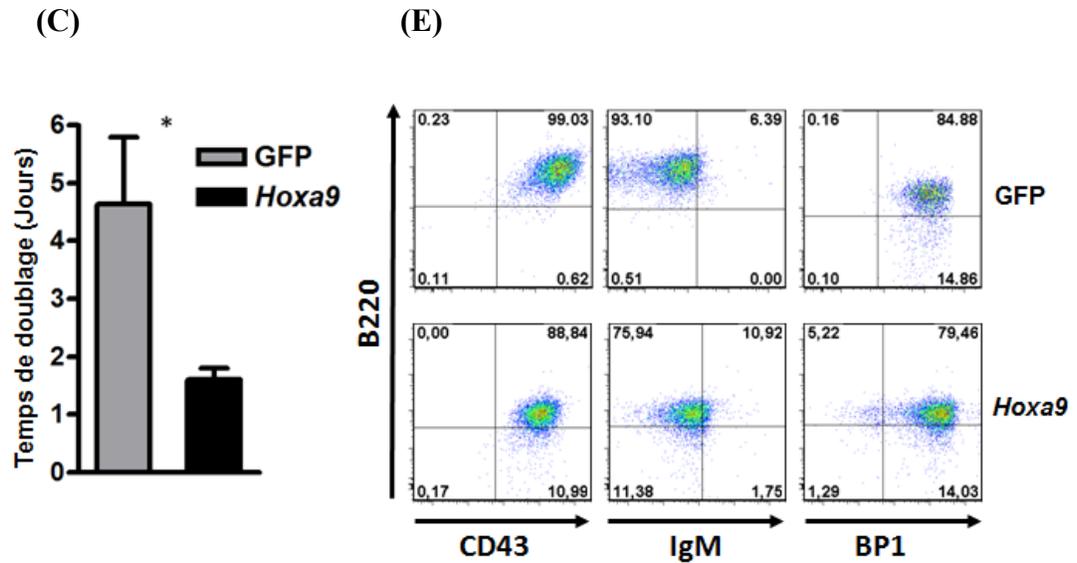


Figure 9. Analyse des cellules B *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-}* surexprimant *Hoxa9* ou contrôle GFP.

(A) Schéma de la stratégie expérimentale et représentation des vecteurs rétroviraux *Hoxa9*-GFP et contrôle-GFP. Les sites de restriction pertinents sont indiqués R, EcoRI; N, NcoI. (B) Courbe de croissance représentative des cellules pro-B *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-}* infectées de manière rétrovirale avec *Hoxa9* ou GFP (n=3) en culture. (C) Graphique représentant le temps de doublement de cellules pro-B *Hoxa9* ou contrôle (P=0.03) (D) Total de progéniteurs de cellules B présents dans les cultures de cellules pro-B *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-}* surexprimant *Hoxa9* ou GFP déterminé par essai de colony forming cell (B-CFC) aux différents temps indiqués (n=2; P ≤ 0.05 1-tailed Student's t-test). (E) Profils de FACS de différents marqueurs de cellules B impliqués lors des différents stades de différenciation, confirmant le phénotype pro-B (B220⁺/CD43⁺/IgM⁻/BP1⁺) des cellules *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-}* infectées avec *Hoxa9* ou GFP en culture. IgM, Immunoglobuline M; BP1, B cell Protein1.

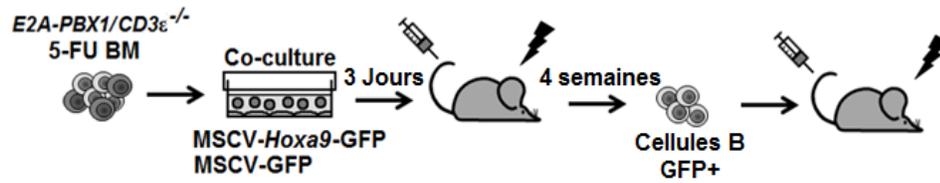
Afin d'exclure la possibilité qu'*Hoxa9* seul puisse induire une prolifération des cellules de cette ampleur, des cultures similaires ont été effectuées avec des cellules contrôles *CD3 ϵ ^{-/-}* surexprimant *Hoxa9* ou GFP de manière rétrovirale. En absence d'*E2A-PBX1*, *Hoxa9* seul confère un avantage prolifératif aux cellules comparativement aux contrôles, mais seule une expansion maximale de 4 fois la

population initiale est observée (au 11^e jour), avec un déclin de la croissance des cellules avec le temps (résultat non-montré). Ainsi, *Hoxa9* et *E2A-PBX1* confèrent ensemble une forte capacité de prolifération des cellules B *in vitro*, indiquant leur collaboration potentielle dans l'induction de la leucémie des cellules B.

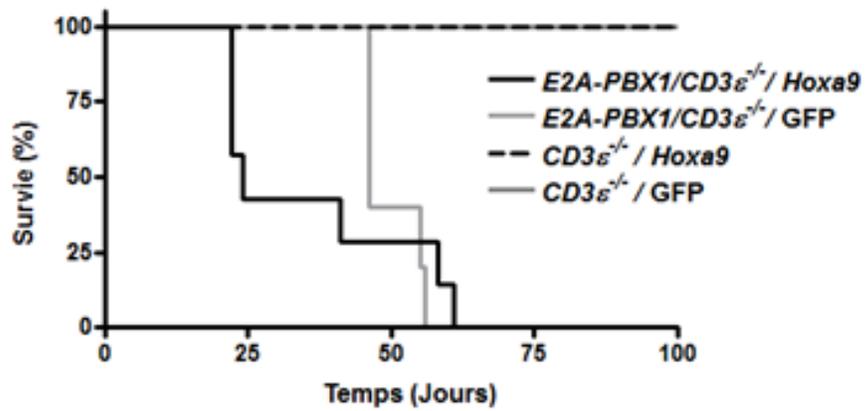
3.4 Évaluation de l'interaction entre *E2A-PBX1* et *Hoxa9* lors de la leucémogénèse des cellules B

Dans le but de déterminer s'il y a une interaction génétique directe entre les gènes *Hox* et *E2A-PBX1* lors de l'induction de la leucémie des cellules B, nous avons généré des chimères à l'aide de cellules de moelle osseuse de souris transgéniques *E2A-PBX1*, en surexprimant de manière rétrovirale *Hoxa9* ou GFP. Comme il est bien établi que la surexpression rétrovirale de *Hoxa9* dans des cellules de BM induit une leucémie myéloïde dans les 3 mois suivant la transplantation [106], toutes les chimères ont été sacrifiées après 1 mois. Les cellules B *E2A-PBX1* GFP positives dérivées de ces donneurs ont été triées et injectées dans des souris irradiées avec en plus des cellules de moelle osseuse sauvage (Figure 10A).

(A)



(B)



(C)

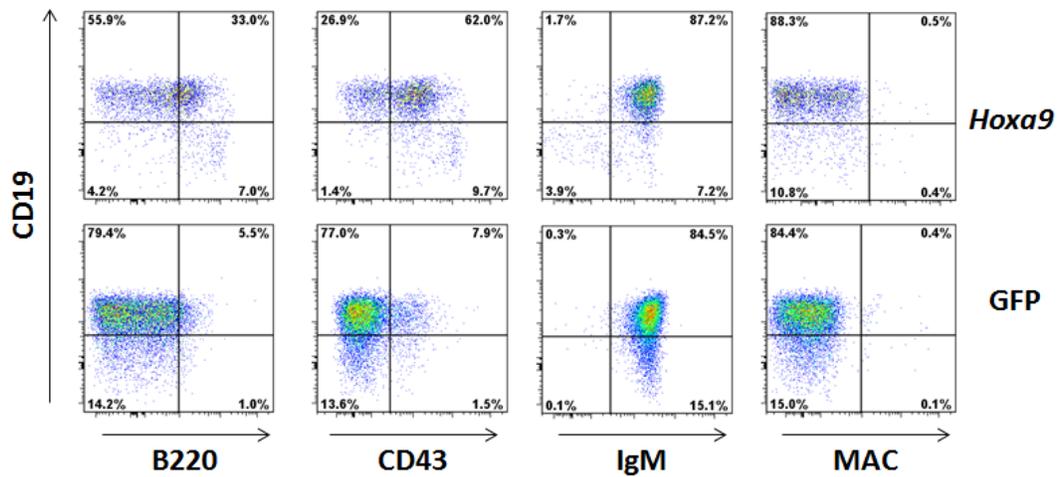


Figure 10. Analyse In vivo de cellules B *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* infectées de manière rétrovirale avec *Hoxa9* ou contrôles.

(A) Schéma de la stratégie expérimentale. (B) Courbe de survie Kaplan-Meier des souris transplantées avec des cellules B chimériques *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-}/Hoxa9* (n=7) ou *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-}/GFP* (n=5) et cellules B chimériques *CD3 ϵ ^{-/-}/Hoxa9* (n=2) ou *CD3 ϵ ^{-/-}/GFP* (n=9). (C) Profils de FACS de leucémies des cellules B induites par *E2A-PBX1/Hoxa9* et *E2A-PBX1*.

Lors d'une première expérience à petite échelle, les souris transplantées avec des cellules B *E2A-PBX1/Hoxa9* (n=2) ont développé une leucémie dans les 3 mois (**Table I**), tandis que les souris injectées avec des cellules B *E2A-PBX1/GFP* (n=3) n'ont démontré aucun signe de leucémie jusqu'à 4 mois, temps après lequel aucune cellule GFP+ n'était détectable. Lors d'une seconde expérience, les receveurs de cellules B *E2A-PBX1/Hoxa9* (n=7) et de cellules B contrôles *E2A-PBX1/GFP* (n=5) ont tous développé une leucémie (**Table I**). La variabilité du temps de survie des souris entre la première et la seconde expérience (76 ± 14.1 comparativement à 35.7 ± 17.6 jours pour la seconde expérience) peut s'expliquer par le fait que nous transplantons des cellules *E2A-PBX1* qui sont pré-leucémiques. Les cellules transplantées viennent de souris *E2A-PBX1* transgéniques pré-leucémiques, différentes pour chaque groupe. Ces souris ne présentant pas de signes de maladie, il est probable que le stade de la maladie était plus avancé pour la souris pré-leucémique d'où proviennent les cellules qui ont été transplantées dans le groupe de la seconde expérience. En plus d'expliquer le temps de latence plus court, des cellules pré-leucémique présentant un stade plus avancé de la maladie, pourraient aussi expliquer le fait que le groupe contrôle (ayant reçu des cellules B contrôles *E2A-PBX1/GFP*) ait aussi développé une leucémie lors de la seconde expérience. Cependant, en présence de *Hoxa9*, l'induction de la leucémie était significativement accélérée comparativement au contrôle (survie de 35.7 ± 17.6 J pour *E2A-PBX1/Hoxa9* vs. 49.8 ± 5.2 J pour *E2A-PBX1/GFP*; P=0.04; Figure 10B). Les souris transplantées avec des cellules B sauvages (*CD3 ϵ ^{-/-}*) surexprimant uniquement *Hoxa9* n'ont démontré aucun signe de maladie pendant toute la durée de l'expérience et au-delà; excluant l'effet

d'*Hoxa9* seul lors de l'induction de la maladie. L'analyse par FACS nous a permis de confirmer le phénotype B de toutes les leucémies, comme démontré par l'expression élevée de CD19. On note cependant que l'expression du marqueur caractéristique B220 est exprimée plus faiblement dans la majorité des leucémies, qu'elles soient induites par *E2A-PBX1/Hoxa9* ou *E2A-PBX1/GFP* (**Figure 10C**).

Table I. Collaboration entre *Hoxa9* et *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* lors de la leucémogénèse des cellules B.

	Génotype	Vecteur MSCV	n	Population de cellules	Dose	Souris leucémiques (%)	Survie (Jours)
Exp 1	<i>E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}</i>	<i>Hoxa9-GFP</i>	2	B220+	3 x 10 ⁵	100	76 ± 14.1
	<i>E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}</i>	GFP	3	B220+	5 x 10 ⁵	0	na†
Exp 2	<i>E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}</i>	<i>Hoxa9-GFP</i>	7	B220+	3 x 10 ⁵	100	35.7 ± 17.6*
	<i>E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}</i>	GFP	5	B220+	5 x 10 ⁵	100	48.8 ± 5.2*
	<i>CD3ε^{-/-}</i>	<i>Hoxa9-GFP</i>	2	B220+	5 x 10 ⁵	0	na†
	<i>CD3ε^{-/-}</i>	GFP	9	B220+	5 x 10 ⁵	0	na†

*p = 0.04 test t-1 de student

Exp = Expérience; na = non applicable

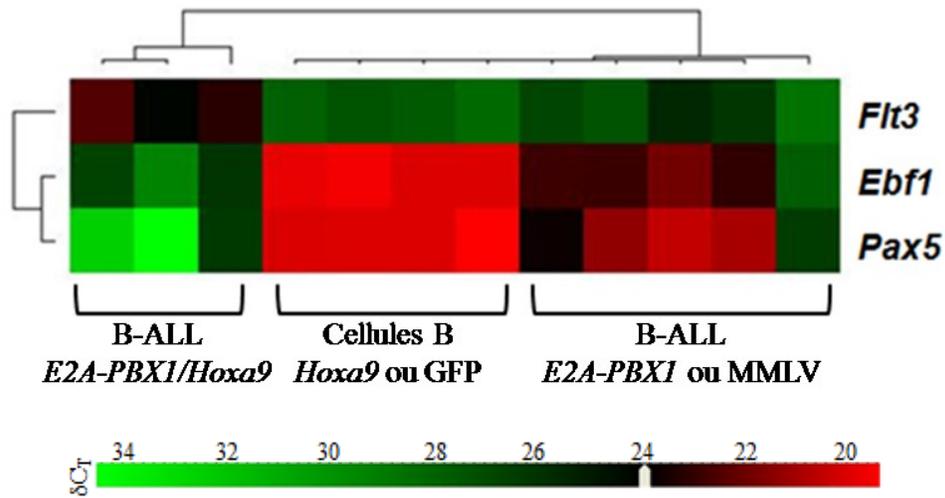
† Les souris ont été sacrifiées après 4 mois

Afin de tester si ces leucémies pouvaient ré-initier la maladie tout en maintenant le phénotype B de la maladie, 1-2 x 10⁶ cellules leucémiques induites par *E2A-PBX1/Hoxa9* (n=6) ou *E2A-PBX1/GFP* (n=2) ont été injectées dans des souris receveuses. Toutes les souris ont succombées d'une leucémie des cellules B dans les 3 à 4 semaines post-transplantation (résultat non-montré). Les leucémies ainsi ré-initiées avec *E2A-PBX1/Hoxa9* ou *E2A-PBX1/GFP* présentent elles aussi une diminution marquée de l'expression du marqueur B220 comparé aux leucémies primaires, en plus d'une diminution de l'expression du marqueur de cellules B CD19 dans la plupart des cas (**Table II**).

Table II. Immunophénotype des leucémies primaires et de leurs leucémies secondaires correspondantes exprimant *Hoxa9* ou contrôles.

	Leucémie	Cellules du donneur	Marqueurs (%)			
			B220	CD19	CD43	Mac-1
Primaire	# 50	<i>E2A-PBX1/Hoxa9</i>	7.3	98	13.3	7.9
Secondaires	# 81		6.1	67.2	10.2	0.9
	# 82		26.6	69.7	29.9	0.4
	# 83		7.3	65.3	9.6	1.3
Primaire	# 56	<i>E2A-PBX1/Hoxa9</i>	46.9	73.7	50.6	11.4
Secondaires	# 78		17.0	78.2	40.1	9.8
	# 79		14.2	72.0	33.1	9.0
Primaire	54	<i>E2A-PBX1/Hoxa9</i>	56.4	89.9	65.9	5.6
Secondaires	# 76		20.2	59.9	50.3	8.7
	# 77		29.5	75.1	58.4	6.6
Primaire	# 68	<i>E2A-PBX1/GFP</i>	84.2	98.5	87	7.7
Secondaires	# 70		36.3	34.4	0.9	2.1
	# 71		32.0	30.8	1.7	3.5
	# 75		81.8	37.9	84.8	18.4
	# 86		37.7	14.3	10.9	1.4
	# 87		27.0	12.7	8.3	2.2
	# 89		20.6	23.0	0.8	1.1

Récemment, il a été démontré qu'une diminution de l'expression de *Hoxa9* coïncide avec l'induction de l'expression du gène *EBF1* lors de la différenciation des cellules B, et qu'*Hoxa9* est requis pour l'expansion de populations de cellules Pro-B, via l'activation directe de *Flt3* [122]. Par conséquent, nous avons voulu vérifier si l'expression de *Hoxa9* dans le contexte de *E2A-PBX1* induit l'expression de *Flt3*, et par conséquent si les gènes *Ebfl* et *Pax5*, impliqués dans la différenciation des cellules B, étaient affectés. L'analyse par Q-RT-PCR a démontré que *Flt3* était 16 fois et 4 fois plus exprimé dans les leucémies induites par *E2A-PBX1/Hoxa9* comparativement aux leucémies des cellules B induites par *E2A-PBX1/GFP* (P=0.003; Figure 11) et MMLV (P=0.03; Figure 11), respectivement.



Gènes	AML		B-ALL		Cellules B	
	<i>Hoxa9</i> n=3	<i>E2A-PBX1/Hoxa9</i> n=3	<i>E2A-PBX1</i> n=4	MMLV n=2	<i>Hoxa9</i> n=2	GFP n=2
<i>Ebf1</i>	28.00 ± 0.97	27.51 ± 1.75	25.18 ± 2.59	22.50 ± 0.95	19.90 ± 0.31	20.00 ± 0.16
<i>Pax5</i>	28.12 ± 2.07	31.23 ± 4.27	24.47 ± 2.34	20.90 ± 0.20	20.10 ± 0.00	19.83 ± 0.45
<i>Flt3</i>	28.51 ± 2.45	23.36 ± 0.85	27.72 ± 0.97	25.89 ± 0.58	27.65 ± 0.58	28.27 ± 0.27

Figure 11. Expression différentielle des gènes impliqués dans la différenciation des cellules B *Flt3*, *Ebf1* et *Pax5* dans des leucémies induites par *E2A-PBX1/Hoxa9*.

Carte d'expression représentative des valeurs du cycle seuil (C_T) des différents gènes indiqués, pour des leucémies des cellules B induites par MMLV (n=2), *E2A-PBX1* (n=4) ou *E2A-PBX1/Hoxa9* (n=3), et de cellules B non-malignes infectées de manière rétrovirale avec *Hoxa9* (n=2) ou GFP (n=2). Carte générée à l'aide du logiciel DataAssist v3.0 (Applied Biosystems). La valeur de C_T des différents gènes est indiquée dans la table pour chaque groupe et pour des AML induites par *Hoxa9* en tant que référence. L'échelle d'expression est représenté plus bas, et indique, en rouge, les gènes surexprimés (valeur de C_T basse) et en vert les gènes sous-exprimés (valeur de C_T élevée). B-ALL, leucémie lymphoblastique aigüe des cellules B; MMLV, moloney murine leukemia virus; AML, leucémie myéloïde aigüe.

Dans les leucémies induites par *E2A-PBX1/Hoxa9*, l'expression des gènes *Pax5* et *Ebf1*, impliqués dans la différenciation des cellules B, était significativement

réduite lorsque comparée aux leucémies induites par MMLV (Figure 11, P=0.022 et P=0.015, respectivement), et cette diminution était presque significative lorsque comparée aux leucémies induites par *E2A-PBX1/GFP* (Figure 11, P=0.055 pour *Pax5* et P=0.074 pour *Ebf1*). Ainsi, ces expériences nous ont permis de démontrer que *Hoxa9* collabore avec *E2A-PBX1* lors de la leucémogénèse des cellules B, mais qu'*Hoxa9* seul n'est pas suffisant pour transformer les cellules B. De plus, il semble qu'une dérégulation de gènes spécifiques aux cellules B soit impliquée dans ce processus oncogénique.

3.5 Surexpression de *Hoxa9* dans les leucémies *E2A-PBX1* primaires établies

En plus de l'interaction oncogénique d'*Hoxa9* avec *E2A-PBX1* lors de l'induction de la leucémie, nous nous sommes questionné sur l'implication d'*Hoxa9* lors de leucémies induites par *E2A-PBX1* déjà établies; à savoir si *Hoxa9* pouvait augmenter le potentiel oncogénique de ces dernières. Des cellules B *E2A-PBX1* leucémiques provenant de nos souris transgéniques ont été transfectées de manière rétrovirale à l'aide d'*Hoxa9*-GFP ou de GFP contrôle et mise en culture sur des cellules stromales S17, en présence de facteurs de croissance lymphoïdes-spécifiques (**Figure 12A**). Sous ces conditions, 3/9 leucémies surexprimant GFP contrôle, et 5/9 leucémies surexprimant *Hoxa9* ont été capables de croître en culture sous ces conditions; seules les leucémies #225, #111 et #282 ont poussé en présence à la fois de *Hoxa9* et du vecteur GFP contrôle (**Table III**). De plus, la prolifération des cellules B *E2A-PBX1* leucémiques était significativement augmentée en présence d'*Hoxa9* pour deux des trois leucémies poussant sous les deux conditions (#225 et #282, **Table III**). Ceci est illustré pour la leucémie #225, à titre d'exemple (**Figure 12B**).

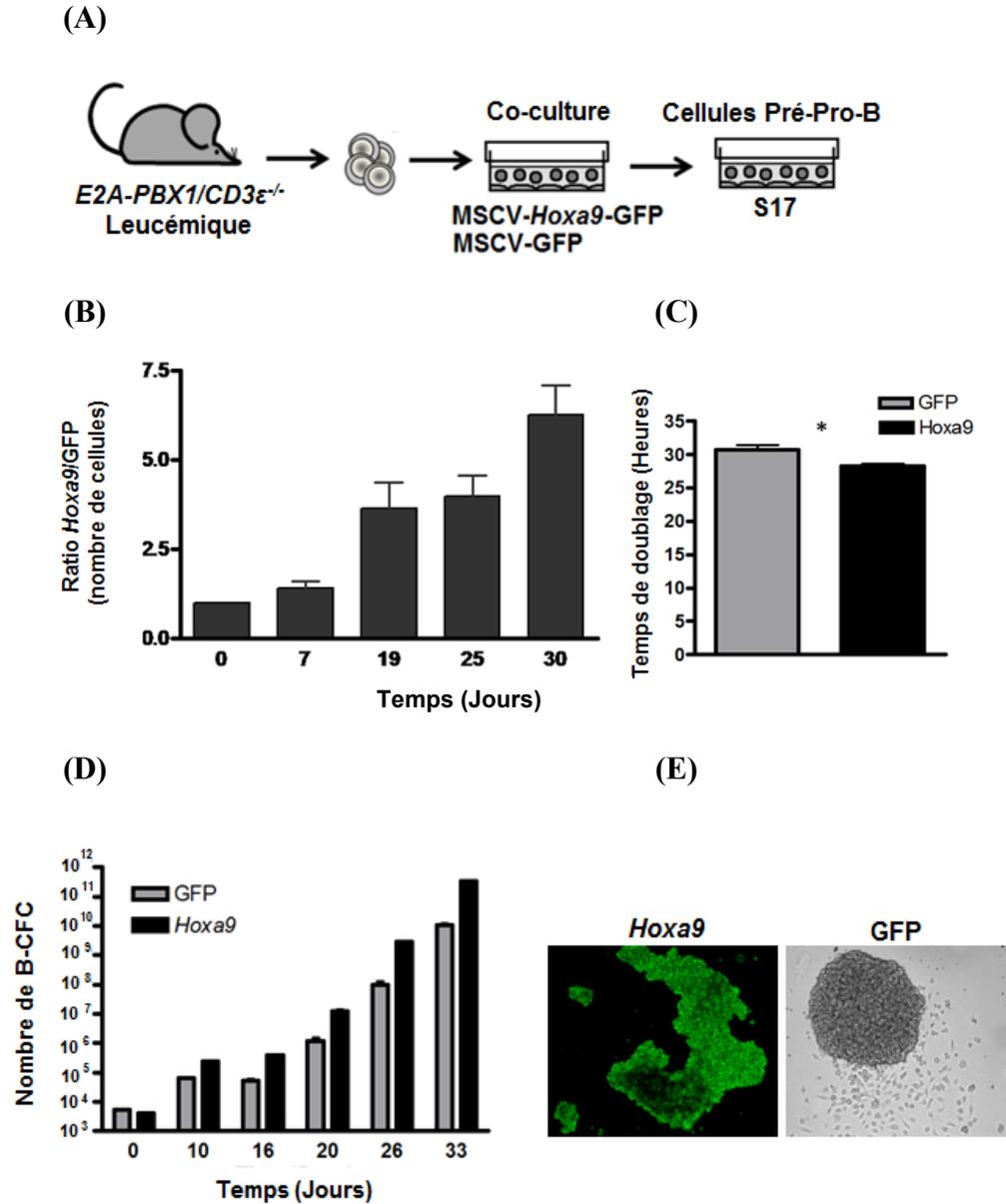


Figure 12. Analyse de cellules leucémiques $E2A-PBX1/CD3\epsilon^{-/-}$ sur exprimant $Hoxa9$ ou contrôle.

(A) Schéma de la stratégie expérimentale. (B) Histogramme représentant la prolifération au cours du temps des cellules leucémiques $E2A-PBX1/CD3\epsilon^{-/-}$ #225 surexprimant $Hoxa9$ par rapport au contrôle GFP . En ordonné, le ratio du nombre de cellules $E2A-PBX1/Hoxa9$ sur $E2A-PBX1/GFP$ en culture. (C) Graphique représentant le temps de doublement de cellules des cellules leucémiques $E2A-PBX1/CD3\epsilon^{-/-}$ #225 surexprimant $Hoxa9$ ou contrôles ($n=2, *P\leq 0.05$ 1-tailed Student's t-test). (D) Total de progéniteurs de cellules B présents en culture pour

les cellules leucémiques *E2A-PBX1/CD3ε*' #225 surexprimant *Hoxa9* ou contrôle déterminé par essai de colony forming cell (B-CFC) aux différents temps indiqués. **(E)**Exemple typique de colonie de type B initiée par des progéniteurs clonogéniques de cellules B *E2A-PBX1* leucémiques ou initié par des progéniteurs de cellules B non-malins.

On note une augmentation du ratio du nombre de cellules *Hoxa9* vs. Contrôle (Figure 12B), ainsi qu'un temps de doublement plus court (28.2 ± 0.5 et 30.7 ± 0.9 heures pour *Hoxa9* et le contrôle, respectivement, $P=0.04$; Figure 12C). Cet avantage de croissance des cellules surexprimant *Hoxa9* est supporté par une augmentation du nombre de cellules B possédant des propriétés clonogéniques, comme le reflète le nombre croissant de progéniteurs de cellules B, qui sont nécessaires au maintien de la culture (Figure 12D). Ces colonies de cellules B de cellules B *E2A-PBX* leucémiques, surexprimant ou non *Hoxa9*, présentent une morphologie anormale et désorganisée comparativement aux colonies induites par les progéniteurs de cellules B non-malignes (Figure 12E). Cette structure anormale est probablement due au statut leucémique des cellules. L'implication des gènes Hox dans la structure du cytosquelette reste à confirmer, cependant, une étude indépendante (résultats non montrés) nous indique qu'en absence des gènes *HOXA*, plusieurs gènes impliqués dans le cytosquelette sont sous-exprimés. Cependant, au niveau des marqueurs de surface spécifiques aux cellules, nous ne notons aucune différence en présence de *Hoxa9* (résultats non-montrés). Afin de tester si la surexpression de *Hoxa9* mène à une accélération de la ré-initiation de la leucémie, les cellules de deux donneurs pour lesquels les cellules des deux conditions, *Hoxa9* et GFP, était disponibles (#111 et #225, **Table III**) ont été transplantées dans un groupe de cinq souris par condition.

Table III. Caractérisation hématopoïétique et potentiel de croissance in vitro de B-ALL E2A-PBX1 primaires.

Souris	Age (Jours)	Poids rate (g)	Phénotype des cellules B leucémiques					Croissance en culture	
			B220	CD19	CD43	IgM	Mac-1	GFP	Hoxa9-GFP
#225	167	2.4	100	100	73.1	99.8	5.6	+	+
#231	238	0.5	100	100	7.3	97.7	8.1	-	+
#111	211	n.a	100	100	49.6	99.2	13.5	+	+
#272	260	0.2	100	100	93.5	20.5	0	-	-
#252	230	0.7	100	100	99	0	0	-	-
#173	302	n.a	100	100	14.2	-	0	-	-
#211	248	1.00	100	100				-	-
#282*	165	0.20	100	100	99.1	1.7	2.1	+	+
#286*	104	0.6	100	100	7.01	99.9	0	-	+

* Au moment du sacrifice la souris ne présentait aucun signe de maladie

Les cultures de la leucémie #282 ont été exclues puisque nous n'avons pas pu maintenir les cellules surexprimant le vecteur contrôle GFP en culture au-delà de 2 semaines. Toutes les souris ayant été transplantées avec des cellules #225 *Hoxa9* ou GFP ont succombées d'une leucémie dans les 40 jours, avec une latence similaire pour les deux groupes. Aucune souris ayant reçu les cellules leucémiques #111 GFP n'a développé de leucémie, tandis qu'une souris sur cinq ayant reçu des cellules surexprimant *Hoxa9* a succombé d'une leucémie après 69 jours (résultat non montré).

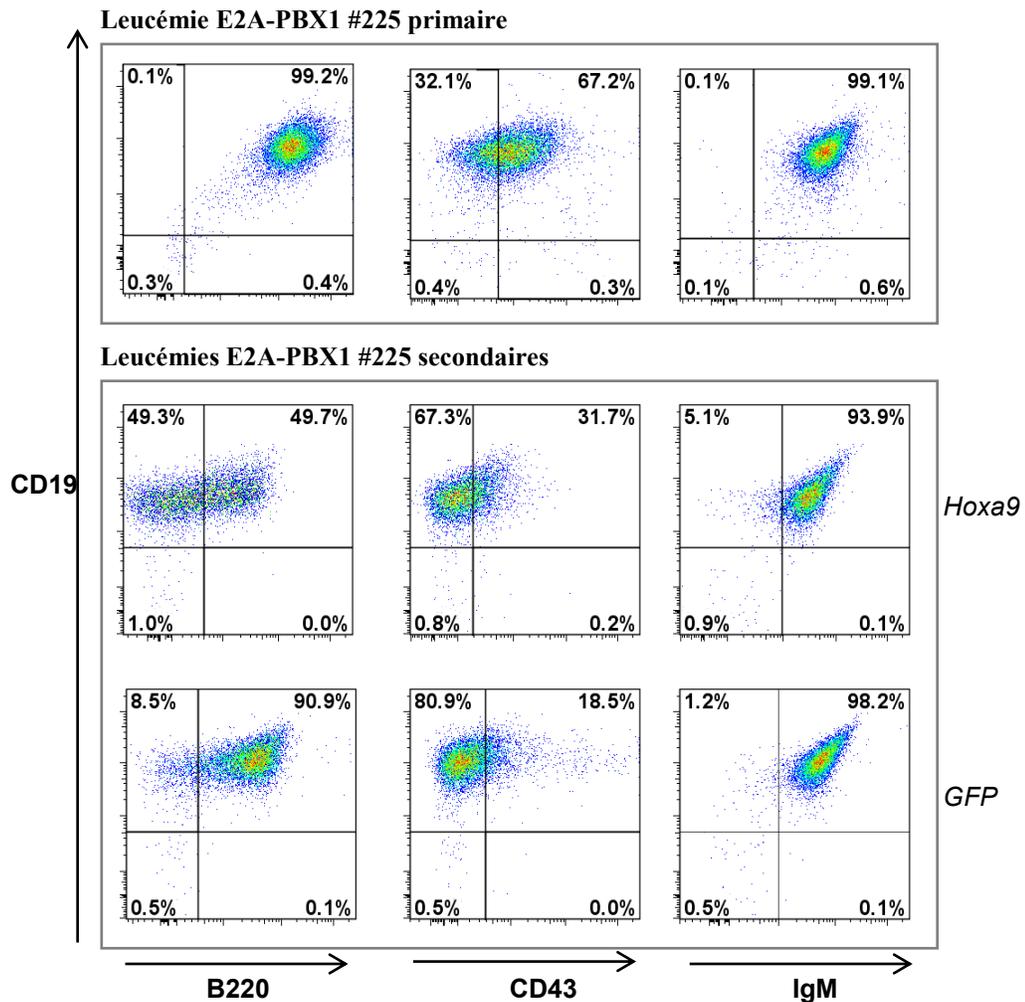


Figure 13. Analyse phénotypique des leucémies murines induite par des cellules leucémiques *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* surexprimant *Hoxa9* ou contrôle GFP.

Profils de FACS représentatifs des cellules leucémiques #225 *E2A-PBX1* primaires et #225 *E2A-PBX1/Hoxa9* ou *E2A-PBX1/GFP* secondaires.

L'analyse phénotypique des leucémies secondaires pour #225 démontre que l'expression des marqueurs de surface B220 et CD43 diminue de manière drastique dans les deux groupes *Hoxa9* et contrôle GFP (**Figure 13**, ci-haut), comparativement à la leucémie primaire *E2A-PBX1*. En contraste, l'expression du marqueur de cellule B CD19 est maintenue sur toutes les cellules leucémiques (**Figure 13**). Ces résultats démontrent qu'une surexpression de *Hoxa9* dans des

leucémies *E2A-PBX1* des cellules B déjà établies peut aussi augmenter la cinétique de prolifération et/ou le potentiel de régénérer des leucémies secondaires.

3.6 Altération des profils d'expression des gènes en présence de *Hoxa9*

Afin d'analyser si une différence au niveau de l'expression génique reflétait les changements observés en présence de *Hoxa9*, une analyse d'expression par Q-RT-PCR a été effectuée sur des cellules leucémiques *E2A-PBX1 Hoxa9* ou GFP en culture (#111 et #225) à l'aide de amorces/sondes TaqMan pour 107 gènes lymphoïdes et myéloïdes sélectionnés, incluant ceux qui sont connus comme étant des gènes cibles d'*Hoxa9* dans d'autres types de cellules. Une augmentation significative de l'expression ($\text{Log}_{10} > 0.3$) a été observée pour 12 (leucémie #225) ou 13 gènes (leucémie #111) en présence de *Hoxa9* (**Table IV**). Seule l'expression de deux gènes, *Flt3* et *Pdgf δ* , était significativement augmentée de manière consistante dans les deux leucémies *Hoxa9* comparativement à leurs contrôles respectifs. L'implication de *Flt3* lors de leucémies est bien connue, et récemment il a été démontré que *Flt3* est une cible directe de *Hoxa9* [122]. De plus, quatorze gènes étaient sous-exprimés de manière significative ($\text{Log}_{10} < -0.3$) dans la leucémie #225 *Hoxa9*, tandis que seulement trois gènes l'étaient dans la leucémie #111 *Hoxa9* (**Table IV**). Un de ces gènes, *Lmo1*, codant pour une protéine à domaine Lim impliqué dans la régulation transcriptionnelle, était commun aux deux leucémies. Étonnement, l'expression de sept gènes, incluant *Pdgfb*, *Colla1*, *Pparg*, *Timp2*, *Ctnna*, *Gas6* et *Sox4* variait de manière différente dans les cellules leucémiques #225 et #111 surexprimant *Hoxa9*. Parmi ces gènes, *Sox4* a récemment été montré comme étant régulé par *Hoxa9* [123].

Table IV. Gènes différentiellement exprimés dans les cellules leucémiques #225 et #111 surexprimant *Hoxa9*.

Cellules leucémiques #225			Cellules leucémiques #111		
Gène	Fonction	Log ₁₀ (RQ)	Gène	Fonction	Log ₁₀ (RQ)
Gènes surexprimés					
<i>Ager</i>	Développement, inflammation	0.83	<i>Col3a1</i>	Matrice extracellulaire	1.84
<i>Flt3</i>	Différentiation hématopoïétique	0.79	<i>Flt3</i>	Différentiation hématopoïétique	0.49
<i>Id3</i>	Répression de la différenciation lymphocytaire	0.64	<i>Pparg</i>	Régulation transcriptionnelle	1.41
<i>Pdgfd</i>	Prolifération et différenciation	0.51	<i>Pdgfd</i>	Prolifération et différenciation	0.34
<i>Runx3</i>	Différentiation myéloïde	0.51	<i>Gas6</i>	Croissance et survie cellulaire	0.72
<i>Cebpa</i>	Différentiation myéloïde	0.50	<i>Mme</i>	Clivage	0.64
<i>Cdkn2a</i>	Régulation du cycle cellulaire	0.48	<i>pdgfd</i>	Prolifération et différenciation	0.59
<i>Gata3</i>	Différentiation des cellules T	0.44	<i>Timp2</i>	Adhésion cellulaire	0.48
<i>Ebfl</i>	Différentiation des cellules B	0.44	<i>Col1a1</i>	Matrice extracellulaire	0.40
<i>Cybb</i>	Fonction des neutrophile	0.38	<i>Sox4</i>	Différentiation des cellules B	0.38
<i>BLK</i>	Différentiation des cellules B	0.35	<i>Mta2</i>	Régulation transcriptionnelle	0.32
<i>Cdkn1b</i>	Régulation du cycle cellulaire	0.33	<i>Ctnna</i>	Adhésion cellulaire	0.31
			<i>Cdk4</i>	Régulation du cycle cellulaire	0.31
Gènes sous-exprimés					
<i>Ets2</i>	Différentiation	-2.22	<i>Ephb4</i>	Développement	-0.44
<i>Lmo1</i>	Régulation transcriptionnelle	-0.40	<i>Lmo1</i>	Régulation transcriptionnelle	-0.52
<i>Fn1</i>	Adhésion cellulaire	-1.36	<i>rpl3a</i>	Traduction	-0.32
<i>Pdgfb</i>	Prolifération et différenciation	-1.31			
<i>Ssp1</i>	Différentiation/réponse immunitaire	-0.95			
<i>Col1a1</i>	Matrice extracellulaire	-0.85			
<i>Pparg</i>	Régulation transcriptionnelle	-0.80			
<i>Timp2</i>	Adhésion cellulaire	-0.74			
<i>Ctnna</i>	Adhésion cellulaire	-0.58			
<i>Gas6</i>	Croissance et survie cellulaire	-0.53			
<i>Sox4</i>	Différentiation des cellules B	-0.49			
<i>Mdm2</i>	Survie cellulaire/dégradation de p53	-0.36			
<i>Pik3r1</i>	Signalisation	-0.36			
<i>Itgam</i>	Fonction cellules myéloïdes/adhésion	-0.32			

Notez que l'expression des gènes est considérée comme surexprimé en présence de *Hoxa9* lorsque les valeurs de Log₁₀(RQ) sont > 0.3 et sous-exprimé lorsque les valeurs de Log₁₀(RQ) sont < -0.3.

Les gènes dont l'expression est augmentée en présence de *Hoxa9* dans la leucémie #225 incluent divers facteurs de transcription, tels que *Runx3* et *Cebpa*, des gènes associés à la lignée myéloïde. Dans les cellules leucémiques *Hoxa9* #111, c'est la surexpression de deux gènes reliés à l'adhésion cellulaire (*Timp2* et la cadhérine *Ctnna*) et de deux gènes codants pour le collagène (*Col3a1* et *Col1a1*) qui était la plus évidente. Il est important de considérer que les molécules d'adhésion ont été

montrées comme étant des cibles des gènes *Hox* et que *Col3a1* a été suggéré comme une cible directe de *Hoxa9* dans les adipocytes [124]. Ces résultats montrent que *Flt3* est une cible constante de *Hoxa9* dans les cellules B malignes, et que l'expression de plusieurs gènes associés à la différenciation hématopoïétique varie en présence de *Hoxa9*.

3.7 Identification de gènes cibles de la protéine de fusion E2A-PBX1 dans des B-ALLs murines primaires par microarray

Notre modèle murin transgénique de leucémie des cellules B induite par E2A-PBX1 est un excellent outil pour étudier les molécules et les voies de signalisation effectrices en aval d'E2A-PBX1. Nous nous sommes servis des leucémies murines *E2A-PBX1* qui présentent un phénotype similaire à la leucémie humaine, afin de comparer les profils d'expression génétique (PEG) de cellules E2A-PBX1 malignes (L) à ceux de cellules non-malignes pré-B, positives pour *E2A-PBX1* (pré-leucémique) (PL) et sauvages (WT). Ainsi, nous avons voulu déterminer les événements "inducteurs" de la maladie au stade pré-leucémique, ainsi que les voies activées dans les leucémies déjà établies.

Les souris transgéniques *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* développent une leucémie des cellules pré-B après un long temps de latence, 7 mois étant le temps le plus court observé. Afin de détecter l'effet direct du transgène *E2A-PBX1* sur l'expression globale des gènes dans les tissus hématopoïétiques, nous avons effectué une analyse par microarray sur ARN à l'aide la technologie de puces d'expression beadchips™ d'illumina. Les leucémies *E2A-PBX1* présentent un phénotype de cellules pré-B, nous avons donc comparé les profils d'expression génétique (PEG) de cellules *E2A-PBX1* leucémiques (L) à ceux de cellules pré-B E2A-PBX1 non-leucémique (ou pré-leucémique PL) et sauvages (i.e. contrôles; *CD3ε^{-/-}*) (WT) (**Table V**).

Table V. Différents groupes expérimentaux de cellules pré-B soumis à l'analyse par microarray.

Groupes	n
<i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} leucémiques	4
<i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} pré-leucémiques	3
<i>CD3ε</i> ^{-/-} contrôles	4

Nous avons purifié par cytométrie en flux les populations de cellules pré-B (B220+/CD43-/CD19+/IgM-) à partir de la moelle osseuse de souris *E2A-PBX1/CD3ε*^{-/-} pré-leucémiques (n=3) et contrôles *CD3ε*^{-/-} (n=4) âgées de 5 mois, soit au moins 2 mois avant l'induction de la leucémie la plus précoce que nous ayons observée. Pour les souris leucémiques, les cellules proviennent des tissus hématopoïétiques leucémiques primaires et ont été triées en fonction du phénotype de la maladie, à partir de l'organe primaire atteint (Table VI). L'effet de l'oncogène *E2A-PBX1* sur la prolifération et la différenciation des cellules nous a incités à rechercher la présence de dérégulations de l'expression génétique durant le processus de transformation. Dans un souci de concision pour la présente étude, nous avons sélectionnés les sondes des gènes qui présentaient une différence d'expression (FC) augmentée ou diminuée d'au moins 2 fois (FDR corrigé pour P≤0.001).

Table VI. Cellules *E2A-PBX1/CD3ε*^{-/-} leucémiques provenant des tissus hématopoïétiques primaires leucémiques soumises à l'analyse par microarray.

Leucémies <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-}					
ID	Génotype	Origine	Poids rate (g)	Âge (semaines)	Phénotype de la leucémie
251	<i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-}	Rate	0.97	47	B220+CD19+CD43-IgM+
286	<i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-}	Rate	0.64	15	B220+CD19+CD43-IgM+
272	<i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-}	Foie	0.19	37	B220+CD19+CD43+IgM±
283	<i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-}	Rate	1.67	56	B220+CD19+IgM+

Se basant sur ces critères, l'expression de 620 gènes diffère entre les groupe L et PL, 571 entre les groupes L et WT, et seulement 13 gènes différentiellement exprimés entre les groupes PL et WT (**Figure 14**).

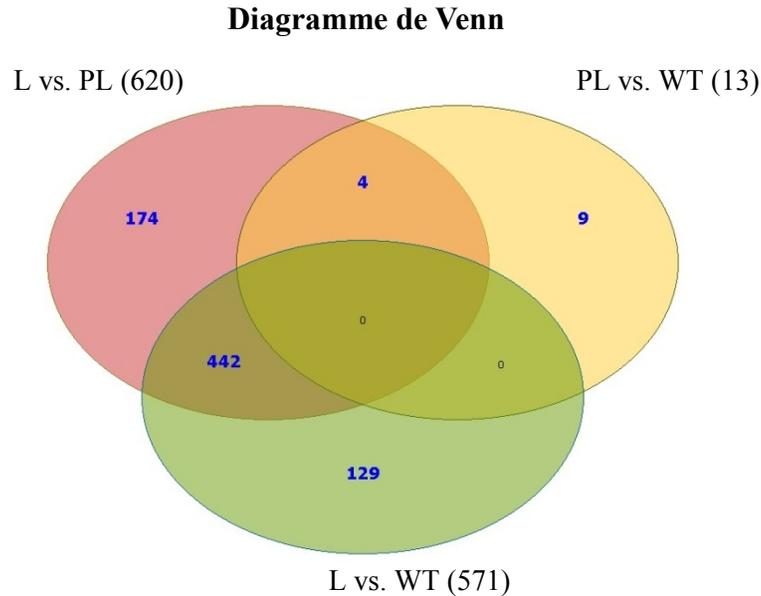


Figure 14. Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés en présence d'*E2A-PBX1*.

Le diagramme de Venn présente les gènes différemment exprimés et dont l'expression est commune parmi les trois groupes expérimentaux de cellules *E2A-PBX1* leucémiques (L), pré-B *E2A-PBX1* non-leucémiques (ou pré-leucémiques PL) et sauvages (WT). Les différences incluent dans le diagramme correspondent à une variation significative de l'expression obtenue par une comparaison Anova des trois groupes expérimentaux (FDR ajusté pour $P \leq 0.001$) et dont la différence d'expression (FC) significative entre deux groupes est plus grande ou plus petite d'au moins deux fois ($2 \leq FC \leq -2$; $P \leq 0.001$). Le cercle rose correspond aux gènes différentiellement exprimés entre les groupes L et PL (620 gènes), le cercle orange aux différences entre les groupes PL et WT (13 gènes), et le cercle vert aux différences entre les groupes L et WT (571 gènes).

Dans un premier temps, afin de déterminer l'effet de l'expression d'*E2A-PBX1*, et donc détecter les évènements pré-leucémiques, nous avons comparé les PEG des cellules de moelle osseuse pré-B *E2A-PBX1* pré-leucémiques (PL) et des cellules

pré-B *CD3ε*^{-/-} contrôles (WT). La comparaison des profils d'expression génétique de ces deux groupes nous indique que seulement 13 gènes sont différentiellement exprimés ($2 \leq FC \leq -2$; $P \leq 0.001$) dans les cellules pré-B *E2A-PBX1* pré-leucémiques comparativement aux contrôles *CD3ε*^{-/-} (**Table VII**).

Table VII. Gènes différentiellement exprimés entre les cellules pré-B *E2A-PBX1* pré-leucémiques et contrôles.

<i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} pré-leucémiques vs. <i>CD3ε</i> ^{-/-}	
Gènes	FC
Gènes sous-exprimés (1)	
<i>F830002e14rik</i>	-5.02
Gènes surexprimés (12)	
<i>Loc623121</i>	3.20
<i>Ifi27</i>	2.91
<i>Mir16</i>	2.52
<i>Egr1</i>	2.38
<i>Usp18</i>	2.22
<i>Oas1g</i>	2.21
<i>Zap70</i>	2.13
<i>Gvin1</i>	2.13
<i>Loc623121</i>	2.12
<i>Erdr1</i>	2.05
<i>Ssin</i>	2.04
<i>Tmem132e</i>	2.00

Afin d'identifier les relations fonctionnelles liant ces gènes différentiellement exprimés, nous avons soumis la liste des gènes au logiciel DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery), [125] . La plateforme DAVID permet de classer les gènes en groupes, en fonction de leur niveau d'importance (d'enrichissement) dans une étude donnée. Le niveau d'enrichissement est déterminé par comparaison à un milieu/contexte donné, dans notre cas, au génome murin (*Mus musculus*). Selon Huang et al. (2009), le principe de l'analyse par enrichissement se base sur le fait que si un processus

biologique est anormal dans une étude donnée, les gènes différentiellement exprimés et reliés devraient avoir un potentiel (ou un niveau d'enrichissement) plus élevé d'être sélectionné comme groupe pertinent à l'étude [126]. Parmi les 13 gènes dont le niveau d'expression est dérégulé, seuls les 3 gènes *Oas1g*, *Gvin1* et *Zap10* ont été assignés à un groupe commun de liaison des nucléotide/ribonucléotides par DAVID. *Zap70* et *Egr1* ont aussi été identifiés comme un groupe ayant des fonctions communes lors de la différenciation et l'activation des lymphocytes. Afin d'identifier une signature génétique qui serait importante pour la transformation maligne des cellules hématopoïétiques *E2A-PBX1*, nous avons ensuite comparé les PEG obtenus par microarray des cellules pré-B *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* pré-leucémiques (n=3), à celui des cellules de souris *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* leucémiques (n=4). Parmi les 620 gènes différentiellement exprimés ($2 \leq FC \leq -2$; $P \leq 0.001$), 226 gènes étaient surexprimés et 394 sous-exprimés dans les cellules leucémiques comparé aux cellules pré-leucémiques *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}*. La soumission de la liste des gènes différentiellement exprimés (n=620 gènes) à la plateforme DAVID a permis de grouper les gènes en 87 processus biologiques affectés dans notre modèle de leucémie, parmi lesquels 18 possédaient un score d'enrichissement significatif ≥ 1.3 (**Table VIII**). Les processus les plus enrichies comprennent les gènes impliqués lors de processus cataboliques, lors de la régulation de l'apoptose et lors la prolifération des lymphocytes (**Table VIII**). Nous avons ensuite comparé notre liste de gènes à la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) à l'aide du logiciel DAVID. Parmi les 620 gènes, 424 gènes ont été significativement associés à 22 voies de signalisation KEGG, les 10 premières voies étant présentées dans la **Table IX**. La voie de signalisation au premier rang est celle de la glycolyse/gluconéogenèse, tandis que c'est la voie des CAMs qui implique le plus de gènes différentiellement exprimés (n = 12 gènes) lors de notre comparaison (**Table IX**), cette voie de signalisation est représentée à la Figure 15.

Table VIII. Processus biologiques impliquant des gènes qui sont différentiellement exprimé entre les cellules *E2A-PBX1* leucémiques et pré-B *E2A-PBX1* pré-leucémiques présentant un taux d'enrichissement significatif déterminés à l'aide de la plateforme D.A.V.I.D.

<i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} leucémiques vs. <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} pré-leucémiques					
Rang	Processus biologiques/Groupes de gènes	Enrichissement	Nombre de gènes	p-values	Benjamini
1	Processus catabolique	5.17	10	3.40E-06	6.00E-04
2	Régulation de l'apoptose	3.37	28	3.60E-04	4.00E-02
3	Prolifération des lymphocytes	2.48	6	3.10E-03	1.90E-01
4	Régulation négative de la réponse inflammatoire	2.34	5	1.70E-03	1.30E-01
5	Processus métabolique du glucose	2.2	11	2.00E-03	1.40E-01
6	Régulation positive de l'activation des lymphocytes	2.04	8	7.30E-03	2.30E-01
7	Régulation de la cytotoxicité médié par les cellules T	1.93	4	1.90E-03	1.40E-01
8	Assemblage du nucléosome/complexes ADN-protéines	1.9	7	7.90E-03	2.40E-01
9	Facteur de transcription bZIP	1.82	5	3.70E-03	5.20E-01
10	Motif MIR	1.81	3	1.50E-02	7.70E-01
11	Membrane lysosomale/vacuolaire	1.75	4	6.50E-03	1.30E-01
12	Facteur régulateur d'interféron	1.73	3	1.90E-02	8.10E-01
13	Régulation de la réponse immunitaire	1.69	6	1.10E-02	2.60E-01
14	Processus biosynthétique des nucléotides	1.57	10	2.40E-02	3.90E-01
15	Régulation de l'activité des endopeptidases	1.5	5	3.10E-02	4.30E-01
16	Processus métabolique des NTPs	1.48	3	2.30E-02	3.80E-01
17	Méthylation/alkylation des acides aminés	1.35	5	1.90E-02	3.40E-01
18	Morphogénèse/développement des vaisseaux sanguins	1.32	11	2.10E-02	3.60E-01

Table IX. Top 10 des voies de signalisation KEGG impliquant des gènes qui sont différentiellement exprimé entre les cellules *E2A-PBX1* leucémiques et pré-B *E2A-PBX1* pré-leucémiques.

<i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} leucémiques vs. <i>E2A-PBX1/CD3ε</i> ^{-/-} pré-leucémiques			
Voies de signalisation KEGG	Nombre de gènes	p-values	Benjamini
Glycolyse/Gluconéogenèse	10	6,2E-5	8,3E-3
Voie des pentoses phosphates	6	5,0E-4	3,3E-2
Rejet allogreffe	8	7,4E-4	3,2E-2
Diabète de Type I	8	1,2E-3	4,0E-2
Immunodéficience primaire	6	2,3E-3	6,0E-2
Molécules d'adhésion (CAMs)	12	2,3E-3	5,0E-2
Maladie autoimmune de la thyroïde	8	2,7E-3	5,0E-2
Métabolisme des pyrimidines	9	3,6E-3	5,8E-2
Maladie du greffon contre l'hôte	7	3,9E-3	5,7E-2
Préparation et présentation d'antigène	8	9,7E-3	1,2E-1

Les molécules d'adhésions sont des glycoprotéines qui sont exprimées à la surface des cellules et sont impliquées dans divers processus biologiques, incluant l'homéostasie, l'inflammation et la réponse immunitaire. La Figure 15, générée à l'aide du logiciel D.A.V.I.D, présente une voie de signalisation KEGG typique, celle des molécules d'adhésions CAMs, dans laquelle 12 de nos 620 gènes différentiellement exprimés entre les cellules *E2A-PBX1* leucémiques (L) et pré-B *E2A-PBX1* pré-leucémiques (PL), se retrouvent ($P=0.00023$; Benjamini=0.05; les gènes présent dans notre analyse sont indiqués en rouge). Les diverses molécules d'adhésion dont l'expression est dérégulée ($2 \leq FC \leq -2$; $P \leq 0.001$) dans notre étude de PEG, sont principalement impliquées dans le système immunitaire, plus précisément dans la signalisation et la migration des lymphocytes et des cellules endothéliales.

MOLECULES D'ADHESION (CAMs)

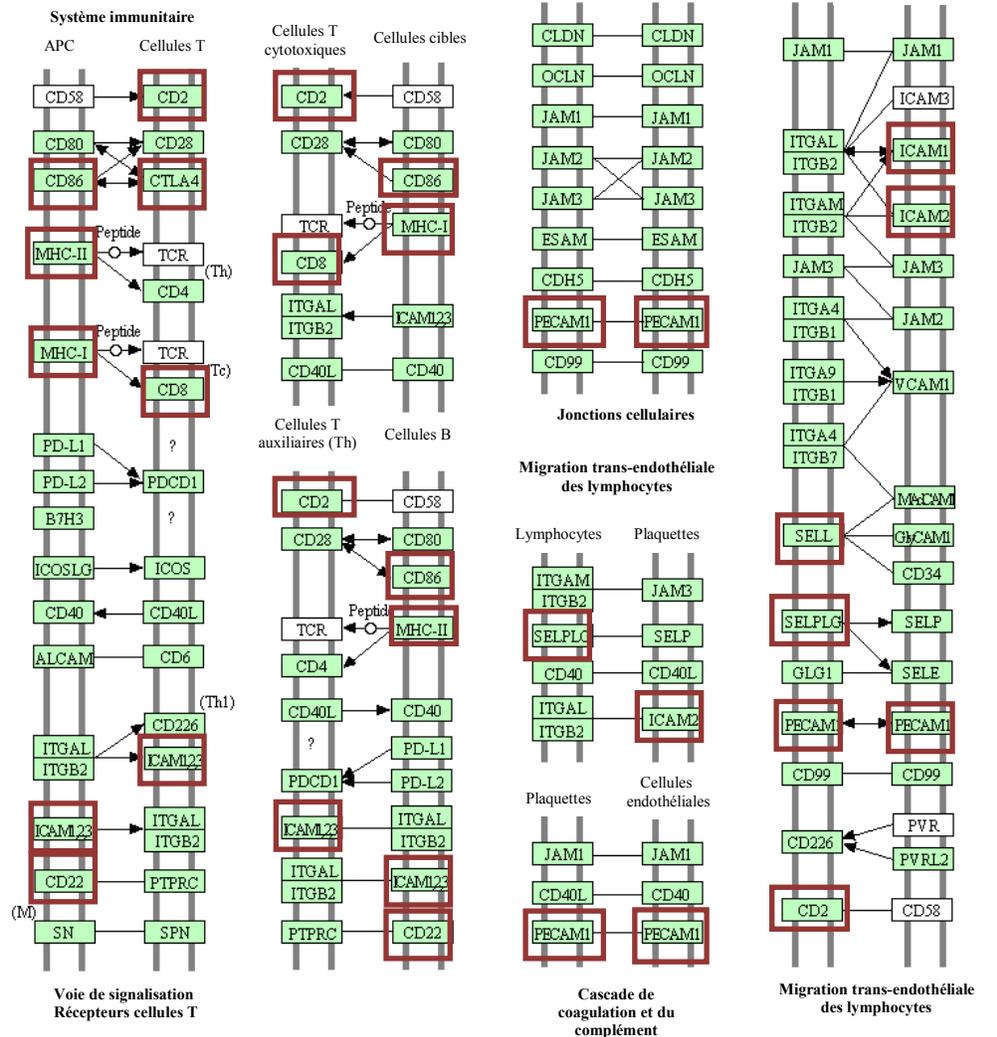


Figure 15. Voie de signalisation KEGG des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs).

Une voie de signalisation KEGG typique impliquant des gènes qui sont différentiellement exprimés entre les cellules *E2A-PBX1* leucémiques (L) et pré-B *E2A-PBX1* pré-leucémiques (PL) (620 gènes). 12 des 620 gènes sont impliqués dans la voie des CAMs ($P=0.00023$; Benjamini=0.05), et sont indiqués en rouge dans la figure. Ces gènes font partie des 4 groupes principaux des molécules d'adhésion; la famille des intégrines, la superfamille des immunoglobulines, les sélectines et les cadhérines, et sont présentes sur la surface de différents types de cellules (lymphocytes, cellules endothéliales, plaquettes).

La comparaison des PEG des cellules *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* leucémiques (L) aux cellules contrôle (WT), indique la dérégulation de 571 gènes (Figure 14). Les trois processus biologiques les plus enrichis englobant des gènes différentiellement exprimés impliqués dans la prolifération des lymphocytes, l'assemblage du nucléosome et la différenciation des lymphocytes. Les gènes impliqués dans ces trois processus expérimentaux sont présentés dans la **Table XI**. On note 7 gènes impliqués dans la prolifération des lymphocytes, six dont l'expression est diminuée, tandis qu'un seul gène, *Zbtb32*, présente une surexpression (FC=5.49). *Zbtb32* code pour une protéine à doigt de zinc connue comme étant un répresseur de GATA3 et qui récemment été caractérisé pour son rôle dans la régulation de l'expression des gènes MCH de classe II (*MCH-II*) lors de la différenciation des cellules B en cellules plasmiques [127]. Tous les gènes (n=8) impliqués dans l'assemblage du nucléosome présente une régulation négative (FC≤-2). Parmi les gènes impliqués dans la différenciation des lymphocytes (n=6), *Il7r* et *Cd1d1* sont sous-exprimés (FC= -2.19 et FC= -3.32, respectivement) dans les cellules *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* leucémiques (L) comparativement aux cellules contrôles (WT).

Table X. Processus biologiques impliquant des gènes qui sont différentiellement exprimé entre les cellules E2A-PBX1 leucémiques et contrôles présentant un taux d'enrichissement significatif déterminés à l'aide de la plateforme D.A.V.I.D.

E2A-PBX1/CD3ε-/- leucémiques vs. CD3ε-/-

Rang	Processus biologiques/Groupes de gènes	Enrichissement	Nombre de gènes	p-values	Benjamini
1	Prolifération des lymphocytes	3.38	7	3.80E-04	4.50E-02
2	Assemblage du nucléosome	3.27	8	2.70E-04	4.00E-02
3	Différentiation des lymphocytes	2.81	6	6.10E-03	2.60E-01
4	Activation des lymphocytes	2.67	8	6.10E-03	2.60E-01
5	membrane vacuolaire/lysosomale	1.81	4	5.60E-03	8.20E-02
6	Processus de biosynthèse des nucléotides	1.66	10	2.00E-02	4.80E-01
7	Régulation négative de l'activité des kinases	1.51	5	3.00E-02	5.70E-01
8	Sélection des cellules T	1.49	3	1.40E-02	4.10E-01
9	Régulation de l'activité protéine kinase	1.46	10	2.90E-02	5.60E-01
10	Régulation de l'apoptose	1.45	21	3.20E-02	5.70E-01
11	Régulation du processus de phosphorylation	1.36	13	3.80E-02	5.90E-01

Table XI. Gènes impliqués dans les processus biologiques les plus enrichis entre les cellules E2A-PBX1 leucémiques et contrôles présentant un taux d'enrichissement significatif déterminés à l'aide de la plateforme D.A.V.I.D.

Processus biologiques/Gènes impliqués	
<i>Gènes</i>	<i>FC</i>
Prolifération des lymphocytes	
<i>Cd86</i>	-5.27
<i>Cxcr4</i>	-2.28
<i>Il7r</i>	-2.19
<i>Vpreb1</i>	-10.45
<i>Ccnd3</i>	-2.51
<i>Satb1</i>	-3.44
<i>Zbtb32</i>	5.49
Assemblage du nucléosome	
<i>H2afv</i>	-2.24
<i>H2afy</i>	-2.12
<i>Smarca4</i>	-3.87
<i>Hist1h1c</i>	-5.80
<i>Hist1h2ag</i>	-2.61
<i>Hist1h2be</i>	-2.06
<i>Hist2h3b</i>	-2.26
<i>Hist1h2bj</i>	-2.10
Différentiation des lymphocytes	
<i>Cd1d1</i>	-3.32
<i>Cd74</i>	4.00
<i>Cd83</i>	6.60
<i>Ada</i>	2.40
<i>H2-dma</i>	3.61
<i>Il7r</i>	-2.19

Chapitre 4. Discussion

Le temps de latence qui précède le début de la leucémie des cellules B induite par E2A-PBX1 chez la souris, nous indique qu'en plus de la protéine chimérique, d'autres événements génétiques sont requis. Diverses études ont suggéré que les transformations cellulaires induites par E2A-PBX1 impliquent des interactions avec les gènes *Hox*. Les gènes du locus *Hoxa* ont été mis en évidence comme collaborateurs oncogéniques potentiels d'*E2A-PBX1* lors d'une mutagenèse d'insertion provirale effectué précédemment avec le présent modèle murin *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* [115]. Cette étude montre pour la première fois la collaboration d'*E2A-PBX1* avec un gène *Hox* (i.e. *Hoxa9*) lors de l'induction de B-ALL, et que la transformation des cellules B par *Hoxa9* dépend d'E2A-PBX1. Cette collaboration oncogénique est aussi supportée par une surexpression de divers gènes *Hoxa* dans des cellules B leucémiques *E2A-PBX1* murines et chez des cellules de patient portant la translocation t(1;19). L'avantage prolifératif conféré par *E2A-PBX1/Hoxa9* semble se faire, du moins en partie, via les voies de signalisation impliquant *Flt3* et *Pdgfrδ*. Nous proposons qu'une dérégulation des voies de signalisation PBX-HOX soit essentielle lors des leucémies pré-B induites par E2A-PBX1.

4.1 Dérégulation de l'expression des gènes *Hoxa* lors de B-ALLs murines et humaines induites par E2A-PBX1

Une expression aberrante des gènes *Hox* est associée à divers leucémies, notamment celles induites par des protéines de fusion impliquant MLL [110, 128]. Jusqu'à présent les profils d'expression génétique à large étendue n'ont pas encore permis d'associer une dérégulation des gènes *HOX* aux leucémies pédiatriques de type pré-B positives pour la translocation t(1;19) codant pour E2A-PBX1 [129]. Ceci est attribuable au fait que ces études du profil d'expression

génomique par puce à ADN possèdent un ensemble incomplet de sondes qui ne couvrent pas tout l'*HOXOME*, d'où l'incapacité de détecter des niveaux d'expression anormaux des gènes HOX dans ces leucémies. En effet, plusieurs hypothèses suggèrent que l'interaction de E2A-PBX1 avec les protéines HOX soit la cause principale de transformation lors de la leucémie lymphoblastique aigüe présentant la translocation t (1;19), l'association d'E2A-PBX1 avec les protéines HOX altérant la régulation des gènes cibles des complexes HOX-PBX1. Dans cette étude, nous démontrons une expression à niveaux variables des gènes *HOXA* dans des cellules humaines de moelle osseuse leucémiques portant la translocation *E2A-PBX1*. Nous démontrons que les leucémies des cellules B induites par E2A-PBX1, générées chez la souris à l'aide de notre modèle transgénique, expriment la majorité des gènes *Hoxa*, et que leur niveau d'expression est significativement plus élevé que dans les B-ALLs induites par MMLV. De plus, la surexpression marquée des gènes *Hoxa* dans des échantillons normaux de cellules B portant la translocation *E2A-PBX1*, suggèrent qu'une dérégulation des gènes *Hoxa* a lieu avant le développement de la maladie, confirmant le stade pré-leucémique de ces échantillons. Nos résultats démontrent que les B-ALLs murines induites par E2A-PBX1 expriment les gènes *Hoxa2* à *Hoxa9*. Aussi, nous avons constaté des niveaux variables d'expression des gènes *Hoxa* dans les leucémies induites par E2A-PBX1 murines, tout comme chez les leucémies humaines. Les niveaux hautement variables de l'expression des gènes *HOXA* observés chez la souris et chez l'humain, semblent indiquer que les gènes *HOXA* jouent effectivement un rôle potentiel dans le développement de la maladie. La raison pour laquelle l'expression des gènes *HOXA* n'est pas élevée de manière constante dans toutes les leucémies *E2A-PBX1*, reste incertaine. Il est possible que les gènes de d'autres clusters (*HOXB*, *C* ou *D*) soient exprimés de manière aberrante, ou que des voies de signalisation n'appartenant pas aux voies HOX/PBX soient impliquées, par exemple celles impliquant le domaine KIX, et que celles-ci contribuent de manière plus prononcée à la leucémie *E2A-PBX1*, sans nécessiter des niveaux d'expression

élevé des gènes *HOX*. En effet, il est probable que la contribution d'une voie de signalisation ou d'une autre, varie d'une leucémie à l'autre. Le maintien de niveaux modérés d'expression des gènes *HOX*, pourrait être suffisant pour bloquer la différenciation des cellules, comme observé dans le cas d'une surexpression de *Hoxa9* au stade pré-B [132], ce qui correspond à la diminution de l'expression des gènes *HOX* qui a lieu lors de la différenciation et la maturation des cellules hématopoïétiques [119]. Nos résultats et les études précédentes effectuées à l'aide de notre modèle transgénique *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* suggèrent que les gènes *HoxA* sont des collaborateurs oncogéniques d'*E2A-PBX1* dans les B-ALLs.

4.2 *Hoxa9* confère un avantage prolifératif aux cellules B *E2A-PBX1* in vitro

Au laboratoire nous possédons un modèle murin unique qui reflète la leucémie humaine des cellules B induite par E2A-PBX1. Il s'agit d'un excellent outil de travail qui permet d'étudier les voies de signalisation et les mécanismes moléculaires sous-jacents à la maladie. L'étude des propriétés et des gènes cible d'un oncogène particulier se doit d'être fait dans l'environnement cellulaire approprié, puisqu'il est important de considérer les facteurs tissus-spécifiques qui pourraient jouer un rôle crucial, en limitant ou en supportant le potentiel oncogénique d'un oncogène particulier. L'interaction oncogénique entre *Hoxa9* et *E2A-PBX1* lors de la leucémie myéloïde, mais non lors de la leucémie des cellules T [113, 114], illustre bien comment le potentiel oncogénique peut être restreint à un environnement cellulaire particulier. *Hoxa9* est impliqué dans la production des cellules lymphoïdes, myéloïde et des érythrocytes. Il est parmi les gènes *Hox* les plus exprimés dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques au niveau fœtal et adulte [130]. Les souris mutantes pour *Hoxa9* présentent le phénotype le plus sévère parmi tous les mutants des gènes *Hox* [131], ce qui illustre bien son importance. De plus, le nombre et le potentiel prolifératif des progéniteurs pré-B est significativement réduit chez les souris *Hoxa9^{-/-}*, illustrant

bien l'importance du niveau d'expression d'*Hoxa9* lors du développement normal des cellules B [131]. À l'aide d'une surexpression rétrovirale de *Hoxa9* dans des cellules B triées provenant de souris transgénique *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* lymphoïde-spécifique, nous avons démontré qu'*Hoxa9* induit une expansion impressionnante des cellules pro-B *E2A-PBX1*, à un niveau qui n'est pas observé pour des cellules B exprimant *E2A-PBX1* ou *Hoxa9* individuellement. L'avantage prolifératif induit par l'action synergétique d'*E2A-PBX1* et *Hoxa9* suggèrent leur collaboration et l'activation de voies de signalisation complémentaires. Entre-autres, il serait possible que *Hoxa9* et *E2A-PBX1* régulent une voie qui contrôle la production de divers facteurs de croissance hématopoïétiques. Il serait simple et intéressant de tester la production potentielle de facteurs de croissance par les cellules co-exprimant *Hoxa9* et *E2A-PBX1 in vitro*, ce qui pourrait expliquer en partie l'induction d'une plus forte prolifération et les voies de signalisations impliquées dans la prolifération ou la différenciation des lymphocytes B, par exemple, de par la nature des facteurs de croissance produits. Nos résultats démontrent pour la première fois qu'*Hoxa9* confère un avantage prolifératif à des cellules pro-B primaires. L'expression intrinsèque de *Hoxa9* dans les cellules pro-B et son importance pour la génération des progéniteurs des cellules B [122, 131] concorde avec nos résultats.

4.3 Collaboration entre *Hoxa9* et *E2A-PBX1* lors de B-ALL murine

Différents modèles murins d'expression rétrovirale ou transgéniques ont démontré des interactions géniques entre *E2A-PBX1* et *Hoxa9* ou *Hoxb4* lors du développement de leucémies myéloïdes ou des cellules T, respectivement [113, 114]. Cette étude présente pour la première fois la collaboration entre un gène *Hox* et *E2A-PBX1* lors de la transformation de cellules B. Bien que le potentiel oncogénique de *Hoxa9* soit bien connu lors de l'induction de leucémie myéloïde [106, 107], nous démontrons que la transformation des cellules B par *Hoxa9*

dépend de la présence de *E2A-PBX1*. Ceci concorde avec l'absence de leucémie chez les souris *Hoxa9* transgéniques de manière lymphoïde-spécifique, suggérant que les cellules B sont réfractaires à une transformation induite par *Hoxa9* seul [132]. L'accélération significative du développement de la maladie en présence de *Hoxa9* supporte d'autant plus cette collaboration avec *E2A-PBX1*. La capacité de ré-initier la maladie chez des souris secondaires démontre que la leucémie ainsi induite est transplantable, confirmant que la maladie est due au potentiel oncogénique intrinsèque spécifique de ces cellules B et non au microenvironnement. Nos résultats démontrent qu'*Hoxa9* peut induire la transformation de progéniteurs hématopoïétiques avancés en présence de son collaborateur oncogénique approprié, dans ce cas-ci, *E2A-PBX1*. Ceci avait été démontré pour *Hoxb4*, qui possède un faible potentiel leucémique en soit, mais qui peut être activé par un nombre limité d'oncogènes, tel *Meis1*, *LMO2*, *prdm16*, ainsi que *E2A-PBX1* dans les cellules T [114, 133, 134]. Avec nos résultats, ceci permet aussi de mettre l'emphase sur le contexte cellulaire qui semble restreindre l'activité de certains gènes *Hox* avec l'oncogène *E2A-PBX1*; dans les cellules T dans le cas de *Hoxb4* et dans les cellules B dans le cas de *Hoxa9*. Un des gènes cible identifié d'*E2A-PBX1*, est un membre de la famille Wnt, *Wnt16b* [84]. Plus récemment, un profil d'expression génique a démontré une surexpression de *Wnt16* dans les blastes leucémiques exprimant *E2A-PBX1* [135], et son expression semble essentielle à la survie de lignées de cellules humaines possédant la translocation t (1;19) [136]. L'activation de la voie Wnt par *E2A-PBX1* n'est probablement pas la seule contribution oncogénique requise pour la transformation en présence de *Hoxa9*, puisque le développement normale des cellules B requiert aussi une signalisation via Wnt, plus particulièrement au niveau pro-B [137, 138]. En conséquence, il n'est pas surprenant que nos leucémies *E2A-PBX1/Hoxa9* présentent principalement un phénotype de type pro-B (B220+/CD43+/IgM-). Parmi les autres gènes cible identifiés d'*E2A-PBX1*, on note *Bmi-1* [139], qui est un membre de la famille des répresseurs transcriptionnel Polycomb (PcG). Les

protéines PcG permettent de maintenir les profils d'expression des gènes *Hox*, et sont impliquées dans divers cancer humains [2]. En effet, *Bmi-1* est essentiel pour le maintien normal des HSCs et des cellules souches leucémiques myéloïdes [140, 141], et sa surexpression induit la leucémie lymphoïde chez la souris [142]. Même si *Bmi-1* ne semble pas être une cible directe de *E2A-PBX1*, les niveaux élevés de *Bmi-1* dans des cellules humaines pré-B portant la translocation t(1;19) ou lors de l'induction expérimentale de *E2A-PBX1*, ainsi que l'absence de transformation par *E2A-PBX1* de progéniteurs hématopoïétique déficients en *Bmi-1* [139], laisse penser que ce dernier est un gène cible en aval de la protéine chimérique *E2A-PBX1* dans les leucémies humaines de type pré-B. Étant donné que *Bmi-1* est un régulateur épigénétique des gènes *Hox*, il semble surprenant qu'il soit situé en aval de *E2A-PBX1*, lui-même un partenaire de liaison des gènes *Hox*. Les résultats liant *Bmi-1* et *E2A-PBX1* soulèvent donc l'hypothèse selon laquelle *E2A-PBX1* déclencherait une boucle rétroactive, qui augmenterait les niveaux de *Bmi-1*, en raison d'une activité transcriptionnelle altérée par les complexes E2A-PBX/HOX [139]. L'implication de la voie de signalisation Wnt et celle du gène *Bmi-1* via leur régulation des *Hox* dans les leucémies induites par *E2A-PBX1* reste cependant à déterminer.

4.4 La collaboration entre *E2A-PBX1* et *Hoxa9* lors de la B-ALL implique l'activation de *Flt3*

Les résultats obtenus par Q-RT-PCR suggèrent qu'une signalisation via *Flt3* joue un rôle lors l'accélération des leucémies *E2A-PBX1* par *Hoxa9*, et qu'elle est impliquée lors de l'augmentation de la cinétique de prolifération des cellules leucémiques *E2A-PBX1* déjà établies lorsque *Hoxa9* est surexprimé, contribuant ainsi au potentiel oncogénique des cellules B *E2A-PBX1/Hoxa9*. Précédemment, *Hoxa9* avait été impliqué dans la régulation de *Flt3*, lors d'une étude qui démontrait que *Hoxa9* et *Meis1* se lient au promoteur de *Flt3* in vivo dans une lignée de cellules myéloïde [143]. Nos résultats sont aussi en accord avec une

étude récente qui démontre que *Hoxa9* régule *Flt3* de manière directe, en se liant à son promoteur *in vivo*. Normalement, le récepteur tyrosine kinase FLT3 est principalement exprimée sur la surface des progéniteurs hématopoïétiques, tandis que son ligand, Flk2-L, est exprimé par les organes hématopoïétiques (sang périphérique, rate, thymus, et moelle osseuse) et presque tous les tissus [144]. Flk2-L induit la dimérisation et l'activation du récepteur FLT3, qui à son tour induit l'activation de la kinase phosphatidylinositol-3 (PI3K) et la voie de signalisation RAS [144]. La réduction du nombre de cellules B, mais le maintien normal des populations de cellules hématopoïétiques matures chez des souris mutantes pour FLT3, indique le rôle important du récepteur lors de la lymphopoïèse B normale [19]. En plus de son expression normale et restreinte sur les progéniteurs hématopoïétiques CD34+, le récepteur tyrosine kinase FLT3/Flk2 s'avère aussi exprimé sur la surface de cellules hématopoïétiques malignes [145]. FLT3 est surexprimé chez 70% à 100% des patients atteints d'AML, environ 30% des patients atteints de T-ALL, et essentiellement chez tous les patients atteints de B-ALL [146]. Dans le cas des AMLs, les mutations activatrices de FLT3 représentent la forme la plus commune de mutation somatique génétique associée à un mauvais pronostic [147]. La forme la plus commune de mutation activatrice est une duplication en tandem interne (IDT) de 3 à 400 paires de bases des exons 14 ou 15, qui code pour le domaine membranaire de FLT3 [148]. La deuxième forme la plus commune est une mutation du domaine tyrosine kinase du récepteur (TKD), qui le plus souvent substitue un acide aspartique en résidu tyrosine (D835Y) [148]. Ces deux types de mutations activent le récepteur FLT3 de manière constitutive, indépendamment du ligand, causant une dérégulation des voies de signalisation en aval. La stimulation par FL de cellules leucémiques surexprimant FLT3 augmente la prolifération et réduit l'apoptose [149]. Même si une surexpression de FLT3 est présente dans 70 à 100% des cas d'AML et d'ALL, seule une fraction de ces cas présente une mutation activatrice [148]. Une étude récente a rapporté des niveaux d'expression élevés de FLT3 chez une proportion

élevée de patients atteints d'AML ne présentant pas de mutation de FLT3 [150], mais comme dans le cas d'une mutation activatrice, le récepteur semble être constitutivement actif et ainsi contribuer à une signalisation altérée, caractéristique de la leucémogénèse [151]. Les auteurs de cette étude ont démontré que la surexpression exogène du ligand FLT3 sauvage suffit à activer le récepteur de manière constitutive lorsque les niveaux d'expressions sont supérieurs à 200 000 copies, pour une fraction des AML [150]. Ceci démontre l'importance du niveau d'expression de FLT3 et que la signalisation intracellulaire via la liaison de FLT3 à son récepteur, module le phénotype fonctionnel des AML, en présence ou non d'anormalité génétique du récepteur. Lors de la différenciation des cellules B, les gènes *E2A*, *EBF* et *PAX5* jouent un rôle séquentiel et synergique. L'induction de *Pax5* par *E2A* et *EBF* est essentielle pour la restriction des progéniteurs à la lignée B [38]. Holmes et al. ont démontré qu'une des fonctions clé de *Pax5* lors de la détermination des lymphocytes à la lignée B est de réprimer directement l'expression de *Flt3*, un processus requis pour le développement normal des cellules B [39]. La forte inhibition de l'expression d'*Ebfl* et *Pax5* suggère qu'une répression de la différenciation des cellules B accompagne, et semble donc aider à maintenir l'expression de *Flt3* et les signaux de prolifération qui l'accompagne, dans nos cellules B leucémiques *E2A-PBX1/Hoxa9*. Les résultats de cette étude nous indiquent que la surexpression de manière rétrovirale d'*Hoxa9* dans des cellules *E2A-PBX1/CD3ε^{-/-}* résulte en une augmentation de la prolifération *in vitro* et une diminution du temps de latence de la maladie, accompagnée d'une augmentation de l'expression de *Flt3* au niveau transcriptionnel. La contribution de *Flt3* au développement et au maintien du phénotype observé est intéressante, mais reste à confirmer et à caractériser d'un point de vue fonctionnel. Il est important de déterminer si l'augmentation des niveaux d'ARNm observés se reflète par une augmentation équivalente des récepteurs à la surface des cellules et d'établir l'intérêt fonctionnel de ce récepteur

dans le cas de la leucémie induite par *E2A-PBX1/Hoxa9*, en inhibant ou en stimulant le récepteur à l'aide de shRNA. Ainsi, ceci nous permettrait de déterminer si la leucémie induite par *E2A-PBX1/Hoxa9* dépend, du moins en partie, de la présence du récepteur de surface CD135, ce qui pourrait avoir un potentiel thérapeutique ciblé.

4.5 *Hoxa9* induit une dérégulation des gènes lymphoïde-spécifiques en présence de E2A-PBX1

Finalement, nos résultats montrent que le potentiel de prolifération et de ré-initiation de leucémies des cellules B primaires était augmenté en présence de *Hoxa9*. Notre analyse d'expression génétique ciblée a démontré que *Flt3* et *Pdgfδ* pourraient contribuer à ces fonctions biologiques. *Pdgfδ* code pour un facteur de croissance appartenant à la famille des PDGF (platelet-derived growth factor). Les PDGFs sont composés de quatre chaînes polypeptidiques codées par différents gènes, et contiennent 4 membres identifiés jusqu'à présent : PDGF A-D. Les PDGFs exercent leurs effets cellulaires en activant deux récepteurs tyrosine kinase, PDGF- α et PDGF- β . PDGF-D est un facteur de croissance récemment caractérisé, qui régule différents processus cellulaires, tels la prolifération, la transformation, l'invasion et l'angiogenèse, en se liant à son récepteur PDGF- β , et en activant la signalisation via la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt [152]. Jusqu'à présent, quelques études ont démontré le potentiel oncogénique de PDGF-D lors du développement et la progression de divers cancers, incluant celui de la prostate et du pancréas [153, 154], illustrant bien le rôle important que peut jouer une surexpression de PDGF- β lors de l'oncogenèse de divers types de cancers. De plus, des gènes associés à la différenciation myéloïde, tels *Cebpa* et *Runx3*, présentaient un niveau d'expression plus élevé en présence de *Hoxa9* dans ces cellules leucémiques, ce qui reflète la nécessité de *Hoxa9* lors de la différenciation myéloïde [131] et sa capacité d'induire la leucémie myéloïde chez la souris [106, 107]. De plus, la surexpression de *Id3*, un gène associé à la répression de la

différentiation lymphocytaire, en présence de *Hoxa9*, concorde avec le fait que *Hoxa9* doit être inhibé au cours de la différenciation des cellules B afin de permettre la spécification des cellules B par *Ebfl* et *Pax5*. Qui plus est, les souris transgéniques lymphoïde-spécifique pour *Hoxa9* présentent un blocage partiel au niveau des cellules pré-B [132]. Le fait que sept gènes, incluant *Sox4* un gène cible d'*Hoxa9*, soient différenciellement exprimés dans les deux leucémies *E2A-PBX1* primaires reste intrigant. Il est connu que les complexes HOX-PBX peuvent agir à titre d'activateurs ou de répresseurs transcriptionnel dépendamment du recrutement de différents facteurs, ce qui suggère que le profil moléculaire de ces deux leucémies est différent. De ce fait, il est important de considérer que les sites principaux des deux leucémies, et donc potentiellement les sites d'initiation de la maladie, étaient différents. La leucémie #111 se situait dans le foie, tandis que la leucémie #225 se présentait principalement dans la rate, ce qui pourrait expliquer les différences d'expressions pour les composantes de la matrice extracellulaire et les molécules d'adhésion.

En conclusion, ces résultats montrent une interaction oncogénique entre *Hoxa9* et *E2A-PBX1* lors de la transformation des cellules B, qui pourrait être régulé via des voies de signalisation complémentaires qui impliquent une prolifération conférée par *Flt3* et *Pdgfδ* en plus d'une inhibition du programme de différenciation des cellules B, reflétée par l'inhibition de l'expression des gènes cellules-B spécifique *Ebfl* et *Pax5*. L'importance d'une telle association entre les voies impliquant HOX pour le maintien des B-ALLs induites par E2A-PBX1 reste à être déterminé.

4.6 Dérégulation de l'expression de *Zap70* et *Egr1* en présence de l'oncogène E2A-PBX1

La comparaison des PEG des cellules PL aux cellules WT nous indique que seuls 13 gènes sont dérégulés et sont donc liés à des événements pré-leucémiques potentiels, et que les deux gènes, *Egr1* (early growth response 1) et *Zap70* (zeta-chain (TCR) associated protein kinase (**Table VII**) semblent être reliés par un

processus biologique commun qui est l'activation et la différenciation des lymphocytes. Contrairement aux cellules saines, dont la prolifération est régulée, les cellules cancéreuses présentent un arrêt de leur différenciation et une prolifération incontrôlée caractéristiques [155]. *Zap70*, une protéine kinase de la famille Syk, est exprimé dans les cellules T, NK et B [156]. Lors du développement des cellules B, *Zap70* joue normalement un rôle lors de la transition pro-B à pré-B dans la moelle osseuse [157], qui est contrôlé par la signalisation via le récepteur pré-B (pre-BCR). *ZAP70* est aussi un marqueur de pronostic lors des leucémies lymphoblastiques chronique (CLL) où la signalisation via le pré-BCR est augmentée de manière aberrante [158]. *Egr1* code pour un facteur de transcription à doigt de zinc qui est induit à travers divers signaux mitogènes dans divers type de cellules, incluant les lymphocytes B et T. Dans le cas des lymphocytes B, *Egr1* fonctionne en tant que facteur de régulation positif dont l'expression est induite par stimulation à travers le récepteur des cellules B (BCR), via l'activation de la protéine kinase C (PKC) [159]. Récemment, il a été démontré qu'E2A-PBX1 interagit directement avec le domaine KIX des co-activateurs transcriptionnels CBP/p300 lors de l'induction de la prolifération de cellules hématopoïétiques primaires [76]. En effet, il a été démontré que la liaison directe de CBP/p300 au domaine d'activation transcriptionnel en N-terminal des protéines E12/E47 contribue à leur fonction et à l'induction de la leucémie induite par E2A-PBX1, et que cette association augmente l'activité catalytique de CBP/p300, qui possède une activité d'histone acétyle transférase (HAT) intrinsèque [160]. Les protéines CBP et p300 sont des régulateurs clés de la transcription, et sont des activateurs co-transcriptionnels d'*Egr-1* [161]. Dans les cellules cancéreuses, même si les facteurs de transcription ne sont pas fréquemment mutés, ils sont souvent constitutivement activés via des mutations qui affectent des molécules présentes dans les voies de signalisation en amont de ceux-ci, comme c'est le cas pour CREB/p300. La phosphorylation et l'activation de CREB/p300 par diverses kinases régule divers gènes dont l'expression

inappropriée est oncogénique, tels les cyclines, les membres de la famille *Bcl-2* ou *Egr-1* [160]. Ainsi, la dérégulation de l'expression d'*Egr1* en présence de l'oncogène E2A-PBX1 pourrait se faire via l'action conjointe de CBP/p300. De plus, l'implication du récepteur BCR dans la régulation normale de *Zap70* et *Egr1*, suggère que la signalisation via le récepteur BCR soit altérée en présence de la protéine E2A-PBX1, résultant en une dérégulation de l'expression de ces deux gènes. *Egr1*, un régulateur bien établie de l'hématopoïèse, a récemment été identifié comme un des gènes candidats impliqué dans l'auto-renouveau des HSCs [162]. Récemment, la recherche d'effecteurs potentiels de HOXB4, un facteur majeur d'expansion des HSCs murines et humaines, et de son paralogue HOXC4, a permis d'identifier *Egr1* comme un des gènes clé dont l'expression est dérégulée suite à l'exposition de cellules CD34+ aux facteurs HOXB4 ou HOXC4 [163]. Ces études identifient donc *Egr1* comme un des facteurs clés en aval de la voie HOX, et potentiellement impliqué dans l'expansion des cellules souches hématopoïétiques ou dans la leucémogénèse, comme illustré dans le modèle hypothétique à la **Figure 16B**.

Il s'agit de résultats préliminaires, et l'expression des gènes candidats obtenus lors de cette analyse devra être analysée par Q-RT-PCR à l'aide d'un nombre plus large de leucémies E2A-PBX1 murines. De plus, l'expression de ces gènes dans des échantillons humains de leucémies induites par E2A-PBX1 devra être validée à l'aide de bases de données d'expression existantes. Cette approche, combinée à d'autres techniques, nous permettra d'identifier de nouvelles molécules cibles de E2A-PBX1, et donc de cibles thérapeutiques potentielles. Ultérieurement, la combinaison de cette approche à d'autres techniques, par exemple à l'identification de gènes par RNA-Seq ou l'identification de protéines interagissant avec E2A-PBX1 par CHIP, nous permettra d'approfondir notre compréhension de

la pathologie de cette maladie et des mécanismes moléculaires par lesquels E2A-PBX1 contribue à la transformation des progéniteurs lymphoïdes des cellules B.

4.7 Directions futures

4.7.1 Évaluation de la dépendance des gènes *Hoxa* lors de la génération et le maintien de la leucémie des cellules B induite par E2A-PBX1

L'analyse d'expression des gènes *Hoxa* nous indique qu'ils sont actifs dans les B-ALLs murines. De plus, il a été démontré que l'absence de *Hoxa7* et *Hoxa9* entrave dramatiquement le développement de la leucémie myéloïde induite par les oncogènes de fusion impliquant MLL [164]. Ainsi, et avec l'appui de nos résultats, l'hypothèse est que l'activation de la voie HOX est essentielle pour la leucémogénèse induite par *E2A-PBX1*. À l'aide du modèle E2A-PBX1 que nous possédons au laboratoire, nous avons généré des souris conditionnelles pour le locus *Hoxa*, qui développent, de la même manière, des leucémies des cellules B induites par *E2A-PBX1*. Ce modèle MxCre, qui est activé par polyI-polyC permettra d'exciser tout le locus *Hoxa* dans les cellules hématopoïétiques des souris *E2A-PBX1/CD3 ϵ ^{-/-} /Hoxa^{flox/flox}/Mx-Cre* déjà générées. Ceci permettra d'évaluer l'implication des gènes *Hoxa* lors de la leucémogénèse. Nous nous attendons à ce qu'une absence des gènes *Hoxa* prévienne le développement de la leucémie, ou à tout du moins à une augmentation du temps de latence pour l'initiation de la maladie. Ceci permettra de définir un rôle pour les gènes *Hoxa* dans la pathogénèse ou la maintenance de la leucémie induite par *E2A-PBX1*. À plus long terme, il sera ainsi possible d'évaluer individuellement, par expression à l'aide de réinsertion provirale, quel gène *Hoxa* est requis pour le maintien de la leucémie des cellules B *E2A-PBX1*.

Ces expériences contribueront à l'avancement des connaissances sur les gènes *Hox* et leur implication dans les leucémies, et révélera si la voie HOX est une cible potentielle thérapeutique pour les leucémies induites par E2A-PBX1.

4.7.2 Caractérisation des interactions HOX-E2A-PBX1 au niveau protéique

Les mécanismes par lesquels *E2A-PBX1* induit la leucémie restent encore mal connus. Les résultats présentés ici nous ont permis d'identifier les gènes du locus *Hoxa* comme des collaborateurs potentiels d'*E2A-PBX1* dans la leucémogénèse des cellules B. Comme on s'attend à ce qu'E2A - PBX1 fonctionne en complexe avec divers partenaires protéiques, incluant les protéines HOX, il est fort probable que E2A-PBX1 dépend de partenaires protéiques pour l'induction de la leucémie des cellules B. Il serait donc fort pertinent de caractériser les interactions entre les protéines E2A-PBX1 et HOX, ainsi que d'identifier de nouvelles protéines interagissant avec E2A-PBX1 qui pourraient être requise pour la leucémogénèse des cellules B induite par E2A-PBX1. L'identification de ces partenaires et des gènes cibles d'E2A-PBX1 permettrait une meilleure compréhension des voies transcriptionnelles menant au développement de cette maladie et pourrait inclure de nouvelles cibles potentielles pour le développement de médicament.

4.8 Conclusion

Le mécanisme par lequel E2A-PBX1 induit la leucémie est encore mal connu, or le long temps de latence avant le développement de la maladie suggère que d'autres événements génétiques sont requis pour l'induction de la leucémie. Nous avons donc posé l'hypothèse que les gènes *Hox* collaborent avec E2A-PBX1 lors de l'induction de la leucémie des cellules B, et que l'activation de la voie Hox est essentielle lors de la génération de B-ALL dans le contexte de l'oncogène E2A-PBX1.

En conclusion, les observations issues de cette étude suggèrent une interaction oncogénique entre *Hoxa9* et *E2A-PBX1* lors de la transformation des cellules B, et que cette collaboration semble impliquer des voies de signalisation complémentaires. Les voies de signalisation suggérée par nos résultats semblent impliquer une prolifération cellulaire conférée par *Flt3* et *Pdgfδ*, ainsi qu'une inhibition au niveau des voies contrôlant le développement des cellules B. L'importance d'une association de ces voies de signalisation avec la voie HOX pour le maintien de la leucémie des cellules B induite par E2A-PBX1 reste à être déterminée.

Nos résultats démontrent que l'interaction entre *E2A-PBX1* et *Hoxa9* affecte la prolifération des cellules leucémiques, en plus d'accélérer l'induction de la maladie. Nos résultats supportent un modèle hypothétique où la formation d'hétérodimères E2A-PBX1/HOX sur les sites de liaison de PBX/HOX, induirait une dérégulation transcriptionnelle et l'induction de la leucémie. Les hétérodimères E2A-PBX1/HOX possédant de fortes propriétés d'activation transcriptionnelle comparativement aux hétérodimères PBX/HOX, qui induisent généralement une répression transcriptionnelle. Ces hétérodimères E2A-PBX1/HOXA9 pourraient jouer un rôle indirect en régulant de manière aberrante la régulation du cycle ou de la prolifération cellulaire en activant les gènes cibles des complexes PBX1/HOX.

Cette activation transcriptionnelle pourrait impliquer l'action de Meis1, un cofacteur Hox, qui se lie directement avec *Hoxa9* [123]. Choe al. (2009) ont démontré que Meis1 agit en partie en contrôlant l'accès des histones désacétylases et CBP aux promoteurs régulés par les gènes *Hox* [165]. Nos résultats démontrent une collaboration oncogénique entre *E2A-PBX1* et *Hoxa9*, qui semble se faire via l'activation transcriptionnelle de *Flt3*. Le modèle hypothétique (**Figure16**) pourrait impliquer la participation de Meis1, via sa liaison à *Hoxa9*, et ainsi le déplacement de HDAC et le recrutement de CBP aux promoteurs des gènes cibles,

causant la dérégulation de leur expression, et donc une dérégulation de la prolifération, un arrêt de la différenciation et des défauts hématopoïétiques, caractéristiques des cellules leucémiques.

L'identification des collaborateurs oncogéniques et des gènes cibles de E2A-PBX1 aurait un impact important sur les ALLs humaines portant la translocation t(1;19), en permettant la génération de molécules inhibitrices de protéines cibles spécifiques.

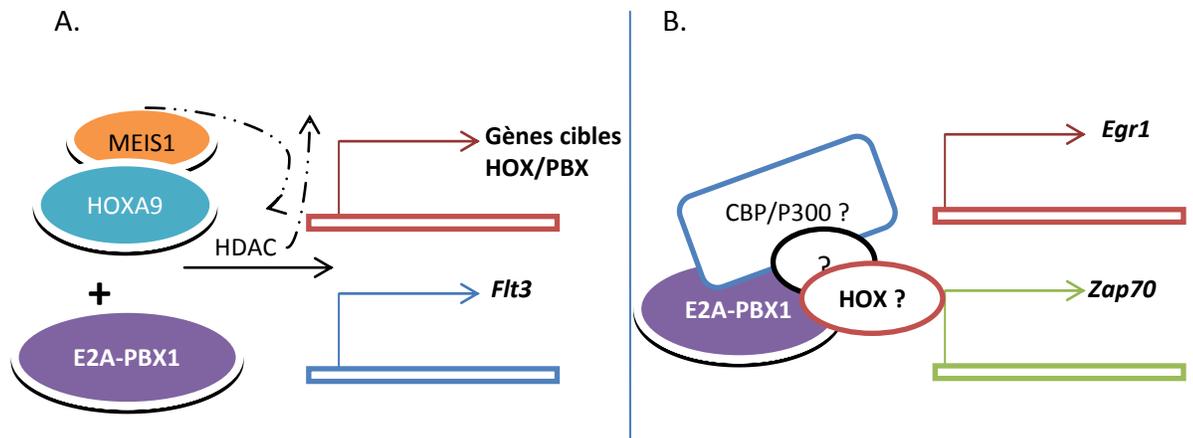


Figure 16. Modèle d'une collaboration oncogénique entre E2A-PBX1 et Hoxa9 lors de l'induction de B-ALL.

- (A) Comme supporté par nos résultats, E2A-PBX1 collabore avec Hoxa9 lors de l'induction de B-ALL, potentiellement via l'activation transcriptionnelle de *Flt3*. Cette collaboration oncogénique se fait hypothétiquement via la collaboration de Meis1, cofacteur de Hoxa9, qui contrôle en partie l'accès de HDAC aux promoteurs des gènes cibles. (B) Modèle hypothétique basé sur nos résultats de microarray, qui démontrent une dérégulation de l'expression de *Zap70* et *Egr1* lors de l'induction de B-ALL. En accord avec des publications précédentes, notre modèle pourrait impliquer le recrutement des activateurs transcriptionnels CPB/p300, ainsi que divers cofacteurs encore inconnus.

Bibliographie

1. Doulatov, S., et al., *Hematopoiesis: a human perspective*. Cell Stem Cell, 2012. 10(2): p. 120-36.
2. Ezoe, S., et al., *Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells*. Cell Cycle, 2004. 3(3): p. 314-8.
3. Fey, M.F., *Normal and malignant hematopoiesis*. Ann Oncol, 2007. 18 Suppl 1: p. i9-i13.
4. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. 132(4): p. 631-44.
5. Rekhtman, N., et al., *Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells*. Genes & Development, 1999. 13(11): p. 1398-1411.
6. Orkin, S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*. Nat Rev Genet, 2000. 1(1): p. 57-64.
7. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *B cell development pathways*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 595-621.
8. Kang, J. and S.D. Der, *Cytokine functions in the formative stages of a lymphocyte's life*. Curr Opin Immunol, 2004. 16(2): p. 180-90.
9. Milne, C.D. and C.J. Paige, *IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis*. Semin Immunol, 2006. 18(1): p. 20-30.
10. Busslinger, M., *Transcriptional control of early B cell development*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 55-79.
11. Miller, J.P., et al., *The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7*. J Exp Med, 2002. 196(5): p. 705-11.
12. Puel, A., et al., *Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency*. Nat Genet, 1998. 20(4): p. 394-7.

13. Prieyl, J.A. and T.W. LeBien, *Interleukin 7 independent development of human B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(19): p. 10348-53.
14. Parrish, Y.K., et al., *IL-7 Dependence in human B lymphopoiesis increases during progression of ontogeny from cord blood to bone marrow*. J Immunol, 2009. 182(7): p. 4255-66.
15. Ogawa, M., et al., *Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells*. J Exp Med, 1991. 174(1): p. 63-71.
16. Russell, E.S., *Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists*. Adv Genet, 1979. 20: p. 357-459.
17. Takeda, S., T. Shimizu, and H.R. Rodewald, *Interactions between c-kit and stem cell factor are not required for B-cell development in vivo*. Blood, 1997. 89(2): p. 518-25.
18. Waskow, C., et al., *Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis*. Immunity, 2002. 17(3): p. 277-88.
19. Mackarechtschian, K., et al., *Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors*. Immunity, 1995. 3(1): p. 147-61.
20. McKenna, H.J., et al., *Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells*. Blood, 2000. 95(11): p. 3489-3497.
21. Sitnicka, E., et al., *Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis*. J Exp Med, 2003. 198(10): p. 1495-506.
22. Singh, H., K.L. Medina, and J.M. Pongubala, *Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(14): p. 4949-53.
23. John, L.B. and A.C. Ward, *The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity*. Mol Immunol, 2011. 48(9-10): p. 1272-8.

24. Ramirez, J., K. Lukin, and J. Hagman, *From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment*. *Curr Opin Immunol*, 2010. 22(2): p. 177-84.
25. Nutt, S.L. and B.L. Kee, *The transcriptional regulation of B cell lineage commitment*. *Immunity*, 2007. 26(6): p. 715-25.
26. Medina, K.L., et al., *Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate*. *Dev Cell*, 2004. 7(4): p. 607-17.
27. DeKoter, R.P., H.J. Lee, and H. Singh, *PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors*. *Immunity*, 2002. 16(2): p. 297-309.
28. O'Riordan, M. and R. Grosschedl, *Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A*. *Immunity*, 1999. 11(1): p. 21-31.
29. Lin, H. and R. Grosschedl, *Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF*. *Nature*, 1995. 376(6537): p. 263-7.
30. Zhuang, Y., P. Soriano, and H. Weintraub, *The Helix-Loop-Helix Gene E2a Is Required for B-Cell Formation*. *Cell*, 1994. 79(5): p. 875-884.
31. Bain, G., et al., *Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage*. *Immunity*, 1997. 6(2): p. 145-154.
32. Smith, E.M., R. Gisler, and M. Sigvardsson, *Cloning and characterization of a promoter flanking the early B cell factor (EBF) gene indicates roles for E-proteins and autoregulation in the control of EBF expression*. *J Immunol*, 2002. 169(1): p. 261-70.
33. Liu, P.T., et al., *Bcl11a is essential for normal lymphoid development*. *Nature Immunology*, 2003. 4(6): p. 525-532.
34. Adams, B., et al., *Pax-5 Encodes the Transcription Factor Bsap and Is Expressed in Lymphocytes-B, the Developing Cns, and Adult Testis*. *Genes & Development*, 1992. 6(9): p. 1589-1607.

35. Li, Y.S., et al., *Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow*. *Immunity*, 1996. 5(6): p. 527-35.
36. Fuxa, M. and M. Busslinger, *Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of Pax5 in support of its B cell identity function*. *J Immunol*, 2007. 178(12): p. 8222-8.
37. Urbanek, P., et al., *Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP*. *Cell*, 1994. 79(5): p. 901-12.
38. Nutt, S.L., et al., *Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5*. *Nature*, 1999. 401(6753): p. 556-62.
39. Holmes, M.L., et al., *Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment*. *Genes Dev*, 2006. 20(8): p. 933-8.
40. Passegue, E. and I.L. Weisman, *Leukemic stem cells: where do they come from?* *Stem Cell Rev*, 2005. 1(3): p. 181-8.
41. Harrison, C.J., *Acute lymphoblastic leukaemia*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2001. 14(3): p. 593-607.
42. Teitell, M.A. and P.P. Pandolfi, *Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia*. *Annu Rev Pathol*, 2009. 4: p. 175-98.
43. Harrison, C.J. and L. Foroni, *Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia*. *Rev Clin Exp Hematol*, 2002. 6(2): p. 91-113; discussion 200-2.
44. Carroll, W.L., et al., *Pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2003: p. 102-31.
45. Pui, C.H., et al., *Immunologic, cytogenetic, and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1;19) (q23; p13) or its derivative*. *J Clin Oncol*, 1994. 12(12): p. 2601-6.
46. Crist, W.M., et al., *Poor Prognosis of Children with Pre-B Acute Lymphoblastic-Leukemia Is Associated with the T(1-19)(Q23-P13) - a Pediatric Oncology Group-Study*. *Blood*, 1990. 76(1): p. 117-122.

47. Kamps, M.P., et al., *A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL*. Cell, 1990. 60(4): p. 547-55.
48. Hunger, S.P., *Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis*. Blood, 1996. 87(4): p. 1211-24.
49. Lassar, A.B., et al., *Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo*. Cell, 1991. 66(2): p. 305-15.
50. Lee, J.E., et al., *Conversion of Xenopus ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein*. Science, 1995. 268(5212): p. 836-44.
51. Glick, E., D. Leshkowitz, and M.D. Walker, *Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter*. J Biol Chem, 2000. 275(3): p. 2199-204.
52. Rutherford, M.N. and D.P. LeBrun, *Restricted expression of E2A protein in primary human tissues correlates with proliferation and differentiation*. Am J Pathol, 1998. 153(1): p. 165-73.
53. Bain, G., S. Gruenwald, and C. Murre, *E2A and E2-2 are subunits of B-cell-specific E2-box DNA-binding proteins*. Mol Cell Biol, 1993. 13(6): p. 3522-9.
54. Shen, C.P. and T. Kadesch, *B-cell-specific DNA binding by an E47 homodimer*. Mol Cell Biol, 1995. 15(8): p. 4518-24.
55. Aronheim, A., et al., *The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(17): p. 8063-7.
56. Massari, M.E., P.A. Jennings, and C. Murre, *The AD1 transactivation domain of E2A contains a highly conserved helix which is required for its activity in both Saccharomyces cerevisiae and mammalian cells*. Mol Cell Biol, 1996. 16(1): p. 121-9.

57. Quong, M.W., et al., *A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells*. Mol Cell Biol, 1993. 13(2): p. 792-800.
58. Massari, M.E., et al., *A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex*. Mol Cell, 1999. 4(1): p. 63-73.
59. Gehring, W.J., M. Affolter, and T. Burglin, *Homeodomain proteins*. Annu Rev Biochem, 1994. 63: p. 487-526.
60. Monica, K., et al., *PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1*. Mol Cell Biol, 1991. 11(12): p. 6149-57.
61. Wagner, K., et al., *Pbx4, a new Pbx family member on mouse chromosome 8, is expressed during spermatogenesis*. Mech Dev, 2001. 103(1-2): p. 127-31.
62. DiMartino, J.F., et al., *The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver*. Blood, 2001. 98(3): p. 618-26.
63. Sanyal, M., et al., *B-cell development fails in the absence of the Pbx1 proto-oncogene*. Blood, 2007. 109(10): p. 4191-9.
64. Nourse, J., et al., *Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor*. Cell, 1990. 60(4): p. 535-45.
65. Rauskolb, C., M. Peifer, and E. Wieschaus, *extradenticle, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene pbx1*. Cell, 1993. 74(6): p. 1101-12.
66. Peifer, M. and E. Wieschaus, *Mutations in the Drosophila gene extradenticle affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity*. Genes Dev, 1990. 4(7): p. 1209-23.

67. Lu, Q.A., et al., *Both Pbx1 and E2a-Pbx1 Bind the DNA Motif Atcaatcaa Cooperatively with the Products of Multiple Murine Hox Genes, Some of Which Are Themselves Oncogenes*. *Molecular and Cellular Biology*, 1995. 15(7): p. 3786-3795.
68. van Dijk, M.A., L.T. Peltenburg, and C. Murre, *Hox gene products modulate the DNA binding activity of Pbx1 and Pbx2*. *Mech Dev*, 1995. 52(1): p. 99-108.
69. Chang, C.P., et al., *Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins*. *Genes Dev*, 1995. 9(6): p. 663-74.
70. Phelan, M.L., I. Rambaldi, and M.S. Featherstone, *Cooperative Interactions between Hox and Pbx Proteins Mediated by a Conserved Peptide Motif*. *Molecular and Cellular Biology*, 1995. 15(8): p. 3989-3997.
71. Chang, C.P., I. de Vivo, and M.L. Cleary, *The Hox cooperativity motif of the chimeric oncoprotein E2a-Pbx1 is necessary and sufficient for oncogenesis*. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(1): p. 81-8.
72. Saleh, M., et al., *A conformational change in PBX1A is necessary for its nuclear localization*. *Experimental Cell Research*, 2000. 260(1): p. 105-115.
73. Rabbitts, T.H., *Chromosomal translocations in human cancer*. *Nature*, 1994. 372(6502): p. 143-9.
74. Monica, K., et al., *Transformation Properties of the E2a-Pbx1 Chimeric Oncoprotein - Fusion with E2a Is Essential, but the Pbx1 Homeodomain Is Dispensable*. *Molecular and Cellular Biology*, 1994. 14(12): p. 8304-8314.
75. Vandijk, M.A., P.M. Voorhoeve, and C. Murre, *Pbx1 Is Converted into a Transcriptional Activator Upon Acquiring the N-Terminal Region of E2a in Pre-B-Cell Acute Lymphoblastoid Leukemia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. 90(13): p. 6061-6065.

76. Bayly, R., et al., *E2A-PBX1 interacts directly with the KIX domain of CBP/p300 in the induction of proliferation in primary hematopoietic cells.* J Biol Chem, 2004. 279(53): p. 55362-71.
77. Bayly, R., et al., *Critical role for a single leucine residue in leukemia induction by E2A-PBX1.* Mol Cell Biol, 2006. 26(17): p. 6442-52.
78. Bain, G., et al., *E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas.* Mol Cell Biol, 1997. 17(8): p. 4782-91.
79. Engel, I. and C. Murre, *Ectopic expression of E47 or E12 promotes the death of E2A-deficient lymphomas.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(3): p. 996-1001.
80. Saleh, M., et al., *Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases.* Mol Cell Biol, 2000. 20(22): p. 8623-33.
81. Lu, Q., D.D. Wright, and M.P. Kamps, *Fusion with E2a Converts the Pbx1 Homeodomain Protein into a Constitutive Transcriptional Activator in Human Leukemias Carrying the T(119) Translocation.* Molecular and Cellular Biology, 1994. 14(6): p. 3938-3948.
82. Kamps, M.P., D.D. Wright, and Q. Lu, *DNA-binding by oncoprotein E2A-Pbx1 is important for blocking differentiation but dispensable for fibroblast transformation.* Oncogene, 1996. 12(1): p. 19-30.
83. Fu, X.Y., et al., *EB-1, a tyrosine kinase signal transduction gene, is transcriptionally activated in the t(1;19) subset of pre-B ALL, which express oncoprotein E2a-Pbx1.* Oncogene, 1999. 18(35): p. 4920-4929.
84. McWhirter, J.R., et al., *Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. 96(20): p. 11464-11469.

85. Lewis, E.B., *Gene Complex Controlling Segmentation in Drosophila*. Nature, 1978. 276(5688): p. 565-570.
86. Duboule, D., *The rise and fall of Hox gene clusters*. Development, 2007. 134(14): p. 2549-60.
87. Gehring, W.J., U. Kloter, and H. Suga, *Evolution of the Hox gene complex from an evolutionary ground state*. Curr Top Dev Biol, 2009. 88: p. 35-61.
88. Lonai, P., et al., *New murine homeoboxes: structure, chromosomal assignment, and differential expression in adult erythropoiesis*. DNA, 1987. 6(5): p. 409-18.
89. Kongsuwan, K., et al., *Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian haemopoietic lineages*. EMBO J, 1988. 7(7): p. 2131-8.
90. Greer, J.M., et al., *Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution*. Nature, 2000. 403(6770): p. 661-5.
91. Krumlauf, R., *Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes*. Bioessays, 1992. 14(4): p. 245-52.
92. Zakany, J., et al., *Functional equivalence and rescue among group II hox gene products in vertebral patterning*. Developmental Biology, 1996. 176(2): p. 325-328.
93. Chang, C.P., et al., *Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus*. Molecular and Cellular Biology, 1996. 16(4): p. 1734-1745.
94. Shen, W.F., et al., *AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins*. Mol Cell Biol, 1997. 17(11): p. 6448-58.
95. Shen, W.F., et al., *The Abd-B-like Hox homeodomain proteins can be subdivided by the ability to form complexes with Pbx1a on a novel DNA target*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(13): p. 8198-8206.

96. Shanmugam, K., et al., *PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins*. *Molecular and Cellular Biology*, 1999. 19(11): p. 7577-7588.
97. Chang, C.P., et al., *Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins*. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(10): p. 5679-87.
98. Sauvageau, G., et al., *Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(25): p. 12223-7.
99. Pineault, N., et al., *Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny*. *Exp Hematol*, 2002. 30(1): p. 49-57.
100. Argiropoulos, B. and R.K. Humphries, *Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis*. *Oncogene*, 2007. 26(47): p. 6766-6776.
101. Thorsteinsdottir, U., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, *Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis*. *Hematology-Oncology Clinics of North America*, 1997. 11(6): p. 1221-+.
102. Kawagoe, H., et al., *Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells*. *Leukemia*, 1999. 13(5): p. 687-98.
103. Golub, T.R., et al., *Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring*. *Science*, 1999. 286(5439): p. 531-7.
104. Imamura, T., et al., *Frequent co-expression of HoxA9 and Meis1 genes in infant acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangement*. *Br J Haematol*, 2002. 119(1): p. 119-21.
105. Soulier, J., et al., *HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL)*. *Blood*, 2005. 106(1): p. 274-86.

106. Kroon, E., et al., *Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b*. EMBO J, 1998. 17(13): p. 3714-25.
107. Thorsteinsdottir, U., et al., *Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia*. Mol Cell Biol, 2001. 21(1): p. 224-34.
108. Perkins, A.C. and S. Cory, *Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene*. EMBO J, 1993. 12(10): p. 3835-46.
109. Bach, C., et al., *Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes*. Blood, 2010. 115(14): p. 2910-8.
110. Ferrando, A.A., et al., *Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation*. Blood, 2003. 102(1): p. 262-268.
111. Dik, W.A., et al., *CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMII oncogenes*. Leukemia, 2005. 19(11): p. 1948-57.
112. Armstrong, S.A. and A.T. Look, *Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 2005. 23(26): p. 6306-15.
113. Thorsteinsdottir, U., et al., *The oncoprotein E2A-Pbx1a collaborates with Hoxa9 to acutely transform primary bone marrow cells*. Mol Cell Biol, 1999. 19(9): p. 6355-66.
114. Bijl, J., et al., *Evidence for Hox and E2A-PBX1 collaboration in mouse T-cell leukemia*. Oncogene, 2008. 27(49): p. 6356-64.
115. Bijl, J., et al., *High incidence of proviral integrations in the Hoxa locus in a new model of E2a-PBX1-induced B-cell leukemia*. Genes Dev, 2005. 19(2): p. 224-33.
116. van Lohuizen, M., et al., *Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging*. Cell, 1991. 65(5): p. 737-52.

117. Thompson, A., et al., *Global down-regulation of HOX gene expression in PML-RARalpha + acute promyelocytic leukemia identified by small-array real-time PCR*. Blood, 2003. 101(4): p. 1558-65.
118. Markowitz, D., et al., *Retroviral Gene-Transfer Using Safe and Efficient Packaging Cell-Lines*. Sixth Cooleys Anemia Symposium, 1990. 612: p. 407-414.
119. Lebert-Ghali, C.E., et al., *HoxA cluster is haploinsufficient for activity of hematopoietic stem and progenitor cells*. Experimental Hematology, 2010. 38(11): p. 1074-1086.
120. Humphries, R.K., A.C. Eaves, and C.J. Eaves, *Self-Renewal of Hematopoietic Stem-Cells during Mixed Colony Formation In vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1981. 78(6): p. 3629-3633.
121. Speleman, F., et al., *A new recurrent inversion, inv(7)(p15q34), leads to transcriptional activation of HOXA10 and HOXA11 in a subset of T-cell acute lymphoblastic leukemias*. Leukemia, 2005. 19(3): p. 358-366.
122. Gwin, K., et al., *Hoxa9 regulates Flt3 in lymphohematopoietic progenitors*. J Immunol, 2010. 185(11): p. 6572-83.
123. Huang, Y., et al., *Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells*. Blood, 2012. 119(2): p. 388-98.
124. Dankel, S.N., et al., *Switch from stress response to homeobox transcription factors in adipose tissue after profound fat loss*. PLoS One, 2010. 5(6): p. e11033.
125. Dennis, G., Jr., et al., *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. Genome Biol, 2003. 4(5): p. P3.
126. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nature Protocols, 2009. 4(1): p. 44-57.

127. Yoon, H.S., et al., *ZBTB32 Is an Early Repressor of the CIITA and MHC Class II Gene Expression during B Cell Differentiation to Plasma Cells*. Journal of Immunology, 2012. 189(5): p. 2393-2403.
128. Armstrong, S.A., et al., *MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia*. Nat Genet, 2002. 30(1): p. 41-7.
129. Yeoh, E.J., et al., *Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling*. Cancer Cell, 2002. 1(2): p. 133-143.
130. Lebert-Ghali, C.E., et al., *Sensitivity of Hematopoietic and Leukemic Stem Cells to Hoxa Gene Levels*. 2012. Stem Cells and Cancer Stem Cells , 2012. Volume 4, pp 19-29.
131. Lawrence, H.J., et al., *Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis*. Blood, 1997. 89(6): p. 1922-30.
132. Thorsteinsdottir, U., et al., *Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion*. Blood, 2002. 99(1): p. 121-9.
133. Zhang, X.B., et al., *High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector*. J Clin Invest, 2008. 118(4): p. 1502-10.
134. Pineault, N., et al., *Differential and common leukemogenic potentials of multiple NUP98-Hox fusion proteins alone or with Meis1*. Mol Cell Biol, 2004. 24(5): p. 1907-17.
135. Ross, M.E., et al., *Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling*. Blood, 2003. 102(8): p. 2951-9.
136. Mazieres, J., et al., *Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis*. Oncogene, 2005. 24(34): p. 5396-400.

137. Staal, F.J. and H.C. Clevers, *WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(1): p. 21-30.
138. Reya, T., et al., *Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism*. Immunity, 2000. 13(1): p. 15-24.
139. Smith, K.S., et al., *Bmi-1 regulation of INK4A-ARF is a downstream requirement for transformation of hematopoietic progenitors by E2a-Pbx1*. Molecular Cell, 2003. 12(2): p. 393-400.
140. Park, I.K., et al., *Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. 423(6937): p. 302-305.
141. Lessard, J. and G. Sauvageau, *Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells*. Nature, 2003. 423(6937): p. 255-260.
142. Alkema, M.J., et al., *Perturbation of B and T cell development and predisposition to lymphomagenesis in Emu Bmi1 transgenic mice require the Bmi1 RING finger*. Oncogene, 1997. 15(8): p. 899-910.
143. Wang, G.G., M.P. Pasillas, and M.P. Kamps, *Persistent transactivation by meis1 replaces hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of meis1-pbx and hox-pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes*. Mol Cell Biol, 2006. 26(10): p. 3902-16.
144. Stirewalt, D.L. and J.P. Radich, *The role of FLT3 in haematopoietic malignancies*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(9): p. 650-65.
145. Rosnet, O., et al., *Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells*. Leukemia, 1996. 10(2): p. 238-248.
146. Carow, C.E., et al., *Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias*. Blood, 1996. 87(3): p. 1089-96.
147. Naoe, T. and H. Kiyoi, *Normal and oncogenic FLT3*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(23): p. 2932-8.
148. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia*. Blood, 2002. 100(5): p. 1532-42.

149. Ozeki, K., et al., *Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia*. Blood, 2004. 103(5): p. 1901-8.
150. Bruserud, O., et al., *Flt3-mediated signaling in human acute myelogenous leukemia (AML) blasts: a functional characterization of Flt3-ligand effects in AML cell populations with and without genetic Flt3 abnormalities*. Haematologica, 2003. 88(4): p. 416-28.
151. Zheng, R., et al., *FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells*. Blood, 2004. 103(1): p. 267-74.
152. Wang, Z., et al., *PDGF-D signaling: a novel target in cancer therapy*. Curr Drug Targets, 2009. 10(1): p. 38-41.
153. Ustach, C.V., et al., *A potential oncogenic activity of platelet-derived growth factor d in prostate cancer progression*. Cancer Res, 2004. 64(5): p. 1722-9.
154. Wang, Z., et al., *Down-regulation of platelet-derived growth factor-D inhibits cell growth and angiogenesis through inactivation of Notch-1 and nuclear factor-kappaB signaling*. Cancer Res, 2007. 67(23): p. 11377-85.
155. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
156. Chan, A.C., et al., *Zap-70 - a 70 Kd Protein-Tyrosine Kinase That Associates with the Tcr Zeta-Chain*. Cell, 1992. 71(4): p. 649-662.
157. Schweighoffer, E., et al., *Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion*. Immunity, 2003. 18(4): p. 523-533.
158. Kil, L.P., et al., *The Role of B Cell Receptor Stimulation in CLL Pathogenesis*. Current Pharmaceutical Design, 2012. 18(23): p. 3335-3355.
159. Gomez-Martin, D., et al., *Early growth response transcription factors and the modulation of immune response: implications towards autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2010. 9(6): p. 454-8.

160. Sakamoto, K.M. and D.A. Frank, *CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2009. 15(8): p. 2583-7.
161. Silverman, E.S., et al., *cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1)*. Biochem J, 1998. 336 (Pt 1): p. 183-9.
162. Deneault, E., et al., *A functional screen to identify novel effectors of hematopoietic stem cell activity*. Cell, 2009. 137(2): p. 369-79.
163. Auvray, C., et al., *HOXC4 homeoprotein efficiently expands human hematopoietic stem cells and triggers similar molecular alterations as HOXB4*. Haematologica, 2012. 97(2): p. 168-78.
164. So, C.W., et al., *Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by MLL-GAS7 in the absence of Hoxa7 or Hoxa9*. Blood, 2004. 103(8): p. 3192-9.
165. Choe, S.K., et al., *Meis cofactors control HDAC and CBP accessibility at Hox-regulated promoters during zebrafish embryogenesis*. Dev Cell, 2009. 17(4): p. 561-7.