

Université de Montréal

**Rôle du facteur de transcription Gfi1b au cours de  
l'hématopoïèse précoce**

par

Damien Grapton

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise en microbiologie et immunologie

Décembre 2015

© Damien Grapton, 2015

## Résumé

Le facteur de transcription *Growth factor independent 1b* (GFI1b) est impliqué à différents stades dans la régulation de l'hématopoïèse. Il est notamment fortement exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques et au cours de la différenciation des cellules des lignées érythroïdes et mégacaryocytaires. Grâce à un modèle de délétion conditionnelle chez la souris par le système CreLox, nous avons montré que l'absence de GFI1b entraîne une prolifération de cellules mégacaryocytaires incapables de produire des plaquettes. Notre étude ne permet pas de confirmer formellement la prolifération des cellules souches dans la moelle osseuse précédemment observée par notre équipe dans un autre modèle murin. En revanche, les souris GFI1b "*knockout*" présentent une augmentation des cellules souches circulantes dans le sang périphérique. Une analyse moléculaire préliminaire montre que GFI1b pourrait influencer sur la régulation par le cycle circadien de la mobilisation de ces cellules dans le sang. Finalement, notre étude des effets biologiques de la délétion de GFI1b dans le compartiment hématopoïétique des souris adultes nous a permis de définir de façon plus précise le rôle de GFI1b dans l'hématopoïèse et de confirmer son rôle majeur dans la régulation de la mégacaryopoïèse et la production de plaquettes matures.

**Mots-clés :** Hématopoïèse, Gfi1b, Facteur de transcription, mégacaryopoïèse

## **Abstract**

Growth factor independent 1b (GFI1b) is a transcription factor implicated in the regulation of hematopoiesis. It is highly expressed in hematopoietic stem cells (HSCs) and throughout the differentiation of erythroid and megakaryocytic lineages. Using a CreLox system, we have generated mice in which GFI1b is conditionally deleted in megakaryocytic lineages. These mice exhibit a strong proliferation of immature megakaryocytes, which are unable to produce platelets. We were unable to confirm the results of a previously published study from our group, which reported an increase of hematopoietic stem cells in the bone marrow using a different mouse model. However, in agreement with this publication, an increase in the circulating HSC pool can be detected in our GFI1b knockout mice. A preliminary analysis of the molecular role of GFI1b suggests that this transcription factor might be implicated in the circadian regulation of HSC mobilization in the blood. Finally, our experiments on the biological effects of the deletion of GFI1b in the adult murine hematopoietic compartment allowed us to better understand the role of GFI1b in hematopoiesis, and to confirm the major contribution of GFI1b to the development of megakaryocytes and the production of mature platelets.

**Keywords** : Hematopoiesis, Gfi1b, Transcription factor, megacaryopoiesis

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des sigles</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>viii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>x</b>
<b>Introduction et objectifs de l'étude</b> .....	<b>1</b>
<b>L'hématopoïèse</b> .....	<b>2</b>
Techniques d'études de l'hématopoïèse .....	4
Le cellules souches hématopoïétiques .....	7
La mégacaryopoïèse adulte et les mégacaryocytes .....	9
Régulation de l'hématopoïèse .....	12
<b>Growth Factor Independent 1b (GFI1b)</b> .....	<b>14</b>
Structure moléculaire de la famille GFI1 (Figure 5) .....	14
Mécanismes d'action de GFI1b .....	17
Régulation de l'expression de GFI1b .....	19
<b>Objectifs de l'étude</b> .....	<b>21</b>
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>22</b>
<b>Souris</b> .....	<b>22</b>
<b>Délétion conditionnelle de GFI1b par le système RosaCre</b> .....	<b>22</b>
<b>Cytométrie en flux</b> .....	<b>22</b>
Procédure générale .....	22
Analyse des plaquettes par cytométrie en flux .....	23
Purification des cellules souches, mégacaryocytes et progéniteurs .....	23
<b>Tests clonogéniques en méthylcellulose</b> .....	<b>23</b>
<b>Tests clonogéniques en milieu collagène</b> .....	<b>24</b>
<b>Transplantations</b> .....	<b>24</b>

<b>Génotypage par PCR.....</b>	<b>24</b>
<b>Analyses statistiques .....</b>	<b>24</b>
<b>Analyses bioinformatiques.....</b>	<b>25</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>26</b>
<b>L'hématopoïèse médullaire chez la souris GFI1b « Knockout ».....</b>	<b>26</b>
Expansion des CSH.....	28
Caractérisation des CSH en expansion dans les souris KO .....	31
Analyse de la lignée mégacaryocytaire dans les souris KO .....	33
Stratégie d'analyse par cytométrie en flux des souris KO pour GFI1b .....	35
Transplantations de la populations CD9 CD41 double positive.....	38
Essais clonogéniques en milieu collagène .....	46
<b>Études des CSH sanguines chez la souris GFI1b KO.....</b>	<b>48</b>
Transplantations des progéniteurs sanguins .....	51
Régulation de la mobilisation des CSH et Mk par Gfi1b.....	57
<b>Discussion &amp; Perspectives .....</b>	<b>61</b>
<b>Expansion médullaire des CSH et progéniteurs mégacaryocytaires après la délétion conditionnelle de GFI1b.....</b>	<b>61</b>
Résultats précédents et marquage « classique » des CSH .....	61
Lignée érythroïde et globules rouges.....	62
Nouvelle stratégie de sélection des CSH par cytométrie en flux.....	63
Autre définition des CSH par cytométrie en flux.....	64
<b>Transplantations des cellules GFI1b KO .....</b>	<b>66</b>
Variation d'expression du CD45.2 .....	66
Cellules souches sanguines.....	66
Reproduction du phénotype GFI1b KO par transplantation.....	66
<b>Mobilisations des cellules Gfi1b KO dans le sang périphérique .....</b>	<b>68</b>
Présence de CSH GFI1b KO dans le sang périphérique .....	68
Régulation par GFI1b de la mobilisation des CSH et progéniteurs .....	68
<b>Conclusion .....</b>	<b>70</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>i</b>

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : COMPARAISON DES PARAMÈTRES DES MÉGACARYOCYTES ET DES PLAQUETTES ENTRE LA SOURIS ET L'HUMAIN.....	10
TABLEAU 2 : TABLE DES ANTICORPS ET FLUOROCHROMES UTILISÉS.....	23

# Liste des figures

FIGURE 1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'HÉMATOPOÏÈSE MURINE ADULTE.....	3
FIGURE 2 : COLONIES DE PROGÉNITEURS HÉMATOPOÏÉTIQUES DE SOURIS .....	5
FIGURE 3 : ESSAIS DE RECONSTITUTION HÉMATOPOÏÉTIQUE <i>IN VIVO</i> .....	6
FIGURE 4 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA MÉGACARYOPOÏÈSE MURINE ADULTE. ....	11
FIGURE 5 : STRUCTURES MOLÉCULAIRES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION GFI1 ET GFI1B .....	16
FIGURE 6 : DÉLÉTION CONDITIONNELLE DE GFI1B PAR LE TAMOXIFÈNE.....	27
FIGURE 7 : EFFET DE LA DÉLÉTION CONDITIONNELLE DE GFI1B DANS LES CELLULES SOUCHES ET PROGÉNITEURS HÉMATOPOÏÉTIQUES.....	28
FIGURE 8 : COMPARAISON ENTRE LES LIGNÉES ÉRYTHROÏDES ET MÉGACARYOCYTAIRES .....	30
FIGURE 9 : EFFET DE LA DÉLÉTION CONDITIONNELLE DE GFI1B SUR L'EXPRESSION DES MARQUEURS MÉGACARYOCYTAIRES CD9 ET CD41 À LA SURFACE DES CSH ET PROGÉNITEURS .....	32
FIGURE 10 : EFFET DE LA DÉLÉTION CONDITIONNELLE DE GFI1B SUR LES MÉGACARYOCYTES.....	34
FIGURE 11 : ANALYSE DU COMPARTIMENT LSK EXCLUANT LES CELLULES DOUBLE POSITIVES CD9+ ET CD41+ .....	37
FIGURE 12 : SÉLECTION PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DES CELLULES LIGNAGE <sup>F</sup> - CD41+ CD9+ .....	40
FIGURE 13 : ANALYSE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DES PLAQUETTES SANGUINES DES SOURIS RECEVEUSES CD45.1.....	42
FIGURE 14 : ANALYSE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DES PLAQUETTES SANGUINES DES SOURIS RECEVEUSES CD45.1.....	44
FIGURE 15 : ANALYSE DE LA MOELLE OSSEUSE DES SOURIS RECEVEUSES CD45.1 PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX .....	45
FIGURE 16 : ESSAIS CLONOGÉNIQUES EN MILIEU COLLAGÈNE.....	47
FIGURE 17 : EFFET DE LA DÉLÉTION CONDITIONNELLE DE GFI1B SUR LES CELLULES SOUCHES ET PROGÉNITEURS HÉMATOPOÏÉTIQUES DANS LE SANG PÉRIPHÉRIQUE.....	50
FIGURE 18 : TRANSPLANTATION DE CELLULES SANGUINES.....	51
FIGURE 19 : ANALYSE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX DES PLAQUETTES SANGUINES DES SOURIS RECEVEUSES CD45.1.....	53
FIGURE 20 : ANALYSE DES CSH CHEZ LES SOURIS RECEVEUSES CD45.1.....	54
FIGURE 21 : ANALYSE DES PROGÉNITEURS MÉGACARYOCYTAIRES CHEZ LES SOURIS RECEVEUSES CD45.1.....	55
FIGURE 22 : ANALYSE DES LYMPHOCYTES B MATURES CHEZ LES SOURIS RECEVEUSES CD45.1 .....	56
FIGURE 23 : CHIP-SEQ DE LA LIAISON DE GFI1B DANS LES CELLULES HPC7.....	59
FIGURE 24 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GÈNES DU CYCLE CIRCADIEN DANS LES CSH ET MK.....	60
FIGURE 25 : COMPARAISON ENTRE LES LIGNÉES ÉRYTHROÏDES ET MÉGACARYOCYTAIRES.....	67

## Liste des sigles

CSH : cellules souches hématopoïétiques

Gfi1 : Growth Factor Independant 1

Gfi1b : Growth Factor Independant 1b

KO : *Knockout*

MO : moelle osseuse

PM1 : Progéniteurs multipotents 1

PM2 : Progéniteurs multipotents 2



## **Liste des abréviations**

kg : kilogramme(s)

l : litre(s)

mg : milligramme(s)

min : minute(s)

rpm : rotations par minute

*[...] Nous partagerons les périls en frères ; et trois ans de galère de plus, ou de moins, ne sont pas pour arrêter un noble cœur.*

Molière, *Les Fourberies de Scapin* - Acte I, Scène V

## Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche Tarik Möröy pour m'avoir accueilli dans son équipe.

Merci au Dr. Hugo Souydens et au Dr. Eric Milot pour avoir accepté d'être membre de mon jury de maîtrise, ainsi que pour leurs corrections et remarques pertinentes.

Merci également à tous les membres présents et passés de l'unité de recherche en hématopoïèse et cancer que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant ces années passées à l'institut de recherches cliniques de Montréal ; Joe, Riyan, Lothar, Hugues, Marissa, Mathieu, Anne, Julie, Charles, Peiman et Jennifer.

Parmi eux, je remercie particulièrement le Grand Suprême Archi-Commandeur Hautement Intergalactique sans qui ce travail n'existerait pas. Merci pour vos conseils avisés ô mon maître. Il est maintenant temps pour moi de suivre ma propre voie aussi obscure soit-elle.

Merci à Jennifer pour les relectures et corrections attentionnées apportées à ce manuscrit. Merci également d'avoir été à mes côtés toutes ces années pour me communiquer ton optimisme et balayer d'un sourire ou d'un éclat de rire tous les moments difficiles.

Un merci particulier à Marissa également pour ses leçons d'anglais et ses corrections appliquées. How do you say tattoo in english?

Je remercie également toute l'équipe du Dr. Di Noia et en particulier Steve et Ludi pour leur voisinage sympathique aussi bien au labo qu'à la ville !

Merci à Marie et Mél de s'être levé tôt pour partager de nombreux cafés à la PTC et divaguer de bon matin avec Simon et moi.

Enfin, merci à Jo-Anny, Mélanie, Marie-Claude, Caroline, Julie, Éric, Dominic ainsi que tous les membres des plateaux techniques de l'IRCM pour leur aide, leur sympathie et surtout leur contribution essentielle à la réalisation de ce travail.

## Introduction et objectifs de l'étude

L'hématopoïèse est un processus physiologique finement régulé, qui permet la production et le remplacement de toutes les cellules sanguines et immunitaires de l'organisme au cours de la vie.

Chez les mammifères, le système sanguin contient différents types cellulaires appelés « lignées ». Chaque lignée possède des caractéristiques morphologiques et métaboliques qui lui sont propres afin de remplir des fonctions spécifiques et essentielles à la survie de l'organisme. On peut distinguer 4 grandes lignées hématopoïétiques : La lignée myéloïde, lymphoïde, érythroïde et mégacaryocytaire. La lignée myéloïde est constituée des granulocytes et des cellules de type monocyte et macrophage, la lignée lymphoïde comprend les lymphocytes T et B ainsi que les cellules *Natural Killer*, la lignée érythroïde est essentiellement composée des érythrocytes ou globules rouges et enfin la lignée mégacaryocytaire contient les mégacaryocytes, cellules qui sont à l'origine de la formation des plaquettes. Chacune de ces cellules, précurseurs et cellules matures, ont cependant une durée de vie limitée pouvant aller de quelques jours pour les plaquettes à des semaines voire des mois pour certains lymphocytes. Le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique dépend donc de la capacité de l'organisme à renouveler tout au long de la vie et de manière adaptée chacune des cellules matures circulantes. Pour cela, un contingent de cellules souches hématopoïétiques (CSH), dont sont originaires toutes ces lignées, est maintenu au cours de l'existence. Ces cellules sont dites multipotentes, c'est à dire qu'elles ont la capacité de proliférer et de se différencier pour produire l'ensemble des cellules sanguines tout au long de la vie. L'hématopoïèse est alors définie comme un système hiérarchique avec à son sommet la CSH capable de combler le besoin constant de renouvellement des cellules sanguines matures qui constituent la base de la pyramide (Figure 1). Entre les deux existent une cascade de progéniteurs et précurseurs de plus en plus déterminés vers une lignée unique. Ce processus est hautement contrôlé et nécessite 1) le maintien d'une petite population de cellules souches par auto-renouvellement et 2) la régulation de la cascade de différenciation cellulaire par l'action combinée de facteurs extrinsèques et intrinsèques.

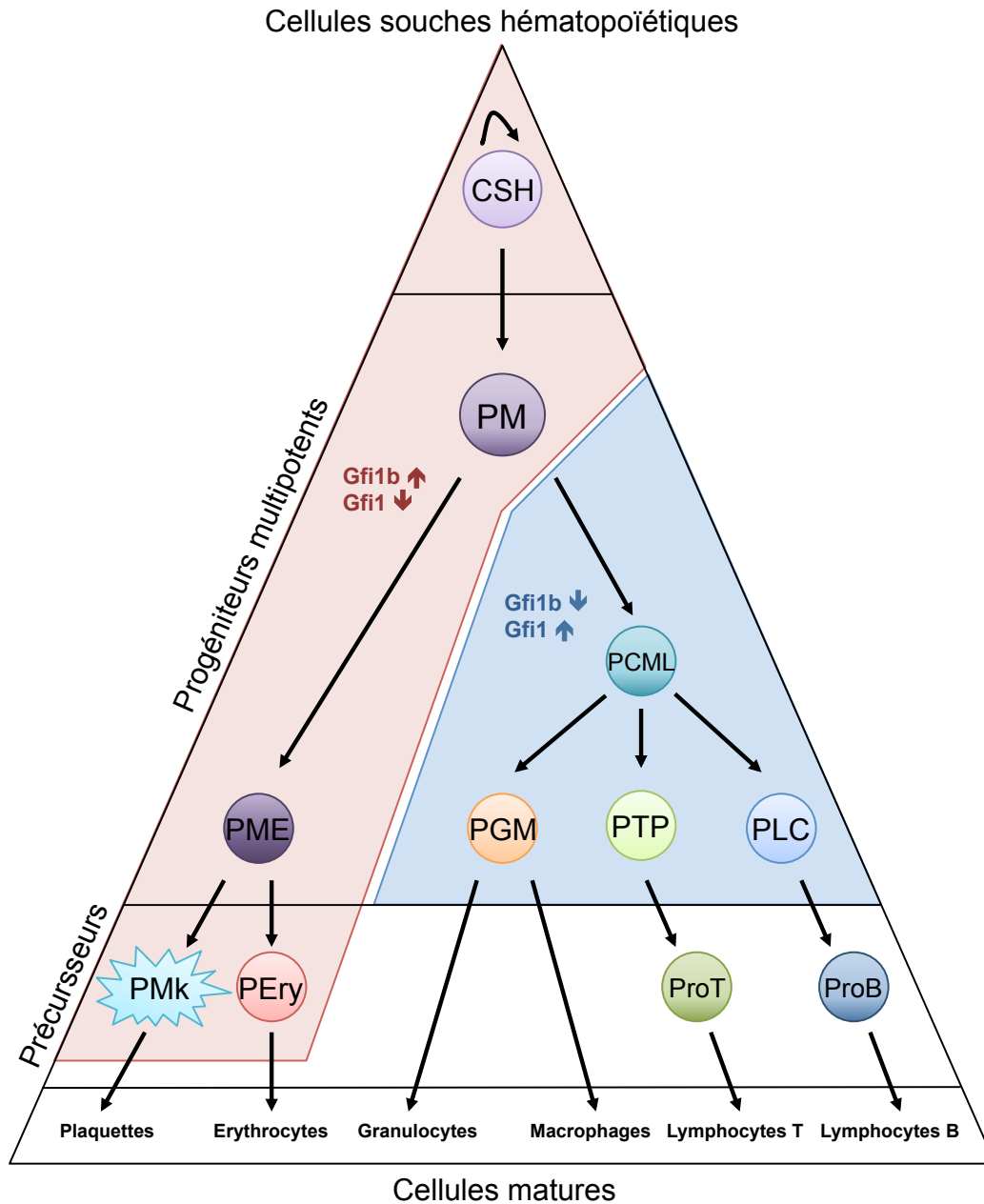
Parmi les éléments intrinsèques de régulation de l'hématopoïèse, les facteurs de transcription jouent un rôle prépondérant pour activer ou réprimer des gènes au cours de la différenciation hématopoïétique et ainsi « orienter » les cellules dans les différentes lignées sanguines. *Growth Factor Independent 1* (GFI1) et son paralogue GFI1b sont deux facteurs de transcription indispensables à différents stades de l'hématopoïèse.

## **L'hématopoïèse**

En conditions physiologiques, chez l'humain comme les autres mammifères, la moelle osseuse (MO) est le site majeur de l'hématopoïèse adulte. Les durées de vie de différents types de cellules sanguines matures vont de quelques heures à plusieurs années. Pour assurer leur renouvellement, on estime que, chez l'Homme, la moelle osseuse produit environ 500 milliards de cellules par jour (Fliedner et al., 2002). Étonnamment, l'ensemble de ces cellules produites est originaire d'un très petit nombre de CSH. Les CSH constituent en effet le sommet d'une pyramide de cellules progénitrices aux potentiels de différenciation de plus en plus restreints vers une seule lignée hématopoïétique (Rieger 2009) (Figure 1). Les données actuelles suggèrent que la hiérarchie des étapes de différenciations hématopoïétiques humaines et murines est proche (Majeti et al. 2007 Doulatov et al. 2010), permettant ainsi de comprendre le fonctionnement de l'hématopoïèse humaine grâce aux études réalisées chez le souris.

La première étape de cette cascade est la différenciation d'une cellule souche en un progéniteur multipotent (PM) qui conserve la capacité de générer l'ensemble des lignées du système sanguin, mais perd son potentiel de reconstitution à long terme après transplantation. Les PM donnent naissance aux progéniteurs communs myéloïde-lymphoïdes (PCML) à l'origine des lignées lymphocytaires B et T ainsi que des granulocytes, monocytes, cellules dendritiques et *Natural Killer* (NK). Les PM peuvent également se différencier en progéniteurs mégacaryo-érythrocytaires (PME) qui donneront les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires.

Ce modèle, différent du modèle classique établi et repose sur une dichotomie basée sur la fonction des cellules. On retrouve d'une part les cellules non immunitaires ou cellules érythroïdes (plaquettes et érythrocytes) et d'autre part les cellules de défense de l'organisme constituées majoritairement des lymphocytes, granulocytes et monocytes.



**Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse murine adulte**

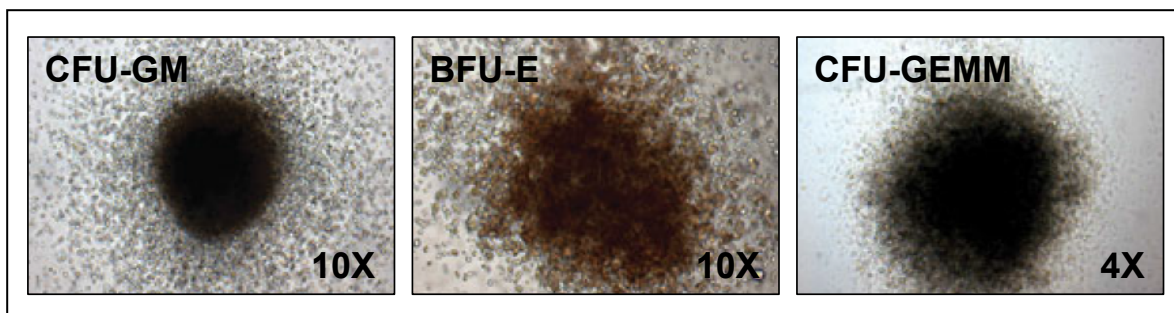
Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) perdent leur potentiel de reconstitution à long terme en se différenciant en progéniteurs multipotents (PM). Ceux-ci se différencient en progéniteurs communs myéloïde-lymphoïdes (PCML) ou progéniteurs mégacaryo-érythrocytaires (PME). Ces derniers donneront naissance aux précurseurs érythroïdes (PEry) et des mégacaryocytes (PMk). Les PCML sont eux à l'origine des progéniteurs T précoces (PTP), des progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) et des progéniteurs granulo-myéloïdes (PGM).

## Techniques d'études de l'hématopoïèse

Classiquement, l'étude de l'hématopoïèse et l'identification des progéniteurs hématopoïétiques peut se faire par des tests fonctionnels *in vitro*, ou bien par des tests de reconstitution hématopoïétique. A ces techniques peuvent s'ajouter l'identification morphologique des cellules par des techniques de coloration et d'observation au microscope. Cette dernière technique, efficace pour les cellules plus matures, ne permet cependant pas d'identifier finement les cellules les plus indifférenciées, comme les CSH et les PM. Elle tend maintenant à être remplacée par le séquençage haut débit, qui permet une meilleure discrimination des populations en fonction de « l'allumage » ou la mise en silence de certains gènes ou groupes de gènes.

### *Les tests in vitro*

Les essais clonogéniques sont les tests de référence pour l'identification et la classification des progéniteurs hématopoïétiques. Ces techniques de culture en milieu semi-solide permettent d'identifier et de classer les progéniteurs en fonction de leur capacité à proliférer et se différencier pour générer un certain nombre de lignées différentes. En effet, une fois mise en culture, le plus souvent en méthylcellulose supplémentée avec des facteurs de croissance, les cellules sont immobilisées par le milieu et chaque cellule progénitrice peut ainsi être à l'origine d'une seule colonie identifiable morphologiquement. L'aspect des colonies et son contenu en cellules sont en effet différents selon le type de progéniteur d'origine. Plus le progéniteur est mature et plus la colonie sera homogène. Par exemple, les colonies BFU-E, pour *Burst Forming Unit – Erythroid*, contiennent uniquement des petites cellules colorées en rouge, caractéristiques de la lignée des globules rouges (Figure 2). À l'inverse, une colonie issue d'un progéniteur plus précoce peut contenir des cellules à la morphologie distinctive de plusieurs lignées, comme par exemple, les colonies CFU-GEMM, pour *Colony Forming Unit – Granulocytes, Erythrocytes Macrophages Megacaryocytes*, colonie hétérogène, capable de donner naissance aux quatre grandes lignées sanguines (Figure 2).



**Figure 2 : Colonies de progéniteurs hématopoïétiques de souris**

Exemple de colonies formées sur méthylcellulose.

Il existe par ailleurs d'autres tests d'identification *in vitro* basés notamment sur des systèmes de cocultures des cellules hématopoïétiques avec des cellules stromales dites « de soutien ». L'utilisation de ces cellules stromales permet de mimer partiellement le microenvironnement médullaire, favorisant ainsi la croissance et la différenciation hématopoïétique, grâce à la production de facteurs de croissance hématopoïétiques, mais aussi par les interactions cellules stromales-cellules hématopoïétiques. Ces tests ne seront pas discutés dans ce mémoire.

#### *Les tests fonctionnels in vivo*

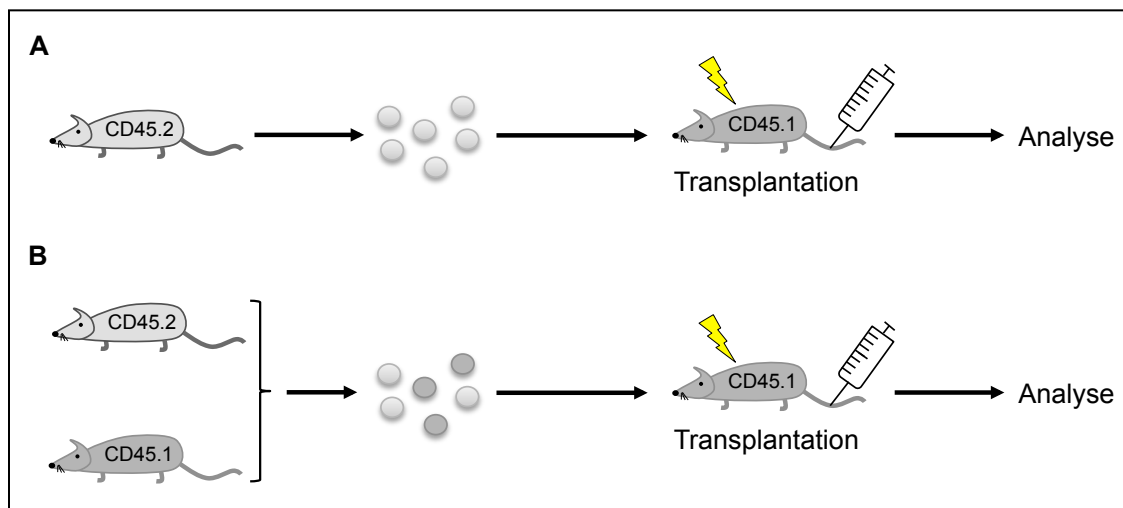
Malgré le développement des techniques *in vitro* de culture et co-culture à long terme des cellules hématopoïétiques, les tests de reconstitution hématopoïétique chez la souris demeurent les tests de référence pour étudier la capacité d'une population donnée à reconstituer l'ensemble du tissu sanguin à long terme et ainsi confirmer son potentiel souche.

On distingue deux types de tests de reconstitution, les essais compétitifs et non-compétitifs (Figure 3). Chacun de ces tests nécessite que les souris receveuses soient préalablement irradiées, afin d'induire l'aplasie médullaire nécessaire à la prise de greffe hématopoïétique. Lors des essais non-compétitifs on injecte, après irradiation, uniquement la population d'intérêt (Figure 3A). C'est un test purement qualitatif. En revanche, lors des essais compétitifs, on injecte conjointement un nombre connu des cellules d'intérêt mais également une autre population dite « compétitrice » (Figure 3B). Cela permet donc également de quantifier le nombre de cellules souches réellement présentes dans la population étudiée.



On peut alors suivre les souris receveuses dans le temps afin de déterminer la capacité de cette population à renouveler l'ensemble du tissu sanguin à long terme. Pour faciliter ce suivi, on utilise classiquement des souris CD45.1 et CD45.2. Ces lignées sont congéniques, mais possèdent deux allèles différents du gène CD45. Ce récepteur membranaire est un marqueur hématopoïétique pan-leucocytaire, c'est à dire qu'il est exprimé sur l'ensemble des cellules hématopoïétiques à l'exception des plaquettes et des érythrocytes matures, ainsi que des plasmocytes.

Les populations à tester sont classiquement issues d'une souris CD45.2 et sont injectées dans des souris receveuses CD45.1. Ceci permet de discriminer les différentes populations au moment de l'analyse.



**Figure 3 : Essais de reconstitution hématopoïétique *in vivo***

**A)** Essai non compétitif. Les cellules de moelle osseuse issues de souris CD45.2 sont transplantées dans des souris CD45.1 préalablement irradiées. **B)** Essai compétitif. Les cellules de moelle osseuse de souris CD45.2 sont transplantées dans des souris CD45.1 irradiées avec des cellules de moelle osseuse dites compétitrices de souris CD45.1 permettant un suivi des deux populations au cours du temps.

## **Le cellules souches hématopoïétiques**

Le terme de cellule souche a été inventé 1868 par le biologiste allemand Ernst Haeckel qui cherchait à définir un ancêtre commun unicellulaire à toutes les espèces connues et qu'il nommât *stammzelle* (Maehle, 2011; Ramalho-Santos and Willenbring, 2007). Plus tard, Haeckel reprend ce terme pour parler du zygote diploïde. Un autre embryologiste allemand, Theodor Boveri, émet par la suite, l'hypothèse que les cellules embryonnaires issues des divisions précoces du zygote et qui donnent les différents tissus de l'organisme, sont également des cellules souches mais avec un potentiel plus restreint (Baltzer, 1964; Maehle, 2011). Il est donc le premier à introduire les concepts de totipotence (capacité de donner toutes les cellules de l'organisme), pluripotence (capacité de produire les cellules de plusieurs tissus différents) et multipotence (capacité de générer toutes les cellules d'un même tissu). Peu après, Ernst Neumann et Artur Pappenheim parlent de cellules souches adultes, et non plus seulement embryonnaires, comme étant à l'origine de l'ensemble des cellules du système hématopoïétique (Maehle, 2011; Ramalho-Santos and Willenbring, 2007). Mais c'est seulement en 1961, au *Ontario Cancer Institut*, que Jim Till et Ernest McCullough prouvent expérimentalement l'existence de cellules souches hématopoïétiques (Till and Mc, 1961).

Actuellement, le terme de cellule souche désigne des cellules qui possèdent les capacités de 1) s'auto-renouveler c'est-à-dire de se reproduire à l'identique et 2) de se différencier en des cellules spécialisées de manière à former complètement un ou plusieurs tissus de l'organisme. Parmi les cellules souches, on trouve les CSH qui sont dites multipotentes puisqu'elles ont la capacité de produire l'ensemble des cellules du tissu sanguin. Elles ont également la faculté de maintenir cette production tout au long de la vie en s'auto-renouvelant.

La cytométrie en flux a permis une caractérisation des cellules souches chez la souris et l'humain. En effet, des marqueurs cellulaires propres aux cellules souches ont été identifiés au cours des dernières années tels que les protéines c-kit et sca1 exprimées à la surface des cellules souches et progéniteurs (Ikuta and Weissman, 1992; Oguro et al., 2013; Spangrude et al., 1988). De plus, les cellules souches sont par nature indifférenciées et n'expriment donc pas de nombreuses protéines qui seront présentes plus tardivement sur les cellules matures. Chez la souris, on retrouve parmi les marqueurs classiquement utilisés pour identifier les cellules

matures : Mac1 et Gr1, spécifiques des cellules myéloïdes, les récepteurs, CD3, CD4 et CD8, spécifiques des lignées T, les molécules B220 et CD19 exprimées par les lymphocytes B, les molécules Ter119 et CD61, exprimées respectivement par les cellules érythroïdes et mégacaryocytaires ou encore les marqueurs NK1.1, particulier aux NK, Flt3 (CD135), typique des progéniteurs précoces, et IL7ra, présent sur les progéniteurs lymphocytaires. Les cellules souches qui n'expriment pas ces marqueurs propres aux cellules matures sont dites « lignages négatives » ou  $\text{Lin}^-$ ,  $\text{Sca-1}^+$  et  $\text{c-Kit (CD117)}^+$ . Cependant, ces trois marqueurs ne suffisent pas à définir spécifiquement les cellules souches puisque la population de cellules dites  $\text{Lin}^-$ ,  $\text{Sca-1}^+$  et  $\text{c-Kit}^+$ , couramment appelées LSK, constitue une population qui en plus des cellules souches contient également les progéniteurs des différentes lignées cellulaires sanguines tels que les PM. C'est donc une population hétérogène de progéniteurs contenant une faible proportion de CSH. Afin d'augmenter cette proportion, il est possible de définir plus finement les cellules souches en subdivisant la population LSK en fonction des marqueurs de la famille SLAM : CD150 (Slamf1) et CD48 (Slamf2). Les CSH sont donc classiquement définies comme  $\text{LSK CD150}^+\text{CD48}^-$ . Il est également possible de purifier des CSH par cytométrie en flux en sélectionnant les populations  $\text{LSK CD34}^-$  (Osawa et al. 1996),  $\text{LSK Flt3}^-$  (Christensen and Weissman, 2001, Adolfsson et al. 2005 Yang et al. 2005), ou encore par leur capacité à exclure le marqueur Hoechst 33342 (Goodell et al. 1996) ou la Rhodamine-123 (Kim et al., 1998).

## **La mégacaryopoïèse adulte et les mégacaryocytes**

Les thrombocytes, aussi appelés plaquettes, sont de petites cellules anucléées et ayant une durée de vie relativement courte. Cette durée de vie est estimée entre 8 et 10 jours chez l'humain adulte et entre 4,5 et 5,5 jours chez la souris de souche C57/B6 (Tableau 1) (Thon and Italiano, 2010). Les plaquettes jouent cependant un rôle prépondérant dans l'hémostase en générale et dans la formation du « clou plaquettaire » en particulier. Ainsi le nombre de plaquettes dans la circulation doit être maintenu constant et nécessite un processus de production continu. Chez l'Homme, on estime par exemple que la production d'environ  $10^{11}$  plaquettes est quotidiennement nécessaire afin de maintenir un taux physiologique de 150 à  $400 \times 10^9$  plaquettes par litre de sang (Thon et al., 2012; Tsakiris et al., 1999). Ce processus de production est appelé thrombopoïèse ou également, mégacaryopoïèse. C'est une branche particulière de l'hématopoïèse correspondant à l'ensemble des mécanismes impliqués dans la différenciation et la maturation des CSH en progéniteurs mégacaryocytaires et mégacaryocytes (Figure 1). Ultiment, les plaquettes proviennent de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes matures.

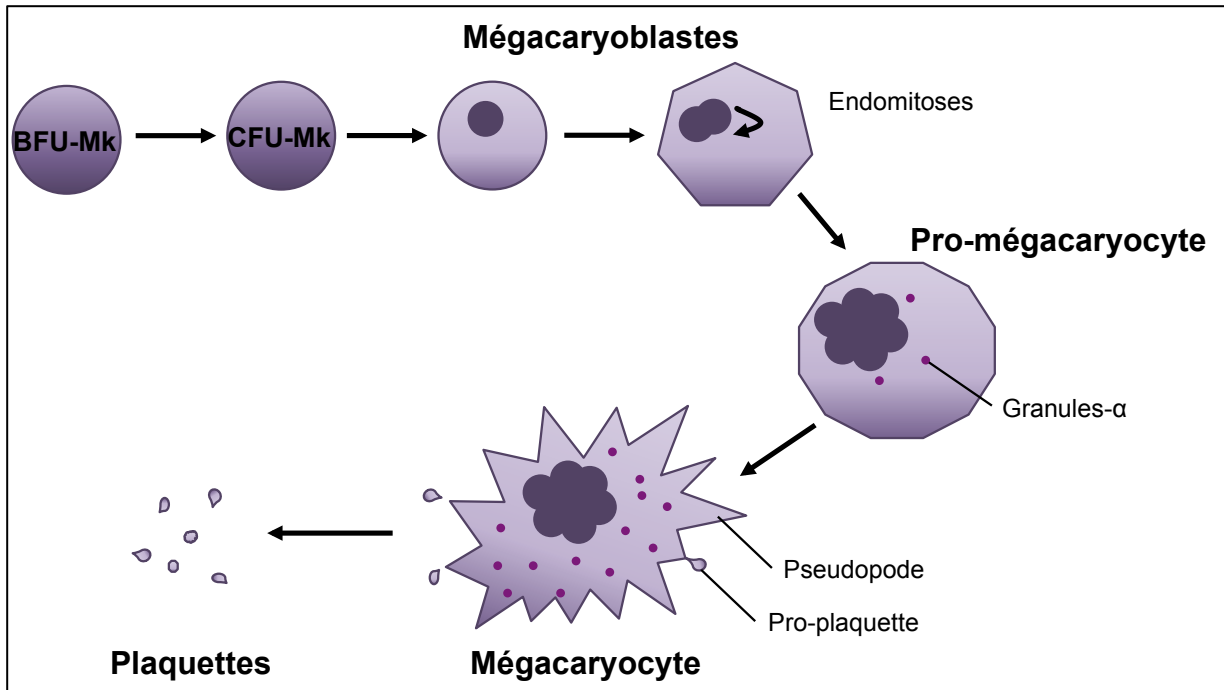
La mégacaryopoïèse débute par la différenciation d'une CSH en une série de progéniteurs multipotents puis en progéniteurs bipotents appelé : Progéniteurs Mégacaryo-Érythrocytaires (PME) avant de donner naissance aux mégacaryoblastes puis finalement aux mégacaryocytes (Figure 4). L'origine des PME est cependant encore discutée et est dépendante des techniques d'indentification utilisées. Il pourrait ainsi être originaire d'un progéniteur myéloïde commun aux trois lignées myéloïdes, érythroïdes et mégacaryocytaires ou bien résulter directement des CSH.

Les mégacaryocytes sont des cellules géantes, polyploïdes qui représentent environ ~0.01% des cellules nucléés de la moelle osseuse (Machlus and Italiano, 2013). Le processus de maturation des mégacaryocytes nécessite une succession d'endomitoses, qui entraînent une augmentation du noyau sans division cellulaire.

	Homme	Souris
<b>Mégacaryocytes (Mk)</b>		
Développement dans la moelle osseuse	14 jours	3 - 4 jours
Diamètre (µm)	30 - 60	20 - 30
Densité dans la moelle osseuse (Mk/mm <sup>2</sup> )	9 ± 2	20
<b>Plaquettes (Plts)</b>		
Valeurs sanguines (x10 <sup>9</sup> Plts/l de sang)	150 - 400	1000 - 1500
Diamètre (µm)	2.25	1.50
Volume (fl)	7.5 - 10	4 - 5

Tableau 1 : Comparaison des paramètres des mégacaryocytes et des plaquettes entre la souris et l'humain

Adapté de (Thon and Italiano, 2010)



**Figure 4 : Représentation schématique de la mégacaryopoïèse murine adulte.**

Après différenciation des PGM en progéniteurs pleinement engagés dans la voie mégacaryocytaire, ces progéniteurs vont se différencier en mégacaryocytes matures qui donneront naissance aux plaquettes après fragmentation des pseudopodes en pro plaquettes.

## Régulation de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse nécessite une régulation fine afin de permettre une production constante des différentes cellules sanguines aux cours de la vie de l'individu, mais également une réponse rapide et adaptée aux événements extérieurs (saignements, infections, etc..). L'homéostasie des cellules hématopoïétiques est ainsi maintenue par une dynamique d'expression et de mises en silence de gènes au cours de la différenciation. L'action conjuguée de mécanismes extrinsèques et intrinsèques permet ainsi l'activation de voies de signalisation qui régulent la survie, l'expansion et la maturation des progéniteurs et précurseurs.

### *Mécanismes extrinsèques*

Les mécanismes extrinsèques de régulation reposent principalement sur les interactions des CSH et progéniteurs avec le microenvironnement médullaire au sein de la niche hématopoïétique. Cette dernière joue un rôle clef dans le maintien de la quiescence, l'auto-renouvellement, mais également la différenciation et la prolifération des cellules souches (Arai et al., 2005; Calvi, 2006; Li and Xie, 2005). Elle est composée d'une matrice extracellulaire et de divers types cellulaires : des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales et des ostéoblastes (Morrison and Scadden, 2014).

Par exemple, il a été montré que les CSH et progéniteurs établissent des interactions avec la niche *via* des molécules d'adhésion spécifiques, comme les intégrines ou les cadhérines. Ces interactions sont un processus continu dynamique pouvant réguler la mobilisation des cellules souches dans la circulation sanguine qui peuvent par la suite revenir dans la moelle osseuse (Bhattacharya et al., 2009; Potocnik et al., 2000; Wright et al., 2001). De manière intéressante, il a également été montré que ce processus suit un rythme circadien (Lasky et al., 1983; Mendez-Ferrer et al., 2008).

De l'ensemble des interactions cellules-cellules ou cellules-matrice dans la niche, résulte la sécrétion de facteurs solubles tels que des facteurs de croissance ou des cytokines ou bien, l'activation directe de voies de signalisation par les molécules d'adhérence. Parmi les facteurs de croissance, l'érythropoïétine (EPO), sécrétée par le cortex rénal, a été le premier facteur de croissance hématopoïétique soluble suspecté, puis identifié, comme régulant la production des érythrocytes (Lin et al., 1985). Par la suite, de nombreux facteurs de croissance ou cytokines ont été identifiés comme régulant de façon spécifique les différents processus et

mécanismes se déroulant dans la moelle osseuse. Par exemple, en 1988, l'IL7 fut identifié comme une cytokine indispensable à la survie des progéniteurs des cellules B et plus tard des cellules T (Namen et al., 1988a; Namen et al., 1988b; Peschon et al., 1994). Peu après, la thrombopoïétine a été identifiée comme le facteur principal de la régulation des mégacaryocytes (Bartley et al., 1994; de Sauvage et al., 1994; Lok et al., 1994).

Finalement, les facteurs environnementaux peuvent agir sur la régulation de l'homéostasie du système hématopoïétique, notamment en régulant la production de facteur de croissance. Ainsi, une diminution de la concentration d'oxygène peut entraîner une augmentation de la production d'EPO par les cellules du cortex rénal et donc stimuler la production des érythrocytes. De même, l'inflammation lors d'une infection, peut orienter les cellules souches vers les mégacaryocytes et ainsi augmenter la production de plaquettes afin de palier à une thrombopénie d'origine infectieuse (Haas et al., 2015).

#### *Mécanismes intrinsèques*

Les mécanismes intrinsèques régulant l'hématopoïèse impliquent principalement des protéines appelées facteurs de transcription qui vont réguler l'activation ou la répression de certains gènes afin de permettre l'expression de protéines propres à chaque lignée hématopoïétique.

Les facteurs de transcription, *via* un domaine de liaison à l'ADN, se fixent aux régions régulatrices de leurs gènes cibles et ainsi modulent positivement ou négativement leur transcription. Les domaines de liaison à l'ADN peuvent être de divers types, tels que les domaines, leucine *zipper*, hélice-boucle-hélice, hélice-tour-hélice et doigt de zinc. Les facteurs de transcription comportent également un domaine de trans-activation et/ou de répression qui recrute des co-facteurs ou qui interagit directement avec la machinerie transcriptionnelle pour réguler la transcription. Parmi les facteurs de transcription nécessaires au bon déroulement de l'hématopoïèse, Gfi1 et Gfi1b ont été identifiés comme régulant des étapes spécifiques de ce processus.



## **Growth Factor Independent 1b (GFI1b)**

*Growth Factor Independent 1* (GFI1) est un facteur de transcription initialement découvert en 1993, comme étant un proto-oncogène activé par l'insertion du virus Moloney de la leucémie murine (Gilks et al., 1993; Monteferrario et al., 2014). Son paralogue, GFI1b a ensuite été identifié par homologie de séquence (Rodel et al., 1998; Tong et al., 1998). Les deux protéines répriment l'expression de leurs gènes cibles en recrutant notamment des protéines modificatrices d'histones comme LSD1. De nombreuses études ont démontré leurs implications dans l'hématopoïèse normale et pathologiques mais ces protéines sont également exprimées dans l'intestin ou le cerveau pour GFI1, ainsi que l'intestin et les testicules pour GFI1b. De plus, GFI1 et GFI1b sont exprimés de manière mutuellement exclusive et parfois complémentaire au sein de nombreux tissus et en particulier les différentes lignées du système hématopoïétique. Enfin, ces deux facteurs de transcription sont impliqués dans le développement de nombreuses pathologies hématologiques telles que la leucémie aigue myéloblastique (LAM) (Moroy et al., 2015) ou le syndrome des plaquettes grises (Monteferrario et al., 2014). Ainsi, le contrôle de l'expression et le maintien de l'intégrité structurelle de ces deux facteurs de transcription sont essentiels au développement hématopoïétique.

### **Structure moléculaire de la famille GFI1 (Figure 5)**

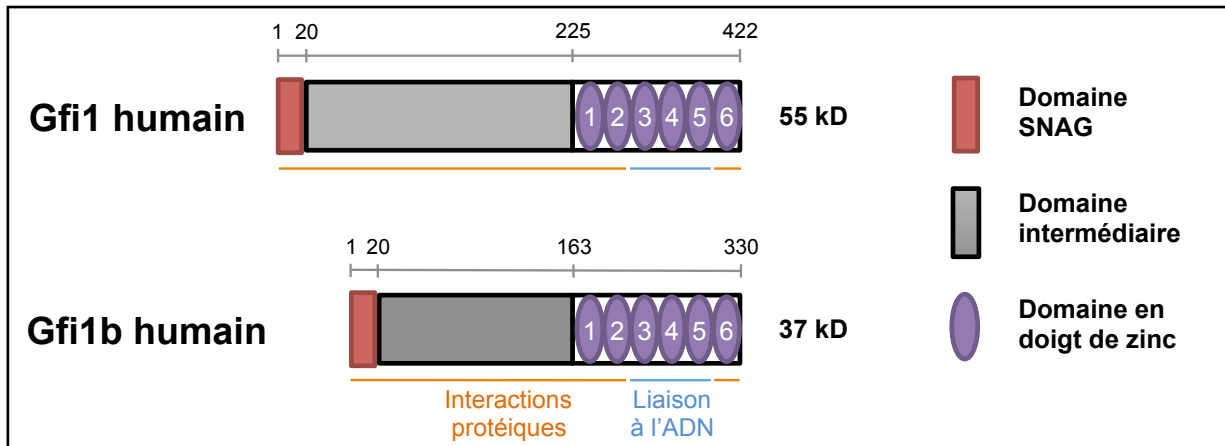
Les protéines GFI1 et GFI1b humaines sont composées respectivement de 422 et 330 acides aminés et possèdent une structure très similaire (Figure 5). Elles sont chacune constituées d'un domaine SNAG à l'extrémité N-terminale, d'un domaine intermédiaire et de 6 domaines en « doigts de zinc » de type C2H2 en C-terminal (Moroy and Khandanpour, 2011). Les domaines en « doigts de zinc » 3 à 5 sont essentiels pour la liaison à l'ADN, alors que les doigts de zinc 1, 2 et 6, ainsi que domaine SNAG et le domaine intermédiaire sont impliqués dans les interactions protéiques. Les domaines SNAG et en « doigts de zinc » présentent une forte similarité entre GFI1 et GFI1b et la présence de ces domaines est inhérente aux protéines de la famille SNAIL/GFI1 (SNAG) (Anguita et al., 2010). En revanche, la région intermédiaire présente seulement 39% d'homologie entre GFI1 et GFI1b. Néanmoins, l'insertion de la séquence codante de *Gfilb* dans le locus du gène *Gfil* restaure presque

entièrement le phénotype hématopoïétique observé chez les souris GF11 « *knock-out* ». Ceci indique donc que les deux protéines ont des effets moléculaires analogues dans l'hématopoïèse. Cependant, la perte d'audition provoquée par la délétion de GF11 n'est pas restituée par l'insertion de *Gfi1b* dans le locus de *Gfi1*, suggérant ainsi que, dans d'autres tissus, les fonctions moléculaires de ces deux facteurs pourraient être différentes et possiblement liées au domaine intermédiaire (Fiolka et al., 2006). Par ailleurs, une substitution, dans le domaine SNAG de GF11, de la proline en position 2 par une alanine (Gfi1<sup>P2A</sup>) inhibe presque entièrement l'activité de répression de GF11 (Grimes et al., 1996). Cependant, les souris *Knock-in*, pour GF11<sup>P2A</sup> ne présentent qu'un phénotype partiellement identique aux souris GF11 *Knock-out* soulignant encore que certaines fonctions de GF11 pourrait être indépendantes du domaine SNAG.

Il existe une forme épissée de GF11b (GF11b-sp2) retrouvée chez des patients atteints de leucémies myéloblastiques aiguës ou chroniques. Dans ce cas, l'absence de l'exon 9, codant pour les « doigts de zinc » 1 à 3, entraîne un réarrangement de la séquence codante et résulte en une protéine tronquée avec seulement 4 « doigts de zinc ». GF11b-sp2 conserve néanmoins la capacité de se lier à l'ADN et ses propriétés régulatrices de la transcription (Vassen et al., 2009).

Plus récemment, deux études ont démontré l'importance du cinquième domaine en doigt de zinc pour l'activité de GF11b dans la mégacaryopoïèse et la production de plaquette (Monteferrario et al., 2014; Stevenson et al., 2013). Une première étude a mis en évidence l'insertion d'un nucléotide dans l'exon 7 (c880-881insC) entraînant un décalage du cadre de lecture au niveau de la partie codante du cinquième domaine en doigt de zinc de *GFI1b*. Cette mutation « décalante » résulte en un dominant négatif de GF11b qui entraîne une thrombopathie sévère caractérisée par une thrombopénie et un défaut d'agrégation des plaquettes associé à une aniso-poïkilocytose (Ardlie and Han, 1974; Stevenson et al., 2013). La seconde étude a identifié une mutation « non-sens » dans l'exon 6 de *GFI1b* (c.859C→T, p.Gln287\*) chez des personnes atteintes du syndrome des plaquettes grises (Monteferrario et al., 2014). Cette mutation introduit un codon STOP dans la séquence du gène et entraîne la production d'une protéine tronquée (GF11<sup>TR</sup>) à laquelle manque 44 acides aminés en C-terminal dont 4 sont indispensables pour la liaison à l'ADN. Ainsi, GF11<sup>TR</sup> n'agit pas directement sur la régulation des gènes, mais plutôt comme un dominant négatif en inhibant

l'action du GFI1b non muté. Par son action GFI1<sup>TR</sup> entraîne la production de larges plaquettes apparaissant grises à la coloration de May-Grünwald Giemsa et anormales car dépourvues de granules alpha, mais affecte également les mégacaryocytes dans leur développement (Monteferrario et al., 2014). L'ensemble de ces études démontre l'importance de l'intégrité structurelle des protéines de la famille GFI1 dans leur activité de répression de la transcription.



**Figure 5 : Structures moléculaires des facteurs de transcription GFI1 et GFI1b**

Les protéines GFI1 et GFI1b sont composées respectivement de 422 et 330 acides aminés et sont chacune constituées d'un domaine SNAG à l'extrémité N-terminale et de 6 domaines en « doigts de zinc » en C-terminal. Ces domaines présentent une forte homologie de séquence entre les deux molécules. Le domaine intermédiaire, situé entre les domaines SNAG et en « doigts de zinc » présente lui une faible similarité. Les domaines en « doigts de zinc » 3 à 5 sont essentiels pour la liaison à l'ADN, alors que les doigts de zinc 1, 2 et 6, ainsi que le domaine SNAG et le domaine intermédiaire sont impliqués dans les interactions protéiques.

## Mécanismes d'action de GFI1b

Le mécanisme d'action de GFI1b est identique à celui de GFI1. Les deux facteurs reconnaissent en effet une séquence d'ADN consensus TAAATCAC<sup>A</sup>/<sub>T</sub>GC<sup>A</sup>/<sub>T</sub> (Anguita et al., 2010; Zweidler-Mckay et al., 1996) dont le motif AATC est invariable. Ils recrutent ensuite au locus de leurs gènes cibles des enzymes capables de modifier les histones réprimant ainsi la transcription par modification de la chromatine. Les principaux partenaires d'action de GFI1b sont *lysine-specific demethylase 1* (LSD1), *REST corepressor* (CoREST) et les histones déacétylase 1 et 2 (HDAC1/2). Les co-facteurs LSD1 et CoREST sont recrutés par GFI1b *via* le domaine SNAG et retirent les groupements méthyles de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) (Shi et al., 2004; Shi et al., 2005), tandis que les enzymes HDAC1/2 catalysent la déacétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) (Saleque et al., 2007). La perte des groupements méthyles sur H3K4 et acétyles au niveau de H3K9 est associée à un arrêt transitoire et réversible de la transcription (Saleque et al., 2007). GFI1b recrute également SUV39H1 et G9A, deux enzymes capables de transférer des groupements méthyles sur les histones (Vassen et al., 2006). L'ajout de groupes méthyles à la position H3K9 stabilise alors la répression du locus et favorise la formation de l'hétérochromatine (Saleque et al., 2007).

Une diminution de l'expression de LSD1 (*Knockdown*) s'accompagne d'une diminution de la répression des gènes cibles de GFI1b dans les lignées érythroïde et mégacaryocytaire ainsi que d'une augmentation de la méthylation de H3K4, confirmant ainsi son implication dans l'activité de répression transcriptionnelle de GFI1b (Saleque et al., 2007). Par ailleurs, la déplétion de GFI1b chez la souris entraîne également d'une augmentation générale de la méthylation de H3K4. Cette augmentation est associée à une diminution de la méthylation de H3K9 et à un défaut d'hétérochromatinisation du génome (Vassen et al., 2006). Il est cependant intéressant de noter que GFI1b peut être associé à des locus actifs, comme par exemple son propre promoteur lors de la différenciation érythroïde fœtale (Laurent et al., 2009). Dans ce contexte, Gfi1b ne recrute pas l'enzyme HDAC1 et le locus demeure hyperacétylé. Cela suggère que l'activité de GFI1b pourrait être dépendante du contexte cellulaire et du recrutement de ses partenaires.

Plusieurs études suggèrent également que GFI1b pourrait exercer son activité de répression par des interactions avec d'autres facteurs de transcriptions tels que GATA-1 (Grosveld et al., 2005; Huang et al., 2005; Kuo and Chang, 2007; Rodriguez et al., 2005), E2A (Hamlett et al., 2008), ou encore le complexe SCL/ETO-2 (Schuh et al., 2005). Cette dernière interaction avec le complexe SCL/ETO-2, est retrouvée dans les cellules érythroïdes mais absente des cellules mégacaryocytaires, soulignant un mode d'action de GFI1b différent dans ces deux lignées hématopoïétiques (Schuh et al., 2005). Cette interaction dépendante de ETO2 est en accord avec une étude démontrant que GFI1b se lie également au ETO humain par l'intermédiaire de sa partie carboxy-terminale (McGhee et al., 2003). Par ailleurs, cette étude suggère que l'activité répressive de GFI1b pourrait être partiellement indépendante du domaine SNAG par le recrutement de dé-acétylases tel que ETO *via* les « doigts de zinc ». De surcroît, les orthologues de GFI1 *senseless* et PAG3 ne possèdent pas de domaine SNAG, mais agissent également comme répresseurs de la transcription, en recrutant par exemple des co-répresseurs de type CtBP (Jafar-Nejad and Bellen, 2004)

Par l'intermédiaire des domaines en doigts de zinc des deux protéines, GATA-1 et GFI1b sont également capables de former un complexe régulateur de la transcription. Au cours de la différenciation érythroïde, GATA-1 se lie directement aux séquences régulatrices de BCL-XL et active ainsi sa transcription. En revanche, le recrutement de GFI1b par la formation d'un complexe GATA-1/GFI1b abolit la transcription de BCL-XL (Kuo and Chang, 2007). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont également démontré que le complexe GATA-1/GFI1b est présent aux promoteurs de *Myc* et *Myb* dans des cellules érythroleucémiques murines (MEL) (Rodriguez et al., 2005).

Enfin, GATA-1 se lie aux régions consensus de *Gfi1* au promoteur de *Gfi1b* et active sa transcription dans des cellules de la lignée myéloblastique humaine K562. En formant un complexe avec GATA-1, GFI1b exerce alors un rétro-contrôle négatif de son propre locus dans cette lignée (Huang et al., 2005).

## Régulation de l'expression de GFI1b

### *Forme normale*

Le contrôle de l'expression de GFI1b est intrinsèque à son activité de régulateur de la transcription. Ce processus dynamique est le résultat d'une balance d'effets auto-régulateurs directs et indirects ainsi que d'une régulation par d'autres facteurs de transcription et son paralogue GFI1.

Le promoteur de *GFI1b* a été décrit par Duen-Yi Huang *et al.* dans des cellules de la lignée K562 (Huang et al., 2004). Par la suite, une étude comparative des séquences initiatrices chez l'humain, le rat et la souris a démontré une grande conservation de ces régions entre espèces ainsi que la présence de sites consensus de liaison de GFI1/GFI1b (Vassen et al., 2005). Il existe donc un rétro-contrôle négatif direct de GFI1b sur son propre locus ainsi qu'un mécanisme de régulation croisée par lequel GFI1 inhibe l'expression de GFI1b (Vassen et al., 2005). De même, GFI1b contrôle négativement l'expression de GFI1 par interaction directe avec son promoteur (Vassen et al., 2005). Cette régulation croisée pourrait expliquer la répartition mutuellement exclusive de ces deux facteurs dans l'hématopoïèse, mais ne permet pas de justifier les variations d'expression de l'un ou l'autre au sein d'une même lignée, soulignant ainsi l'importance d'autres éléments dans la régulation de leur expression. Le changement d'équilibre entre les complexes GATA-2/GFI1 et GATA-1/GFI1b est par exemple un élément clé de l'activation de GFI1b dans les progéniteurs érythroïdes humains (Laurent et al., 2009). Durant l'érythropoïèse, GFI1b est ensuite régulé négativement par STAT5 en réponse à l'EPO et également pas OCT1.

En résumé, l'expression de GFI1b est régulée positivement par GATA-1, NF-Y (Huang et al., 2004), E2A (Xu and Kee, 2007) et HMGB2 (Laurent et al., 2010), tandis qu'elle est réprimée par OCT1 (Hernandez et al., 2010), GFI1b et GFI1, ainsi que par le médiateur STAT5 suite au signal de l'EPO sur son récepteur.

### *Forme épissée*

GFI1b, ainsi qu'un variant épissé alternativement, GFI1b-sp2, sont régulés à la hausse suite au traitement par l'imatinib chez les patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques ou de tumeurs stromales intestinales (Vassen et al., 2009). Dans ce cas, l'augmentation de l'expression des formes normale et épissée de GFI1b est équivalente chez les patients en rémission. En revanche, l'expression de GFI1b-sp2 est plus élevée que celle de la forme complète de GFI1b lors du diagnostic (Vassen et al., 2009).

### *GFI1b et pathologies hématologiques*

GFI1 et GFI1b sont fortement impliqués tout au long de la différenciation hématopoïétique. Des études chez la souris ont mis en évidence des rôles spécifiques et indépendants de l'un et l'autre dans le système sanguin. Par exemple, la délétion constitutive de GFI1 chez la souris est viable, mais conduit à une neutropénie sévère, une augmentation de la réponse inflammatoire et un défaut de développement des lignées B et T. À l'inverse la délétion constitutive de GFI1b est létale au stade embryonnaire après 14,5 jours de gestation. L'étude du rôle de GFI1b dans l'hématopoïèse primitive est de ce fait complexe et la mort des embryons semble être multifactorielle, conséquence notamment de l'arrêt de l'érythropoïèse et d'hémorragies sévères dues à un défaut de génération des plaquettes.

GFI1b est également surexprimé dans divers types de leucémies (Elmaagacli et al., 2007; Vassen et al., 2009). Le *knock-down* de GFI1b augmente l'apoptose dans les cellules leucémiques, soulignant un rôle anti-apoptotique de ce dernier (Elmaagacli et al., 2007). De plus, la surexpression de GFI1b dans des progéniteurs hématopoïétiques humains CD34<sup>+</sup> entraîne une expansion d'érythroblastes indépendante de l'EPO (Osawa et al., 2002).

## Objectifs de l'étude

Le facteur de transcription *Growth Factor Independent 1b* (GFI1b) est essentiel à l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse. Il est également exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et les progéniteurs multipotents. Dans une étude publiée en 2010 par Khandanpour *et al.*, notre équipe a précédemment démontré que la délétion conditionnelle de GFI1b, induit une expansion des CSH dans la moelle osseuse et le sang périphérique des souris adultes (Khandanpour et al., 2010). Dans cette étude, Khandanpour *et al.*, ont utilisé un système Cre-Lox dans lequel l'activation de la Cre recombinase est induite par l'interféron-alpha. Il a cependant été montré que la réponse inflammatoire généralisée qui en résulte entraîne une activation des CSH en quiescence pouvant expliquer leur prolifération indépendamment de la délétion de GFI1b. Par ailleurs, plusieurs publications ont montré que les progéniteurs mégacaryocytaires et les CSH présentent des marqueurs de surface communs rendant leur discrimination difficile. De plus, des travaux préliminaires de notre laboratoire et une étude d'un autre groupe par Foudi *et al.*, (Foudi et al., 2014) indiquent un effet de la délétion de GFI1b sur la mégacaryopoïèse adulte. Il nous a alors paru crucial de déterminer plus précisément si les cellules en expansion chez les souris Gfi1b KO appartiennent uniquement au compartiment des CSH ou si ces cellules sont des mégacaryocytes immatures présentant des marqueurs communs aux CSH. Ainsi, les objectifs de mon travail de maîtrise sont :

- Analyser l'hématopoïèse précoce et les mégacaryocytes dans un nouveau modèle non inflammatoire de délétion conditionnelle de GFI1b
- Mettre au point une stratégie d'analyse par cytométrie en flux afin de distinguer clairement les progéniteurs mégacaryocytaires et les CSH dans le but d'identifier la population hématopoïétique proliférative dans le sang et la moelle osseuse des souris GFI1b KO
- Expliquer la prolifération des cellules GFI1b KO chez la souris et notamment dans le sang périphérique



# Matériel et méthodes

## Souris

Les souris *Gfilb* floxed, RosaCre et GFI1b:GFP ont été obtenues comme décrit précédemment (Khandanpour et al., 2010; Vassen et al., 2007). L'euthanasie, ainsi que les expérimentations animales, ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), en conformité avec les normes provinciales et fédérales.

## Délétion conditionnelle de GFI1b par le système RosaCre

L'activation de la Cre est obtenue par injection intrapéritonéale d'une dose complète (10 mg/kg) de Tamoxifen (Sigma-Aldrich) dilué dans de l'huile de maïs (Sigma-Aldrich) à Jour 1 et une demie dose (5 mg/kg) le jour suivant. La délétion des allèles flox/flox de *Gfilb* est ensuite confirmée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dans les tissus d'intérêt.

## Cytométrie en flux

### Procédure générale

Les cellules de MO totale sont obtenues par extraction de la MO des tibias, fémurs, hanches et humérus. Les globules rouges sont lysés par incubation dans du tampon de lyse (Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées par centrifugation (1250 rpm 4°C 4 min) dans du tampon phosphate salin (PBS 1X) puis maintenues en suspension dans ce même tampon sur glace. Pour les étapes de marquages, les cellules sont incubées 15 min sur glace avec les anticorps couplés à des fluorochromes, puis lavées dans du PBS avant centrifugation (1250 rpm 4°C 4 min). Pour les marquages avec des anticorps biotinylés, les cellules sont incubées dans un premier temps avec l'anticorps biotinylé sur glace, puis lavées avant d'être incubées avec une streptavidine couplée à un fluorochrome. Cette deuxième incubation se fait également sur glace pendant 10 minutes puis les cellules sont lavées avant d'être analysées par cytométrie en flux (Fortessa, BD Biosciences). Pour finir, les données sont analysées avec le logiciel FlowJo 10 (Tree Star).

## Analyse des plaquettes par cytométrie en flux

Les échantillons de sang ont été obtenus par prélèvements intracardiaques ou par prises de sang mandibulaires, lors des cinétiques. Les données ont été enregistrées sur un FACS Calibur (BD) et analysées avec le logiciel FlowJo 8.8.7 (Tree Star).

## Purification des cellules souches, mégacaryocytes et progéniteurs

Les cellules de MO, ainsi que les échantillons de sang ont été extraits et marquées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Dans les deux cas, les globules rouges ont été lysés puis un marquage avec des anticorps d'intérêt a été réalisé selon la procédure décrite ci dessus. Les cellules ont été triées à l'aide d'un trieur (FACS Aria III, BD Biosciences) dans du PBS 1X avant manipulations ultérieures.

Anticorps	Fluorochrome	Anticorps	Fluorochrome
Cocktail Lignage: Gr1, Mac1, B220, CD19, CD3,CD5, Nk1.1, IL7R, Flt3	Biotine + Streptavidine PE-Cy5	CD41	PE
Sca1	PE-Cy7 ou BUV711	CD9	AF700
ckit	BV421	B220	APC
CD48	BV510	CD19	APC-Cy7
CD150	APC	Gr1	PE
CD71	PerCP	Mac1	PerCP-Cy5.5
Ter119	BV605	CD45.2	BUV395
CD16/32	APC-Cy7	CD45.1	Biotine + Streptavidine BV421 Ou PerCP-CY5.5

Tableau 2 : Table des anticorps et fluorochromes utilisés

## Tests clonogéniques en méthylcellulose

Un nombre fixe de cellules hématopoïétiques triées ou un volume défini de sang total suivi d'une lyse des globules rouges est suspendu dans 100 µl de PBS 1X puis mis en suspension dans 1 ml de méthylcellulose supplémentée en cytokines (M3434, Stem Cell Technologies). La suspension cellulaire obtenue est ensuite mise en culture en boîte de Pétri de 4 cm<sup>2</sup> et incubée à 37°C / 5% de CO<sub>2</sub> pour 7 à 10 jours. Après culture, les colonies obtenues ont pu être dénombrées et identifiées par microscopie suivant les recommandations de Stem Cell Technologies. Les images présentées dans ce mémoire ont été obtenues sur un

Microscope inversé Axiovert S100TV (Zeiss) avec lampe à fluorescence et caméra (Retiga EXi cooled).

## Tests clonogéniques en milieu collagène

5000 cellules Lin<sup>-</sup> ont été triées et mis en culture sur lame de collagène supplémentée en cytokines (MegaCult-collagen). Les lames ont été déshydratées dans de l'acétone et colorées pour l'activité de l'acétylcholinestérase avec de l'iodure d'acétylthiocholine (Sigma-Aldrich) puis contre-colorées avec de l'hématoxyline de la solution de Harris (Sigma-Aldrich). Les images ont été enregistrées avec une caméra couleur DP72 haute résolution (Olympus) montée sur un microscope à transmission DM4000B (Leica) en utilisant le logiciel v1.8.1 cellSens Entrée (Olympus).

## Transplantations

Les souris CD45.1 receveuses ont reçu un traitement antibiotique 4 jours avant irradiation et sont demeurées sous traitement antibiotiques après transplantation pour prévenir toute infection. Les souris CD45.1 receveuses ont subi une irradiation corporelle totale et létale de 9.5Gy 24h avant la transplantation de cellules qui a été réalisée par injection intraveineuse dans la queue. Les souris ont reçu les cellules d'intérêt (CD45.2) à différentes concentrations, ainsi que 150 000 cellules de soutien (CD45.1).

## Génotypage par PCR

Les amorces suivantes ont été utilisées pour le génotypage des souris RosaCre x *Gfi1b* flox/flox : LP5-3s GGTTTCTACCAGTCTGGCCCTGAACTC; LP3-3r CTCACCTC TCTGTGGCAGTTTCCTATC; LP5-4r TACATTCATGCTTAGAACTTGAGTC.

Le produit de l'allèle sauvage est de 256 pb, 295 pb pour l'allèle flox et 540 pb pour l'allèle délétée.

## Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test t de Student (comparaison entre deux groupes). Les données ont été considérées comme significativement différentes

pour une valeur de P inférieure à 0.05 (\*), 0.01 (\*\*) ou 0.001 (\*\*\*) tel qu'indiquées sur les graphiques. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type/2. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 5.0, GraphPad Software).

## **Analyses bioinformatiques**

Pour les expériences de ChIP-Seq les bibliothèques de séquençages ont été préparées en utilisant la trousse TruSeq Stranded mRNA de Illumina, selon les indications du fabricant et séquencées en utilisant la trousse TruSeq PE Clusterkit v3-cBot-HS sur un instrument Illumina HiSeq 2000. Les fragments de lecture ont été alignés au génome de souris GRCm38 avec Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). Les fichiers de visualisation (.bw) ont été générés avec Bedtools et visualisés sur le UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Pour le ChIP-Seq de GFI1b, les résultats de séquençage ont été fournis gracieusement par le laboratoire de Bertie Göttgens (Cambridge University Département d'Hématologie, Cambridge Institute for Medical Research).

Pour les expériences de RNA-Seq, les bibliothèques de séquençages ont été préparées en utilisant la trousse TruSeq Stranded mRNA de Illumina, selon les indications du fabricant et séquencées en utilisant la trousse TruSeq PE Clusterkit v3-cBot-HS sur un instrument Illumina HiSeq 2000. Les fragments de lecture ont été alignés au génome de souris GRCm38 avec Tophat2 (v2.0.10), transformés avec Samtools puis alignés aux transcrits Ensembl avec HTSeq. Les différences d'expression ont été quantifiées avec le paquet DESeq de R (Anders and Huber, 2010). Les fichiers de visualisation (.bw) ont été générés avec Bedtools.

L'analyse fonctionnelle identifiant les fonctions biologiques associées aux gènes ayant les changements d'expression les plus importants a été effectuée avec le programme GSEA (Subramanian et al., 2005).

## Résultats

### L'hématopoïèse médullaire chez la souris GFI1b « *Knockout* »

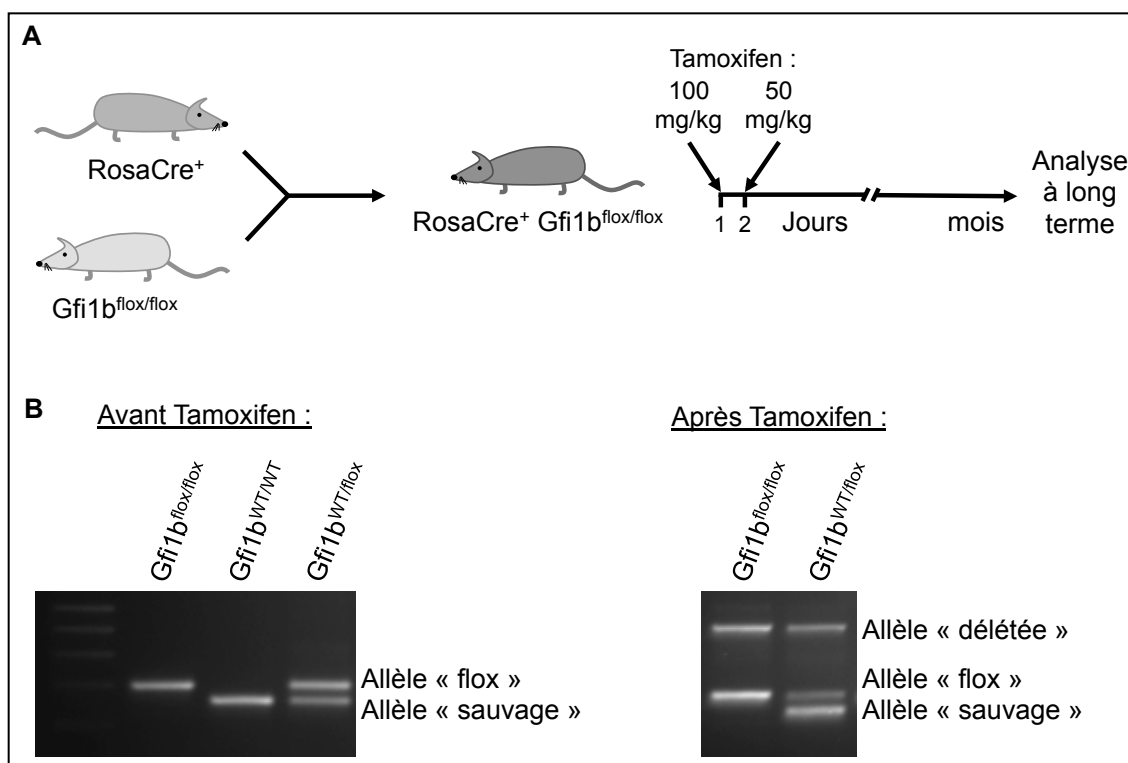
Notre équipe a précédemment démontré que la délétion conditionnelle de GFI1b, en utilisant un système Cre-Lox sous le contrôle du promoteur *Mx1*, induit une expansion des cellules souches hématopoïétiques dans la MO et le sang périphérique des souris adultes. Dans ce modèle, la délétion (« *Knock out* ») de GFI1b est induite par une série d'injections intrapéritonéales de sel d'acide polyinosinique-polycytidylique (pIpC). Ce dernier est un ligand des récepteurs *Toll-like* (TLR) qui provoque chez la souris la production d'interféron-alpha (INF- $\alpha$ ) et entraîne ainsi l'activation du promoteur *Mx1* et donc la transcription de la recombinaise Cre qui va finalement exciser les allèles de *Gfi1b* flanquées de site flox. Il a cependant été démontré chez la souris qu'un traitement à l'INF- $\alpha$  entraîne une activation des CSH et une sortie de la phase de quiescence. Afin de limiter l'impact de la production d'INF- $\alpha$  sur l'homéostasie des CSH murines, l'ensemble des travaux précédents de notre équipe portant sur ce modèle a été réalisé 30 jours après la dernière injection de pIpC et toujours en incluant un groupe contrôle ayant reçu un traitement au pIpC identique au groupe « *Knock out* ».

Cependant, nous avons répété ces travaux et approfondi l'étude de la délétion conditionnelle de GFI1b en utilisant un second modèle non-inflammatoire. Nous avons ainsi croisé les souris *Gfi1b*<sup>flox/flox</sup> avec des souris transgéniques Rosa26-Cre-ERT (Figure 6A).

Chez les souris Rosa26-Cre-ERT, le gène de la recombinaise *Cre* est fusionné au domaine de fixation du ligand du récepteur de l'estrogène humain ERT2 et placé sous le contrôle transcriptionnel du locus *Rosa26*. L'expression de ce transgène est cytoplasmique et ubiquitaire, mais la fusion de la *Cre* avec ERT2 permet de contrôler la translocation de celle-ci vers le noyau et donc son activité. En effet, l'administration d'un antagoniste des récepteurs aux estrogènes, le tamoxifène, entraîne la translocation de la protéine fusion CRE-ERT2. Une fois dans le noyau, la CRE-ERT2 peut alors exciser la séquence d'ADN comprise entre les deux sites LoxP. En revanche, les estrogènes endogènes ne lient pas ERT2. La recombinaise

CRE demeure donc cytoplasmique chez les animaux non traités au tamoxifène. Dans ce cas, la CRE-ERT2 ne peut pas exercer son activité recombinase et la séquence n'est pas excisée.

Dans notre modèle, la délétion de GFI1b dans les souris Rosa26-Cre-ERT x  $Gfi1b^{flox/flox}$  est obtenue par l'injection intrapéritonéale d'une dose de 100 mg/kg tamoxifène, suivie d'une demie dose (50 mg/kg) le jour suivant (Figure 6A). Comme pour le système Mx1Cre, la délétion conditionnelle de GFI1b dans les souris adultes Rosa26-Cre-ERT x  $Gfi1b^{flox/flox}$  n'est pas létale, nous permettant ainsi un suivi à long terme de l'effet de la délétion sur l'hématopoïèse. On peut néanmoins constater que la délétion dans les cellules de MO totale n'est que partielle (Figure 6B), suggérant que certaines cellules ou lignées cellulaires échappent, au moins partiellement, à l'activation de CRE par le tamoxifène.

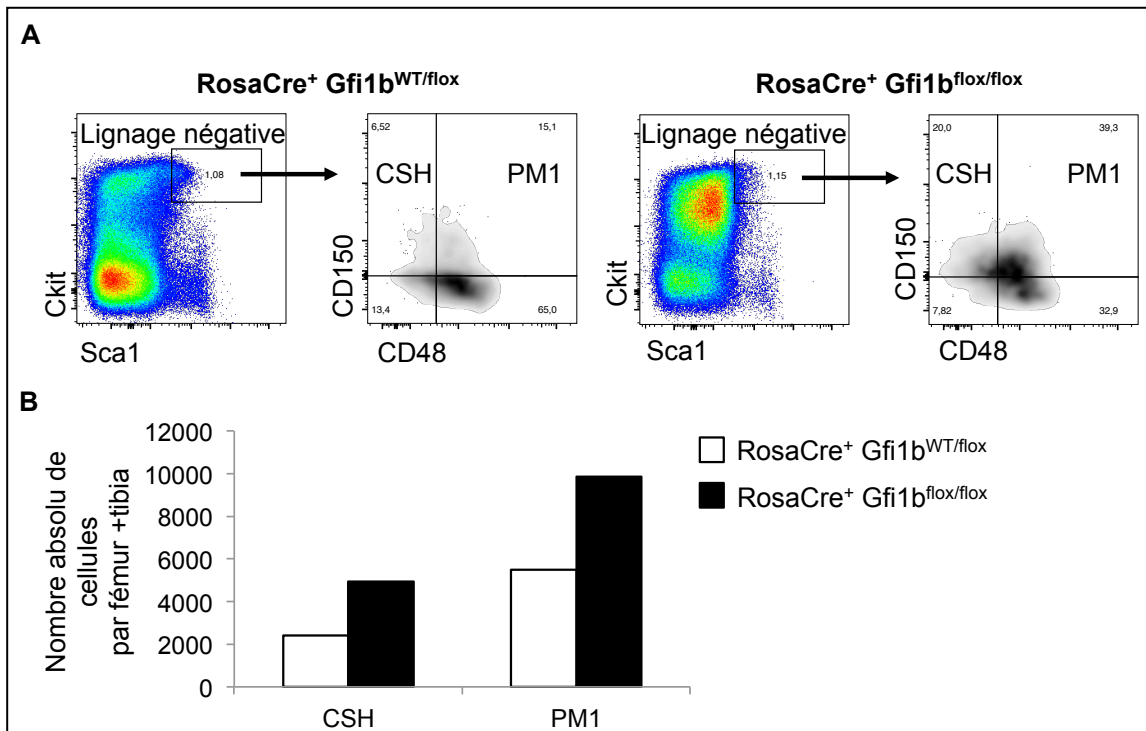


**Figure 6 : Délétion conditionnelle de Gfi1b par le Tamoxifène**

**A)** Schéma descriptif de l'obtention des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x  $Gfi1b^{flox/flox}$  **B)** Réaction de polymérisation en chaîne montrant la délétion des allèles flox de *Gfi1b* dans les cellules de moelle osseuse totale chez les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x  $Gfi1b^{flox/flox}$ , Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x  $Gfi1b^{WT/WT}$  et Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x  $Gfi1b^{wt/flox}$  avant (panel gauche) et après (panel droit) traitement par le tamoxifène. Les produits de réaction sont respectivement de 250, 295 et 500 paires de bases pour les allèles « sauvages », « flox » et « délétés ».

## Expansion des CSH

Afin d'étudier l'effet à long terme sur l'hématopoïèse de la délétion de GFI1b dans la souris adulte, nous avons sacrifié les souris deux mois après injection avec le tamoxifène. En accord avec les précédents résultats de notre laboratoire, l'analyse comparative par cytométrie en flux de la MO révèle une augmentation du pourcentage ainsi que du nombre absolu de CSH (LSK<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>) et PM1 (LSK<sup>+</sup> CD48<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>) chez les souris Gfi1b « *knockout* » (KO) par rapport aux souris contrôles (Figure 7A et B).

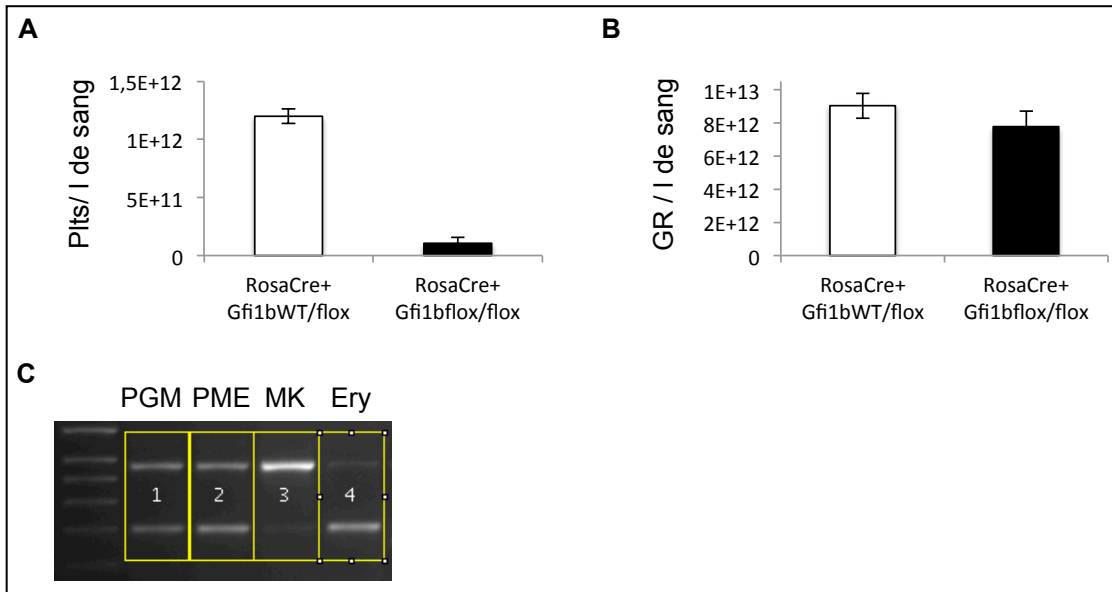


**Figure 7 : Effet de la délétion conditionnelle de GFI1b dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques**

**A)** Exemples représentatifs d'analyses par cytométrie en flux des CSH (LSK<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>), PM1 (LSK<sup>+</sup> CD48<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>) et PM2 (LSK<sup>+</sup> CD48<sup>+</sup> CD150<sup>-</sup>) de la moelle osseuse chez des souris de type sauvage (panel droit) et KO pour GFI1b (panel gauche) **B)** Nombres absolus des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse des souris « sauvage » (blanc) et « *knockout* » pour GFI1b (noir).

Les CSH sont à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines et notamment les lignées érythroïde et mégacaryocytaire dans lesquelles GFI1b est encore fortement exprimé et joue un rôle indispensable dans les processus de différenciation et maturation. Ainsi, la délétion constitutive de GFI1b est létale au stade embryonnaire, vraisemblablement suite à l'effet combiné de l'arrêt de l'érythropoïèse et d'hémorragies sévères dues à un défaut de génération des plaquettes. Nous nous sommes donc interrogés sur l'effet que pourrait avoir la délétion de GFI1b sur ces lignées dans notre modèle de délétion conditionnelle chez la souris adulte. Pour cela, nous avons dans un premier temps analysé les globules rouges et plaquettes sanguines après injection de tamoxifène. L'analyse a alors montré qu'un mois après les injections de tamoxifène, les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> présentent une diminution drastique du taux de plaquettes sanguines en comparaison avec les souris contrôles (Figure 8). En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les taux de globules rouges des deux cohortes. Dans un second temps, nous avons étudié les progéniteurs et précurseurs médullaires de ces deux lignées afin d'établir l'origine de cette différence. L'analyse par PCR de l'excision des allèles flox de *Gfi1b* dans les différentes populations triées par cytométrie en flux a ainsi révélé que la délétion de GFI1b était efficace dans les mégacaryocytes (Mk), mais pas dans les cellules érythroïdes (Figure 8). Ceci suggère qu'après le traitement par le tamoxifène, si des cellules érythroïdes sont bien délétées, celles-ci sont rapidement éliminées et seules subsistent les cellules non délétées, permettant ainsi la production de globules rouges fonctionnels et la survie des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup>. À l'inverse, les mégacaryocytes *Knockout* pour GFI1b ne sont pas éliminés, mais semblent incapables de soutenir la production de plaquettes. Ainsi, les souris KO présentent une forte thrombopénie.



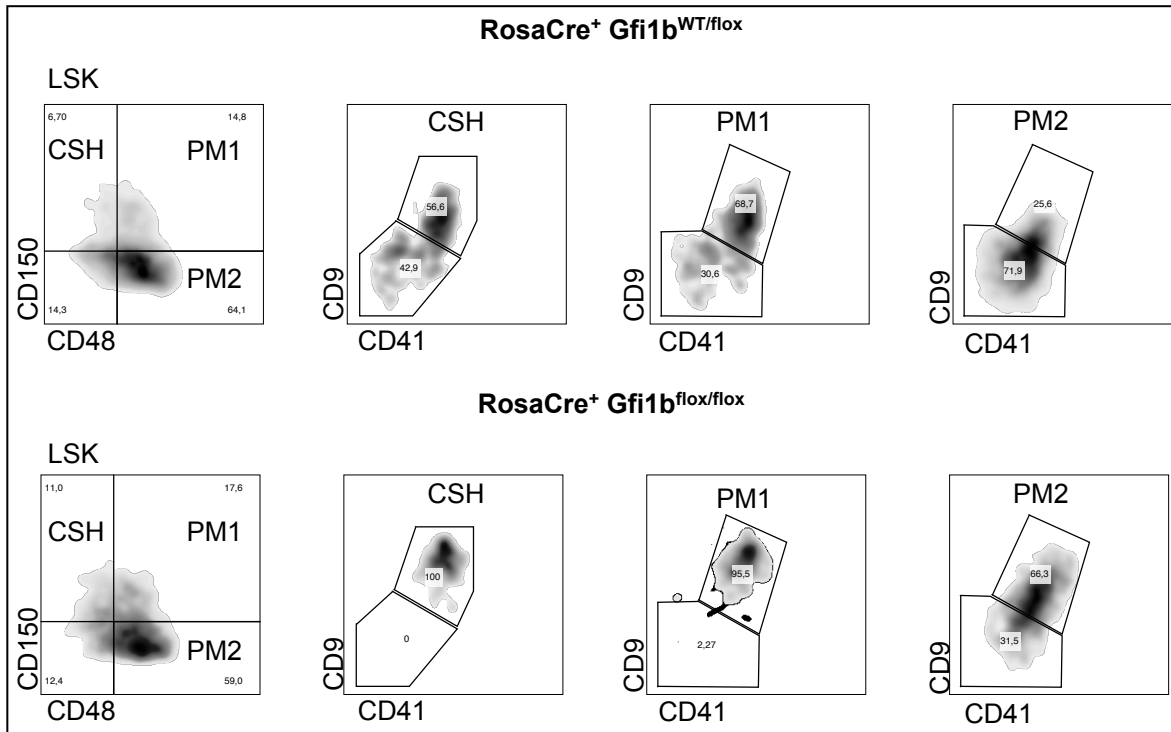


**Figure 8 : Comparaison entre les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires**

**A)** Histogramme comparant le nombre des plaquettes sanguines des souris de type sauvage (blanc) et « *knockout* » pour GFI1b (noir). **B)** Histogramme comparant le nombre de globules rouges circulants des souris « sauvage » (blanc) et « *knockout* » pour GFI1b (noir). **C)** Gel d'agarose montrant la migration des produits de réaction de polymérisation en chaîne des progéniteurs granulo-myéloïdes (PGM, 1), des progéniteurs mégacaryo-érythrocytaires (PME, 2), des mégacaryocytes (MK, 3) et des précurseurs érythroïdes (Ery, 4) de souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> injectées au tamoxifène. La bande supérieure correspond au produit du PCR du KO de GFI1b alors que la bande inférieure correspond aux allèles Flox.

### **Caractérisation des CSH en expansion dans les souris KO**

Par la suite, puisque les souris GFI1b KO présentent une forte thrombopénie, nous avons supposé que l'expansion des CSH puisse être la conséquence de cette diminution des plaquettes circulantes. Il a déjà été montré que, chez la souris adulte, les CSH peuvent exprimer l'intégrine  $\alpha$ IIb (CD41), lorsqu'elles ont un biais vers les compartiments érythroïde, myéloïde et mégacaryocytaire (Gekas and Graf, 2013). Nous avons donc analysé par cytométrie en flux l'expression de ce marqueur à la surface des CSH et progéniteurs hématopoïétiques précoces. L'analyse révèle que suite à la délétion de GFI1b, une plus grande proportion de ces cellules expriment l'intégrine  $\alpha$ IIb (Figure 9). De plus, elles co-expriment l'antigène CD9, un autre marqueur fréquemment associé à la lignée mégacaryocytaire (Figure 9) (Boucheix et al., 1991; Desterke et al., 2015). L'expression de ces marqueurs suggèrent ainsi une orientation précoce et anormale des CSH et progéniteurs vers le compartiment mégacaryocytaire.



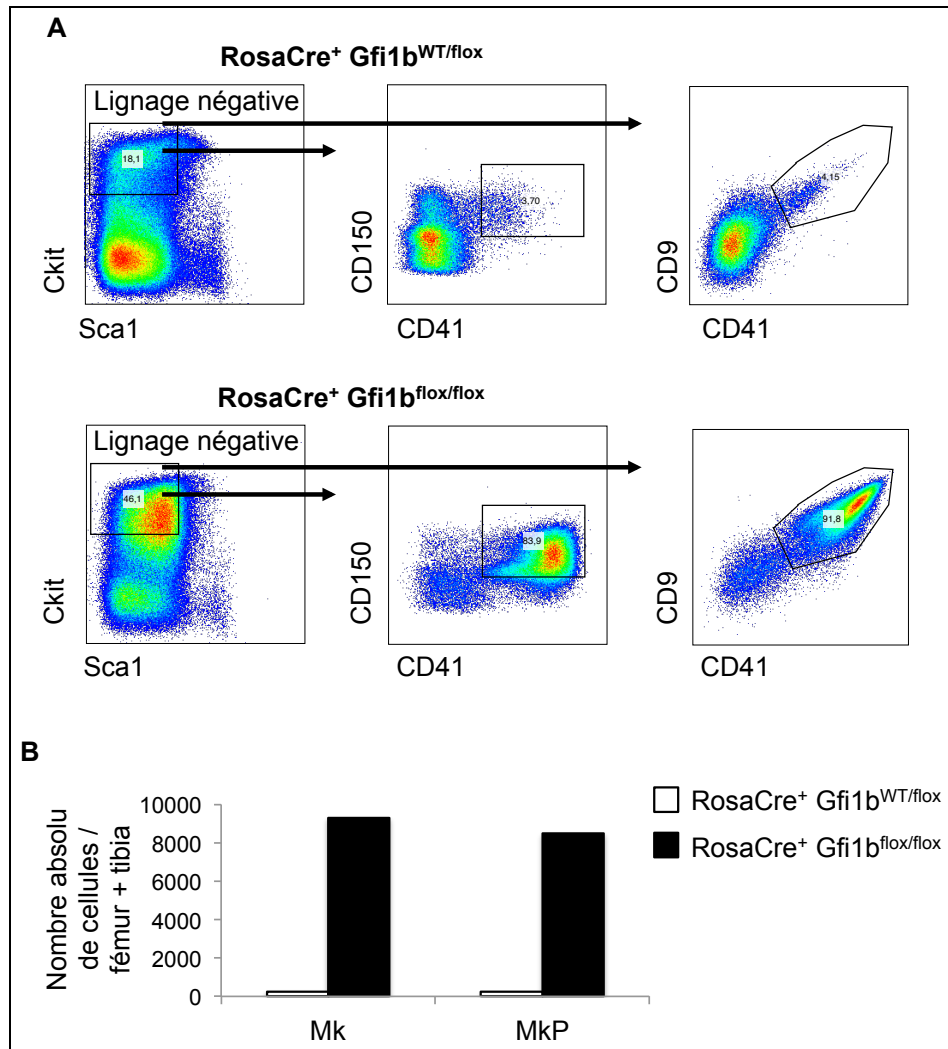
**Figure 9 : Effet de la délétion conditionnelle de GFI1b sur l'expression des marqueurs mégacaryocytaires CD9 et CD41 à la surface des CSH et progéniteurs**

Analyses par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs CD9 et CD41 sur les CSH (LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>), PM1 (LSK CD48<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>) et PM2 (LSK CD48<sup>+</sup> CD150<sup>-</sup>) de la moelle osseuse chez des souris « sauvage » (haut) et « *knockout* » pour GFI1b (bas).

## Analyse de la lignée mégacaryocytaire dans les souris KO

Le profil par cytométrie en flux montre également une forte augmentation de la population Lignée, Sca1<sup>-</sup> et c-kit<sup>+</sup> (LK) après délétion de *Gfi1b* (Figure 10A). Cette population LK contient un ensemble de progéniteurs et précurseurs engagés et notamment les progéniteurs mégacaryo-érythrocytaires (PME), ainsi que les précurseurs érythroïdes et mégacaryocytaires qui en dérivent. Puisque les souris KO présentent une forte thrombopénie et un maximum d'efficacité d'excision de *Gfi1b* dans les mégacaryocytes, nous nous sommes particulièrement intéressés à cette population. Les marqueurs CD9 et CD41 permettent de visualiser les progéniteurs mégacaryocytaires (LK CD150<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup>), ainsi que les mégacaryocytes (LK CD9<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup>). Les souris KO présentent une forte augmentation de la fréquence et du nombre absolu des mégacaryocytes (Mk), ainsi que des progéniteurs mégacaryocytaires (MkP) comparé aux souris contrôles (Figures 10A & B). En effet, les Mk et les MkP sont augmentés respectivement de 36 et 37 fois chez les souris KO comparé aux souris contrôles (Figure 10B). En revanche, comme attendu, la délétion conditionnelle de *Gfi1b* n'altère pas la lignée érythroïde également présente dans le compartiment LK (données non présentées).

L'ensemble de ces résultats suggère que la délétion conditionnelle de *Gfi1b* par le tamoxifène dans les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x *Gfi1b*<sup>flox/flox</sup> entraîne une prolifération des CSH et PM médullaire, ainsi qu'une diminution des plaquettes circulantes. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente de notre équipe (Khandanpour et al., 2010). En revanche, contrairement à cette étude, une analyse supplémentaire dans notre modèle montre une augmentation de l'expression de CD9 et CD41 à la surface des CSH et PM des souris *Gfi1b* KO suggérant ainsi un biais vers le compartiment mégacaryocytaire. Par ailleurs, ces souris présentent une forte augmentation des populations de MkP et Mk qui sont cependant incapables de produire des plaquettes matures afin de compenser la forte thrombopénie observée chez les souris *Gfi1b* KO. Dans la suite de cette étude nous utiliserons une nouvelle approche de sélection par cytométrie en flux afin de disséquer plus finement les populations en expansion dans la souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x *Gfi1b*<sup>flox/flox</sup>. Enfin, notre analyse montre que la lignée érythroïde échappe à la délétion par le tamoxifène et permet ainsi d'expliquer la survie des souris à long terme dans notre modèle.



**Figure 10 : Effet de la délétion conditionnelle de GFI1b sur les mégacaryocytes**

**A)** Exemples représentatifs d'analyses par cytométrie en flux des progéniteurs mégacaryocytaires (LK CD41<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>) et mégacaryocytes (LK CD41<sup>+</sup> CD9<sup>+</sup>) dans la moelle osseuse chez des souris « sauvage » (panel supérieur) et « *knockout* » pour GFI1b (panel inférieur) **B)** Nombres absolus des progéniteurs mégacaryocytaires (MkP) et mégacaryocytes (Mk) dans la moelle osseuse des souris « sauvage » (blanc) et « *knockout* » pour GFI1b (noir).

## **Stratégie d'analyse par cytométrie en flux des souris KO pour GFI1b**

En situation physiologique, les mégacaryocytes sont parmi les cellules les plus rares de la moelle osseuse. Leur forte prolifération, ainsi que l'expression à la surface des CSH et des PM de certains marqueurs caractéristiques de l'engagement dans la lignée des mégacaryocytes rend difficile l'identification formelle des cellules en prolifération chez les souris KO.

Afin de mieux caractériser le compartiment des CSH, nous avons ajouté une étape de sélection supplémentaire lors de la détection « classique » des CSH par cytométrie en flux. Les cellules LSK sont classiquement sélectionnées après élimination des cellules les plus matures par un cocktail d'anticorps dit de « Lignage ». Les CSH sont ensuite identifiées dans la population LSK par leur expression des CD150 et CD48. Dans notre analyse, nous avons réalisé une présélection entre l'étape d'élimination des cellules Lignage positives et l'étape des LSK en séparant les cellules Lignage négatives selon leur expression de CD9 et CD41. Les cellules doubles positives pour CD9 et CD41 représentent majoritairement des mégacaryocytes matures.

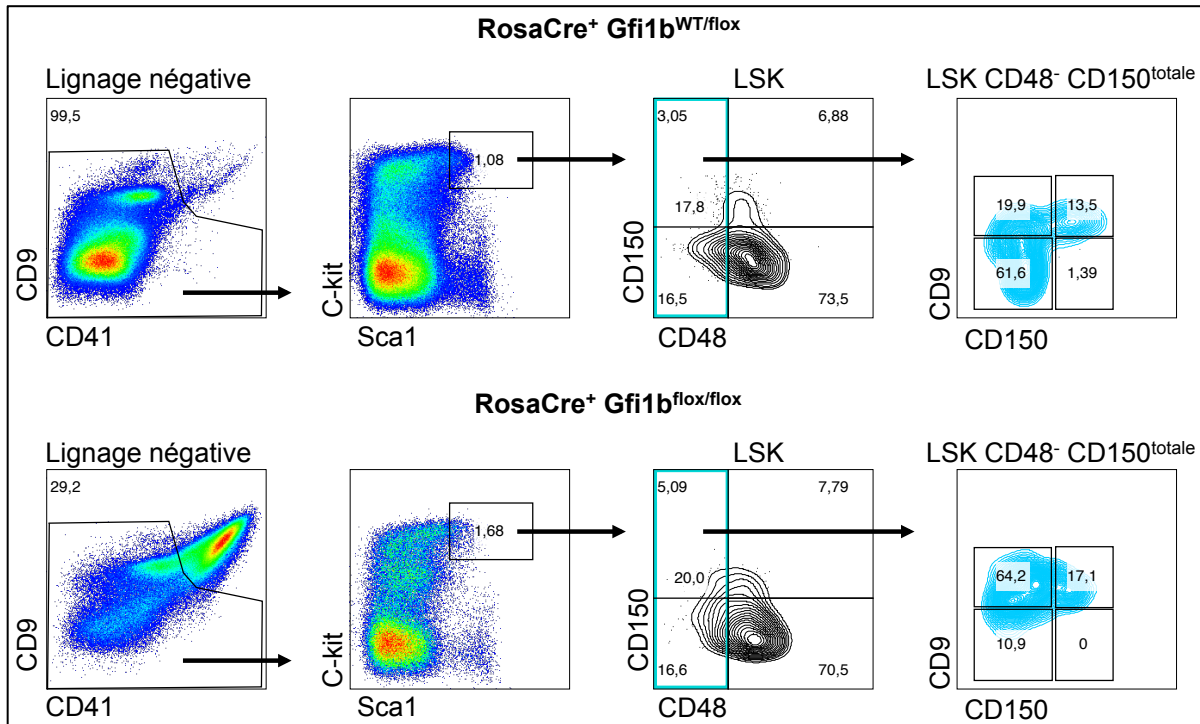
Nous avons constaté, en accord avec la littérature, que la proportion de mégacaryocytes matures ( $\text{Lin}^- \text{CD9}^+ \text{CD41}^+$ ) chez la souris contrôle représente un très faible pourcentage de la MO. En revanche, ces cellules doubles positives représentent près de 30% des cellules Lignage négative chez la souris KO, confirmant ainsi l'expansion de cellules mégacaryocytaires précédemment observées (Figures 10A & B). Par la suite, nous avons exclu les cellules  $\text{Lin}^- \text{CD9}^+ \text{CD41}^+$  et analysé uniquement la population contenant les cellules doubles négatives et simples positives pour l'un ou l'autre de ces marqueurs (Figure 11). Nous avons alors observé que le profil LSK des souris KO était très similaire à un profil sauvage. De plus, les populations CSH ( $\text{LSK}^- \text{CD48}^- \text{CD150}^+$ ) et PM ( $\text{LSK}^- \text{CD48}^+ \text{CD150}^+$ ), n'apparaissent plus que faiblement augmentées dans la souris GFI1b KO en comparaison avec la souris contrôle (Figure 11).

Cependant, une étude publiée dans *Cell Reports* en 2013 propose que le CD9 soit un marqueur discriminant des CSH indépendamment de l'expression du CD150 (Karlsson et al., 2013). Ainsi, les cellules  $\text{LSK}^- \text{CD48}^- \text{CD9}^+$  seraient capables de reconstituer efficacement toutes les lignées hématopoïétiques à long terme, alors que les cellules  $\text{LSK}^- \text{CD48}^- \text{CD9}^-$ , ne

seraient en revanche pas capables de reconstituer l'hématopoïèse chez des souris receveuses irradiées.

Nous avons donc adapté l'analyse de la population LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>total</sup>, décrite par Karlsson *et al.* (Karlsson et al., 2013) à notre étude des CSH dans les souris GFI1b KO. Celle-ci a démontré une diminution des populations CD9 négatives (LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>-</sup> CD9<sup>-</sup> et LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup> CD9<sup>-</sup>) chez la souris GFI1b KO. À l'inverse, les populations LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>-</sup> et LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup> exprimant le CD9 étaient augmentées lorsque GFI1b était absent. Ainsi, si l'on définit les CSH d'après l'étude de Karlsson *et al.*, ces résultats suggèrent que la délétion conditionnelle de GFI1b dans les souris adultes entraîne bien une prolifération des cellules souches fonctionnelles. Seules des expériences de reconstitution *in vivo* permettraient de mesurer le potentiel souche de ces cellules.

L'ensemble de ces résultats montre que la délétion conditionnelle de GFI1b entraîne une expansion de cellules CD9<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup>, apparentées aux mégacaryocytes, dans la MO des souris adultes. En revanche, après exclusion de ces cellules, les populations des CSH (LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>) et PM (LSK CD48<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>) n'apparaissent plus augmentées dans les souris KO. Une analyse supplémentaire montre cependant que les populations LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>totale</sup> CD9<sup>+</sup>, elles aussi définies comme des cellules souches, sont également augmentées dans les souris GFI1b KO. Ces deux analyses contradictoires ne nous permettent pas de conclure quant à l'augmentation des cellules souches dans la MO des souris KO pour GFI1b. Afin de déterminer si il existe bien une expansion du compartiment de CSH après délétion de GFI1b, il est nécessaire de tester le potentiel de reconstitution à long terme de chacune de ces populations par transplantation. Nous pourrions ainsi caractériser indépendamment les populations LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup> et LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>totale</sup> CD9<sup>+</sup> et déterminer si l'augmentation des cellules CD9 est associée à un changement fonctionnel. De même, le caractère exclusivement mégacaryocytaire des cellules CD9<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> en expansion reste également à confirmer par des tests fonctionnels. En effet, l'analyse par cytométrie en flux ne permet pas de caractériser avec certitude le potentiel souche d'une population ou d'affirmer l'appartenance à la lignée mégacaryocytaire. Afin d'affiner notre analyse des populations hématopoïétiques en expansion après la délétion de GFI1b, nous avons donc réalisé des transplantations et des cultures en milieu semi-solide, tests qui permettent de déterminer le potentiel souche d'une cellule.



**Figure 11 : Analyse du compartiment LSK excluant les cellules double positives CD9<sup>+</sup> et CD41<sup>+</sup>**

Analyses par cytométrie en flux des CSH (LSK<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>), PM1 (LSK<sup>+</sup> CD48<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>) et PM2 (LSK<sup>+</sup> CD48<sup>+</sup> CD150<sup>-</sup>) de la moelle osseuse chez des souris de type sauvage (haut) et KO pour Gfi1b (bas) en excluant préalablement les cellules double positives CD9<sup>+</sup> et CD41<sup>+</sup>.



## Transplantations de la populations CD9 CD41 double positive

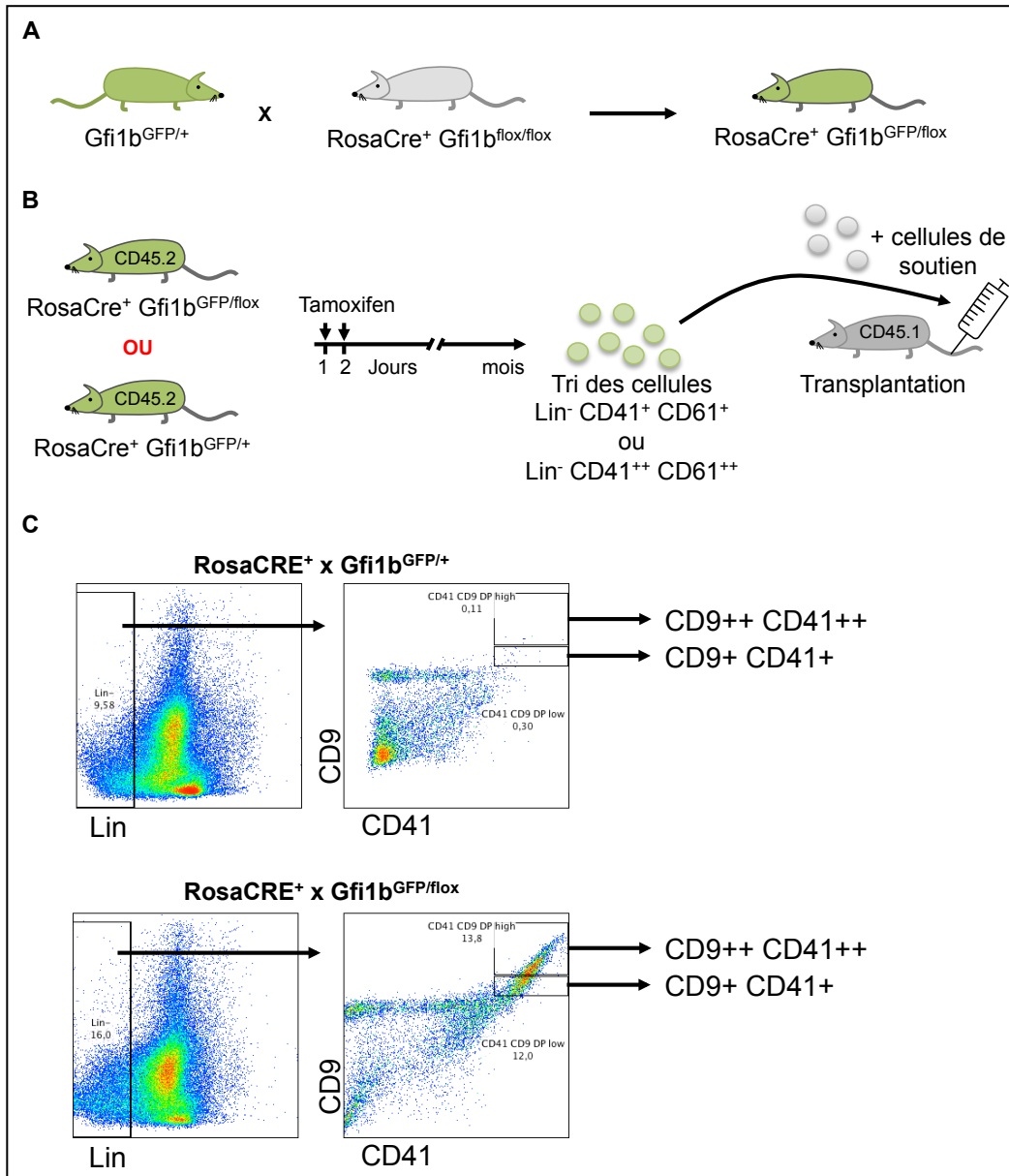
Les souris GFI1b KO présentent, dans la MO une forte expansion de cellules Lignée négatives et doubles positives pour les marqueurs CD9 et CD41. Ces deux marqueurs sont présents sur les mégacaryocytes, mais également sur les CSH et les PM. En utilisant l'analyse « classique » par cytométrie en flux, qui n'inclut pas ces deux marqueurs, notre laboratoire a précédemment décrit une expansion des CSH de la MO après délétion de GFI1b. En revanche, l'exclusion de ces cellules doubles positives avant l'analyse des CSH (LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>) réduit fortement cette expansion. Afin d'identifier plus précisément cette population en expansion après la délétion de GFI1b, nous avons mesuré le potentiel de reconstitution à long terme de cette population double positive par transplantation.

Dans le but de faciliter l'analyse de la reconstitution à long terme, nous avons utilisé des souris GFI1b:GFP. Chez ces souris, la séquence codante *Gfp* (Protéine à fluorescence verte) est insérée au locus du gène *Gfi1b* et permet ainsi de visualiser par fluorescence les cellules dans lesquelles le gène est actif (Figure 12A). Les souris du groupe contrôle expriment une allèle *Gfi1b:Gfp* et une allèle sauvage (*Gfi1b*<sup>GFP/+</sup>), alors que les souris KO expriment une allèle *Gfp* et une allèle *floxed* excisée suite à l'injection de Tamoxifen (*Gfi1b*<sup>GFP/flox</sup>). Une étude précédente de notre laboratoire démontre que les souris hétérozygotes *Gfi1b*<sup>GFP/+</sup> sont identiques à des souris de type sauvage et que l'haploinsuffisance résultant de l'insertion de *Gfp* au locus du gène *Gfi1b* sur une seule allèle n'a pas d'effet sur l'hématopoïèse et le développement des cellules hématopoïétiques (Vassen et al., 2007).

Après transplantation, l'expression de la GFP nous permet de distinguer les cellules exprimant GFI1b. De plus, l'ensemble des cellules transplantées exprime également le marqueur congénique CD45.2, ce qui permet de les distinguer des cellules CD45.1 des souris receveuses (Figure 12B).

L'expression de CD9 et CD41 augmente à la surface des mégacaryocytes au cours de la maturation. En conditions physiologiques normales, cette population médullaire double positive représente donc un ensemble hétérogène de cellules de la lignée mégacaryocytaire. Pour tenir compte de cette hétérogénéité, nous avons subdivisé la population double positive en deux sous-populations testées indépendamment par transplantation. Une première sous-

population exprimant très fortement CD9 et CD41 ( $CD9^{++} CD41^{++}$ ) et une seconde population les exprimant plus modérément ( $CD9^{+} CD41^{+}$ ). Ces deux populations sont augmentées chez la souris KO (Figure 12B et C). Chaque population  $CD9^{++} CD41^{++}$  ou  $CD9^{+} CD41^{+}$  issue des souris de type sauvage ou KO est ensuite injectée dans les souris receveuses CD45.1 et les souris sont sacrifiées puis analysées seize semaines après transplantation. Les souris receveuses sont irradiées à dose létale avant transplantation et reçoivent donc également des cellules CD45.1 de MO totale afin de garantir leur survie à long terme en cas de non reconstitution des cellules CD9 et CD41 double positives. En parallèle, nous avons injecté des souris avec de la MO totale provenant de souris  $Gfi1b^{GFP/+}$  et  $Gfi1b^{GFP/flox}$  comme contrôle pour l'expression de la GFP et la prise de greffe.



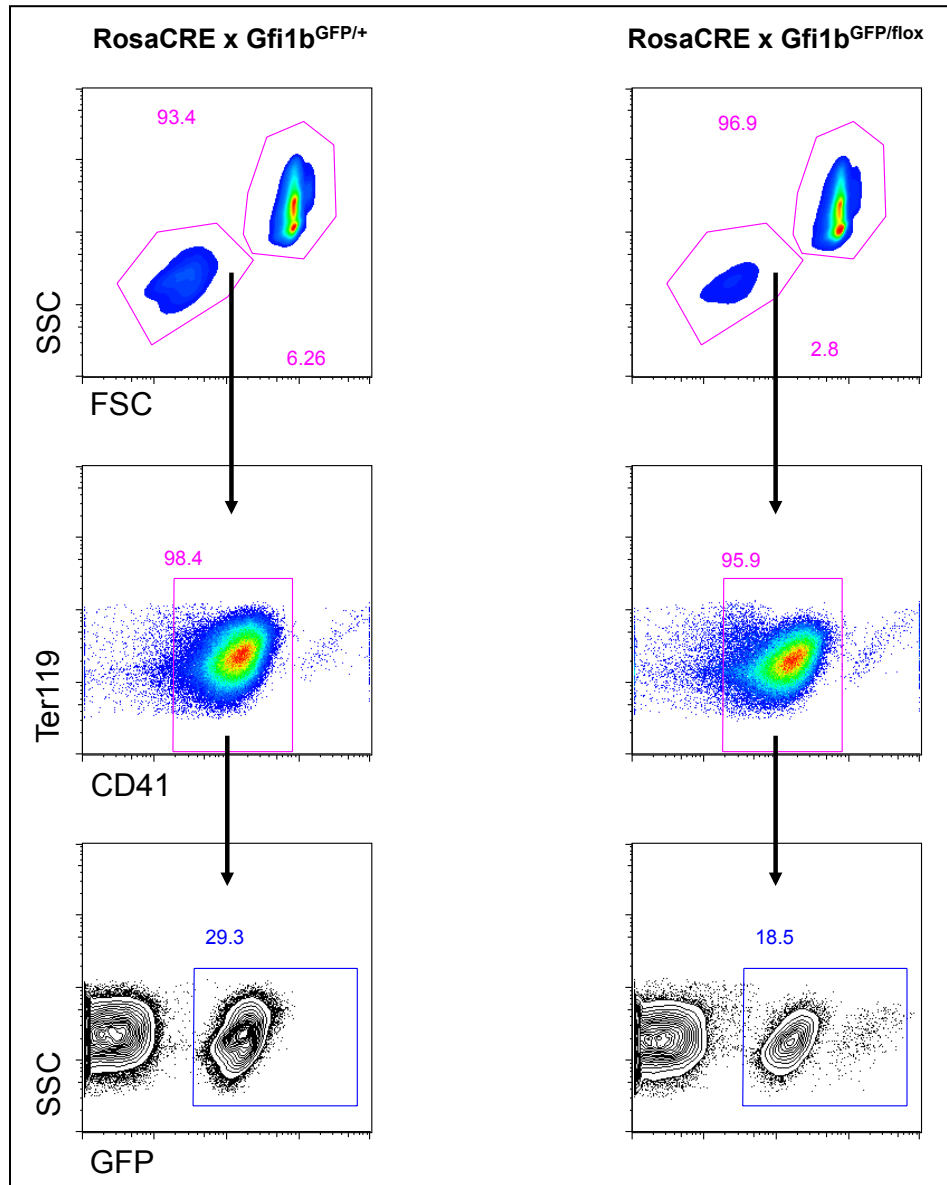
**Figure 12 : Sélection par cytométrie en flux des cellules Lignée<sup>-</sup> CD41<sup>+</sup> CD9<sup>+</sup>**

**A)** Schéma descriptif de l'obtention des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/flox</sup> (KO) **B)** 1200 cellules CD45.2 Lin<sup>-</sup> CD41<sup>+</sup> CD9<sup>+</sup>, ainsi que des cellules de soutien CD45.1 sont injectées chez des souris receveuses CD45.1 **C)** Stratégie de sélection par cytométrie en flux des cellules doubles positives pour les marqueurs CD9 et CD41 dans la MO de souris de type sauvage (haut) et KO pour GFI1b (bas)

À l'issue des seize semaines suivant la transplantation, nous avons réalisé dans un premier temps des analyses par cytométrie en flux des cellules sanguines chez les souris CD45.1 transplantées. Puis, dans un second temps, nous avons sacrifié les souris transplantées pour étudier la reconstitution dans l'ensemble du compartiment médullaire.

Dans le sang, nous nous sommes particulièrement intéressés aux plaquettes car leur production est affectée par l'absence de GFI1b. De plus, les plaquettes produites par des mégacaryocytes exprimant la GFP conservent une partie des protéines fluorescentes après avoir été libérées dans le sang, ce qui permet de les différencier des autres plaquettes. Nous pourrions ainsi déterminer si des plaquettes sont produites par les cellules CD9<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> ou CD9<sup>++</sup> CD41<sup>++</sup> que nous avons transplantées. Pour distinguer les plaquettes par cytométrie en flux, nous devons utiliser des échelles logarithmiques de granulosité (SSC) et de taille (FSC). Cela permet de visualiser une population à la granulosité et à la taille élevées, ainsi qu'une population de plus petite taille et d'une granulosité inférieure. La première population est composée majoritairement des globules rouges et des globules blancs, la seconde représente les plaquettes. Par ailleurs, les plaquettes matures conservent l'expression du CD41 à leur surface, ce qui permet de les distinguer des autres éléments macroparticulaires du sang.

Pour valider notre expérience et vérifier l'efficacité de la prise de greffe, nous avons d'abord analysé le sang des souris transplantées avec de la MO totale de souris contrôle Gfi1b<sup>GFP/+</sup> et Gfi1b<sup>GFP/flox</sup>. Les plaquettes sont sélectionnées par le FSC/SSC, ainsi que l'expression du CD41. Notre analyse montre que une partie des plaquettes exprime la GFP (GFP<sup>+</sup>) dans les souris receveuses (Figure 13). On peut cependant noter que, tel qu'attendu, la fréquence et le nombre absolu de plaquettes GFP<sup>+</sup> sont diminués chez les souris transplantées avec la MO de souris RosaCre<sup>+</sup> Gfi1b<sup>GFP/flox</sup>. La présence de plaquettes GFP<sup>+</sup> nous permet donc de conclure que les cellules GFI1b KO sont bien capables de reconstitution à long terme.



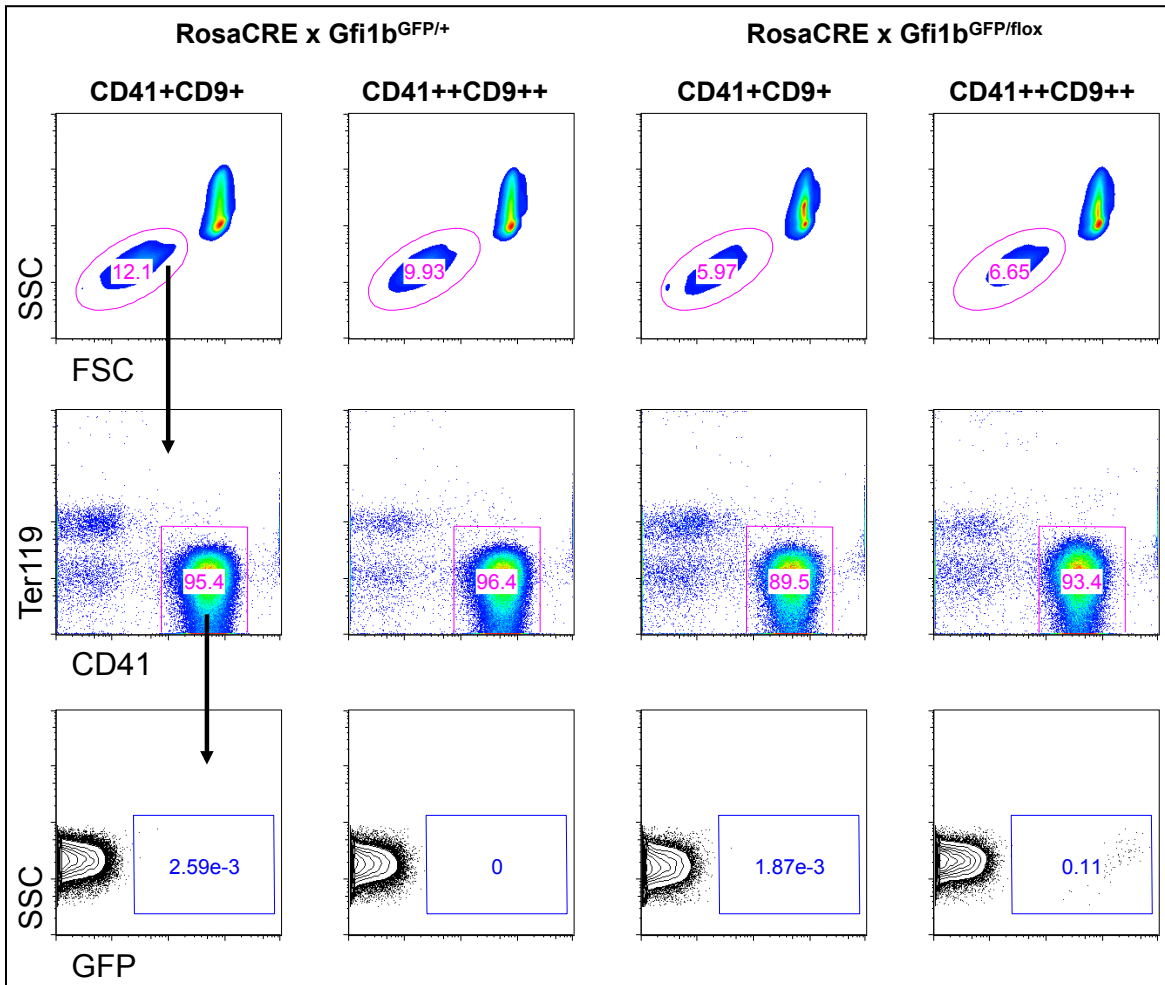
**Figure 13 : Analyse par cytométrie en flux des plaquettes sanguines des souris receveuses CD45.1**

Analyse sanguines des souris receveuses 16 semaines après transplantations avec des cellules de moelle osseuse totale de souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/+</sup> (souris contrôle, colonne gauche), et Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/flox</sup> (KO, colonne droite). Le FSC et SSC sont présentés en échelle logarithmique pour visualiser les plaquettes. Celles-ci sont sélectionnées par un FSC et SSC faibles, et l'expression du CD41. Les plaquettes provenant des souris de type sauvage et KO peuvent être identifiées par l'expression de la GFP.

L'analyse sanguine des souris CD45.1 montre que seize semaines après transplantation aucune plaquette GFP<sup>+</sup> n'est détectable dans le sang (Figure 14). Seule une souris receveuse CD45.1 du groupe transplanté avec des cellules CD41<sup>++</sup>CD9<sup>++</sup> Gfi1b KO montrait une très faible proportion de plaquettes GFP<sup>+</sup>.

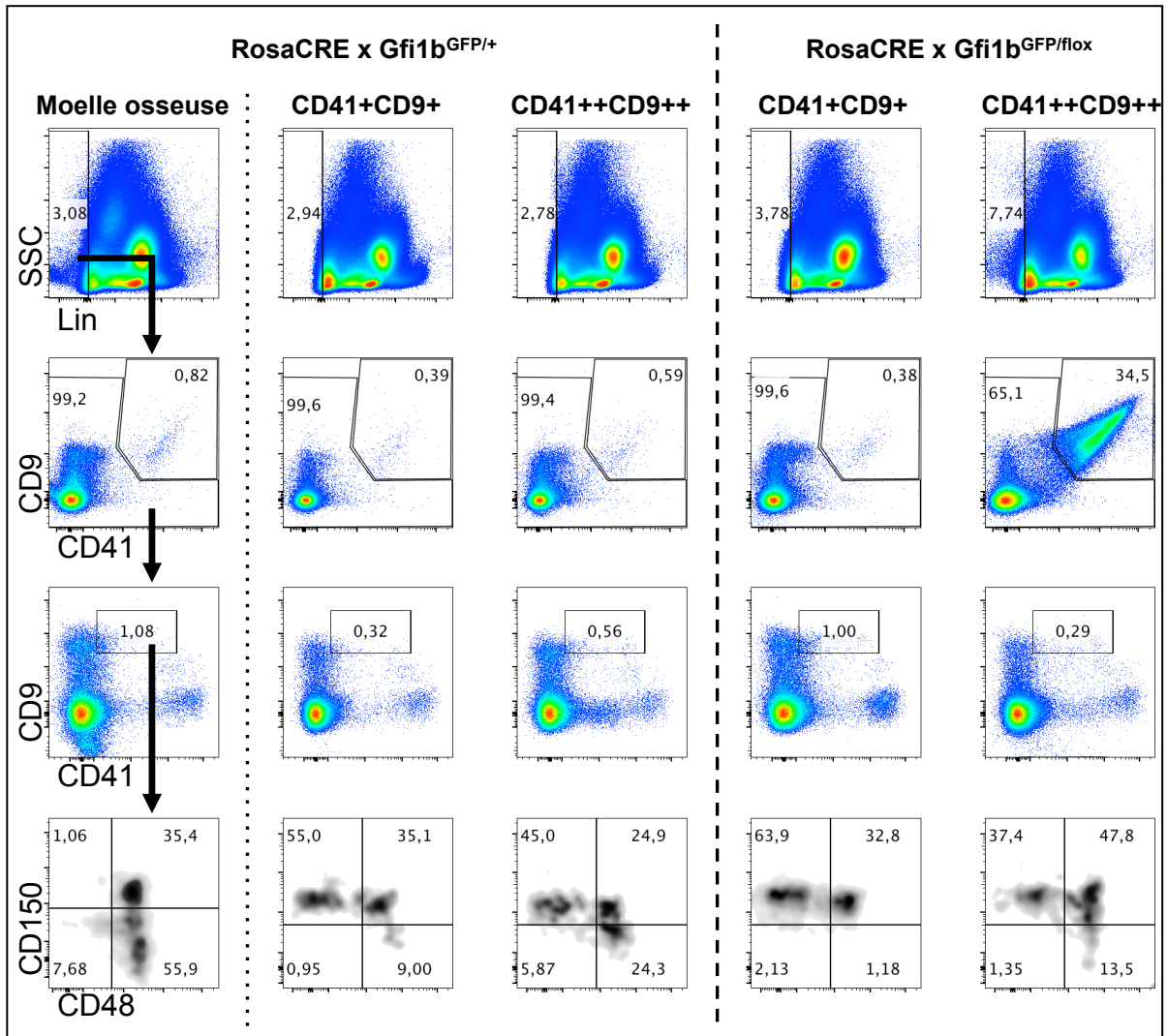
Nous avons par la suite sacrifié les souris pour analyser le compartiment médullaire et la reconstitution des différentes lignées hématopoïétiques. De manière surprenante, nous avons constaté que les souris transplantées de chaque groupe présentaient une augmentation des CSH. Cependant, ces CSH n'exprimaient ni la GFP, ni le CD45.2, démontrant ainsi qu'elles ne sont pas descendantes des cellules CD41<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> RosaCre<sup>+</sup> Gfi1b<sup>GFP/+</sup> (WT) ni des cellules CD41<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> RosaCre<sup>+</sup> Gfi1b<sup>GFP/flox</sup> (KO) transplantées. Nous ne pouvons pas expliquer cette augmentation des CSH dans ce cas, si ce n'est par une réaction à l'irradiation puis à la transplantation (Figure 15).

Nos résultats suggèrent que, les populations de cellules CD9<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> et CD9<sup>++</sup> CD41<sup>++</sup> Gfi1b KO ou contrôle transplantées ne contenaient pas de CSH capables de reconstituer la MO des souris receveuses à long terme, suggérant que la population double positive pour CD9 et CD41 serait uniquement constituée de mégacaryocytes. Cependant, puisque une souris transplantée avec des cellules CD41<sup>++</sup>CD9<sup>++</sup> RosaCre<sup>+</sup> Gfi1b<sup>GFP/flox</sup> (KO) présente des cellules souches, ainsi que des mégacaryocytes matures et des plaquettes GFP<sup>+</sup>, nous ne pouvons pas formellement exclure la possibilité que la population CD9 CD41 double positive chez la souris KO, soit hétérogène et contienne un mélange de mégacaryocytes matures et potentiellement de rare CSH.



**Figure 14 : Analyse par cytométrie en flux des plaquettes sanguines des souris receveuses CD45.1**

Analyse 16 semaines après transplantations du sang des souris CD45.1 avec les cellules CD41<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup> ou CD41<sup>++</sup>CD9<sup>++</sup> des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/+</sup> (souris contrôle, colonne gauche), et les cellules Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/flox</sup> (KO, colonne droite). Les plaquettes sont sélectionnées avec un FSC et SSC faible en échelle logarithmique et positive pour le CD41. Les plaquettes qui viennent des souris donneuses de type sauvage et KO sont identifiées grâce à l'expression de la GFP.



**Figure 15 : Analyse de la moelle osseuse des souris receveuses CD45.1 par cytométrie en flux**

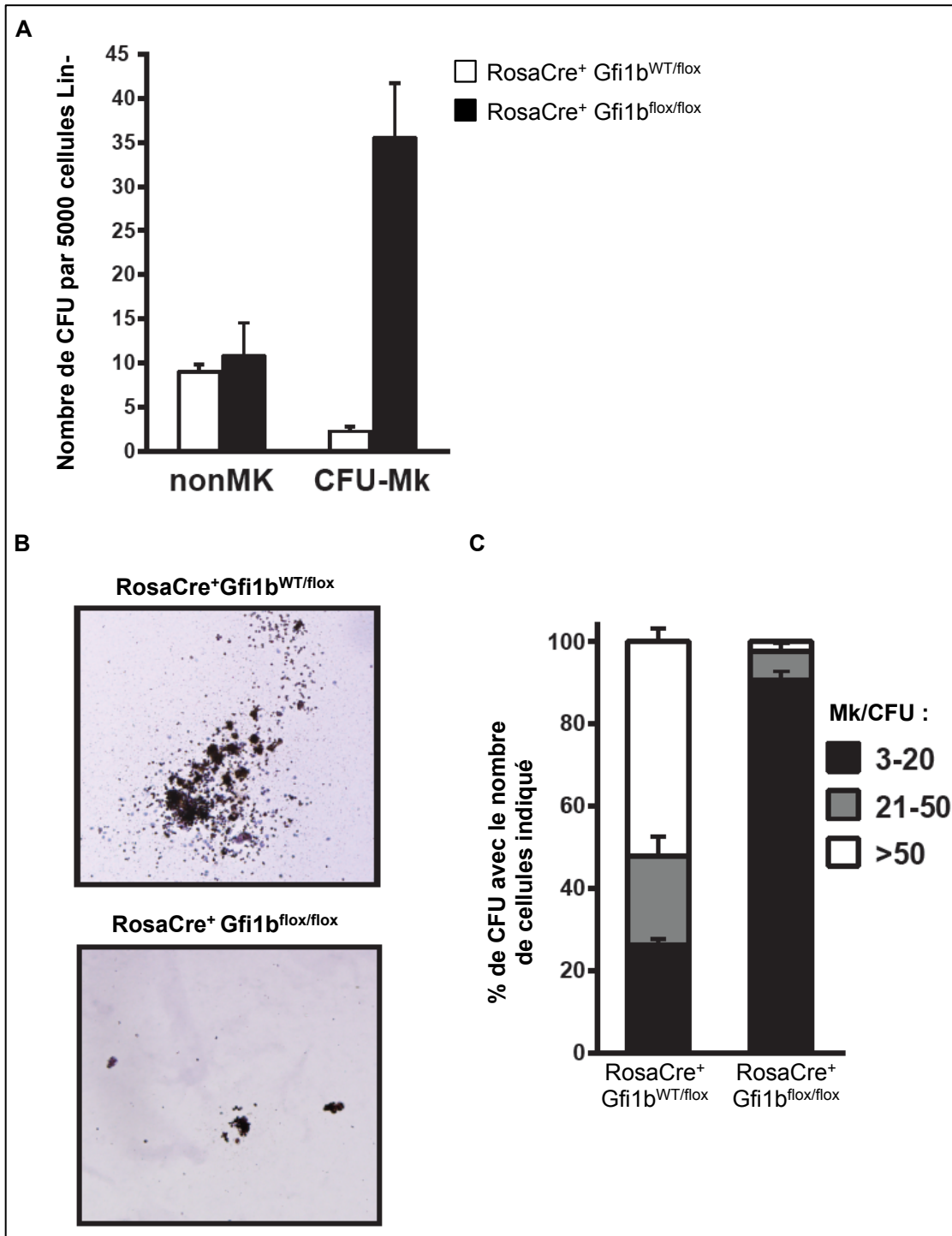
16 semaines après transplantations avec des cellules de moelle osseuse totale de souris, la moelle osseuse des souris transplantées a été analysée pour la présence de CSH. Premièrement, les cellules lignage négatives sont sélectionnées afin d'exclure les cellules matures. Ensuite les mégacaryocytes sont exclus sur la base d'une expression élevée des marqueurs CD9 et CD41. Les CSH (LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>) sont ensuite analysées sur l'expression du CD150 et CD48 dans la population non CD9<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> double positive.



### **Essais clonogéniques en milieu collagène**

Afin de confirmer le résultat de l'expérience précédente, nous avons réalisé un essai clonogénique en milieu semi-solide. Ce test mesure la capacité des cellules à former des colonies en milieu semi-solides et permet ainsi de dénombrer et identifier les progéniteurs présents dans une population donnée. Pour cela, nous avons trié par cytométrie en flux la population mégacaryocytaire en expansion dans le KO et la population contrôle. Nous avons ensuite mis en culture ces cellules en milieu de type collagène.

Les essais clonogéniques en milieu collagène permettent notamment d'identifier les progéniteurs mégacaryocytaires appelés : BFU-Mk (Burst-Forming Unit Megakaryocyte) et CFU-Mk (Colony-Forming Unit Megakaryocyte). En effet, les CFU-Mk ne sont pas détectables dans les tests classiques en méthylcellulose. Nos résultats montrent une augmentation du nombre des colonies CFU-Mks avec les cellules provenant des souris  $Rosa26-Cre-ERT^+ \times Gfi1b^{flox/flox}$  (Figure 16A). À l'inverse, il n'y a aucune différence significative du nombre de colonies non-Mk, suggérant ainsi que les cellules en expansion après la délétion de *GFI1b* appartiennent bien à la lignée mégacaryocytaire et non au compartiment des CSH et PM. Par ailleurs, on observe que les colonies générées par les cellules KO sont de taille plus petite et contiennent moins de cellules (Figure 16B et C).



**Figure 16 : Essais clonogéniques en milieu collagène**

A) Nombre de colonies Mk et non-Mk par 5000 cellules Lin<sup>-</sup> de souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> (WT) ou Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> ensemencées sur milieu collagène B) Photos représentatives de CFU-Mk de cellules Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> (souris contrôle) ou Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> (KO) C) Analyse quantitative du nombre de cellules par colonies CFU-Mk Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> (souris contrôle) ou Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> (KO).

## Études des CSH sanguines chez la souris GFI1b KO

Dans une étude précédente notre équipe a montré que la délétion conditionnelle de GFI1b induit une expansion des CSH dans la MO et le sang périphérique des souris adultes. Dans la première partie de ce mémoire, je me suis intéressé à démontrer, à l'aide d'un modèle de délétion conditionnelle de GFI1b chez la souris adulte, que les cellules en expansion n'appartiennent pas au compartiment souche, mais en réalité au compartiment mégacaryocytaire. Dans la deuxième partie de ce mémoire, je vais me concentrer sur l'étude de l'effet de la délétion de GFI1b dans le sang périphérique.

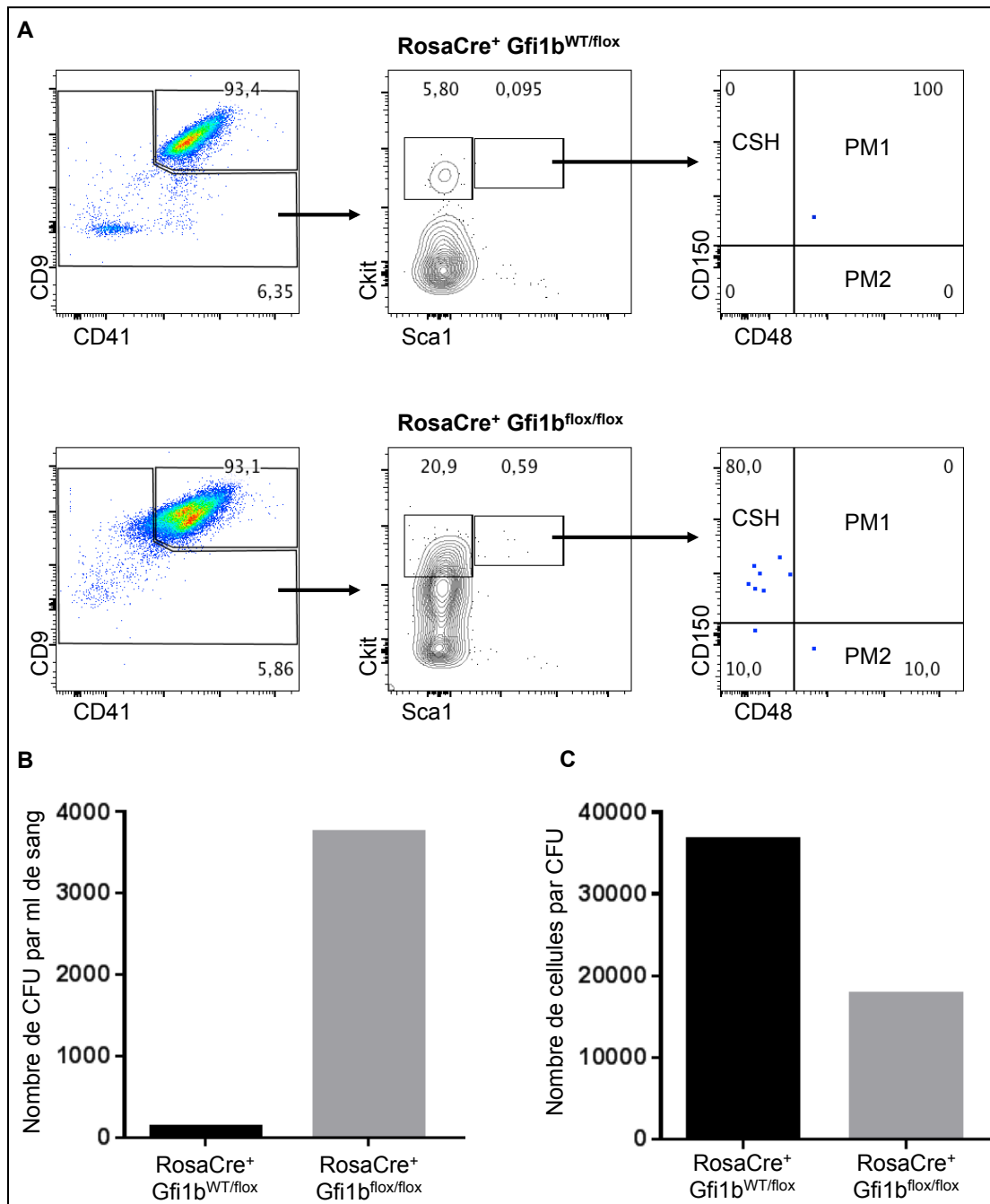
En conditions physiologiques des CSH et PM peuvent être retrouvées dans le sang périphérique. Le nombre de progéniteurs et CSH circulant est cependant très faible et de nombreux mécanismes, comme par exemple les signaux cytokiniques, contrôlent le retour de ces cellules dans la niche hématopoïétique. Ce phénomène est aussi appelé « nichage » (« homing » en anglais). Cependant, il est connu que, en situation pathologique, des progéniteurs peuvent circuler et coloniser des organes de l'hématopoïèse extra-médullaire. Parmi ces organes, on retrouve par exemple la rate, siège de l'érythropoïèse de stress chez la souris (Coulon et al., 2011), ou encore le foie et les poumons, qui peuvent être le lieu d'une mégacaryopoïèse secondaire chez l'humain comme la souris (Howell and Donahue, 1937; Machlus and Italiano, 2013; Xiao da et al., 2006). Ce sont ces mécanismes de « mobilisation » qui sont exploités pour enrichir en CSH et progéniteurs le sang périphérique des donneurs avant une greffe hématopoïétique (Asada et al., 2013; Greenbaum et al., 2013; Kollet et al., 2006). La compréhension de ces phénomènes de « mobilisation » d'une part et de « nichage » d'autre part est donc essentielle à l'amélioration de ces transplantations. De manière intéressante, il a été montré que la présence dans le sang de ces cellules pourrait suivre un rythme circadien (Lasky et al., 1983; Mendez-Ferrer et al., 2008) mais, de nombreux mécanismes impliqués dans la régulation de la mobilisation des CSH et progéniteurs hématopoïétiques dans le sang demeurent inconnus.

### **Expansion des CSH dans le sang des souris GFI1b KO**

Afin d'étudier l'effet de la délétion de GFI1b dans les CSH et progéniteurs du sang périphérique des souris adulte, nous avons sacrifié les souris deux mois après injection avec le tamoxifène et prélevé le sang par ponction intracardiaque. Ensuite, pour éviter une éventuelle contamination par des mégacaryocytes circulants et les plaquettes sanguines, nous avons appliqué la même stratégie de sélection que celle utilisée pour l'analyse de la MO. Ainsi, nous avons exclu les cellules  $\text{Lin}^- \text{CD9}^+ \text{CD41}^+$  avant d'analyser le profil LSK et les CSH. L'analyse montre alors que le profil LSK sanguin des souris KO diffère de celui des souris contrôles. Tout d'abord, comme pour la MO, on observe une forte augmentation du nombre de cellules LK. Cependant, contrairement à la moelle osseuse, les souris GFI1b KO présentent également une augmentation des CSH circulantes ( $\text{LSK} \text{CD48}^- \text{CD150}^+$ ) en comparaison aux souris contrôles (Figure 17A).

Néanmoins, comme pour la MO, l'analyse par cytométrie en flux ne permet pas de caractériser avec certitude le potentiel souche de cette population. Pour cela, nous avons réalisé des tests fonctionnels *in vitro*. Après lyse des globules rouges, nous avons mis en culture un volume connu de sang en méthylcellulose et dénombré après 7 jours le nombre de colonies. Cette technique permet de dénombrer le nombre de CFU, c'est à dire le nombre d'« unités » capables de former des colonies par ml de sang. L'expérience a montré une très forte augmentation du nombre de CFU dans les souris KO (Figure 17B). Les colonies formées étaient de plus petites tailles et contenaient moins de cellules. On peut cependant supposer que cette diminution en taille et en nombre de cellules était due à un envahissement de la méthylcellulose par les colonies devenues trop nombreuses. De plus grandes dilutions du volume de sang mis en culture tendent en effet à diminuer cette différence entre les colonies contrôles et KO.

L'ensemble de ces résultats suggèrent une augmentation des CSH et progéniteurs dans le sang périphérique des souris KO. La mesure du potentiel de reconstitution à long terme de cellules sanguines par transplantation est cependant nécessaire afin de pouvoir l'affirmer.

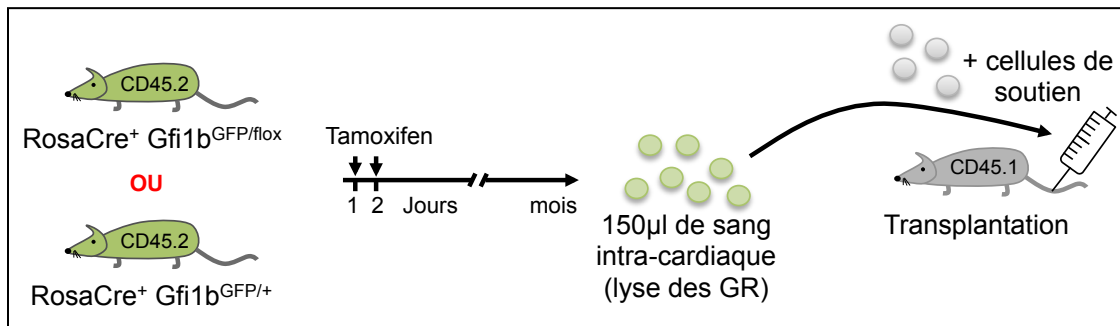


**Figure 17 : Effet de la délétion conditionnelle de GFI1b sur les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques dans le sang périphérique**

**A)** Profils de cytométrie permettant d'identifier les CSH, PM1 et PM2 dans les souris contrôles (panel du haut) et les souris KO (panel du bas). Les CSH ont été identifiées comme CD9<sup>faible</sup>CD41<sup>faible</sup>c-kit<sup>+</sup>sca1<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>. (n=1) **B)** Nombres de colonies identifiées lors du test clonogénique après dépôt de sang provenant de souris contrôles (en noir) et de souris KO (en gris). Histogramme représentatif de 3 expériences indépendantes **C)** Nombre de cellules dans les colonies formées à partir de cellules du sang provenant des souris contrôles (en noir) et de souris KO (en gris). Histogramme représentatif de 3 expériences indépendantes.

## Transplantations des progéniteurs sanguins

L'analyse par cytométrie en flux a montré que les souris  $RosaCre^+ Gfi1b^{flox/flox}$  présentent après injection de tamoxifène une augmentation des CSH dans le sang périphérique. De plus, des tests clonogéniques en méthylcellulose ont confirmé la présence de cellules progénitrices capables de former des colonies dans le sang des souris KO. Afin de confirmer le potentiel souche de ces cellules sanguines en expansion après la délétion de  $Gfi1b$ , nous avons cherché à mesurer, par transplantation, le potentiel de reconstitution à long terme de cette population (Figure 18). Comme pour l'expérience avec la MO, nous avons utilisé des souris  $Gfi1b^{GFP/+}$  et  $Gfi1b^{GFP/flox}$  exprimant le CD45.2.



### Figure 18 : Transplantation de cellules sanguines

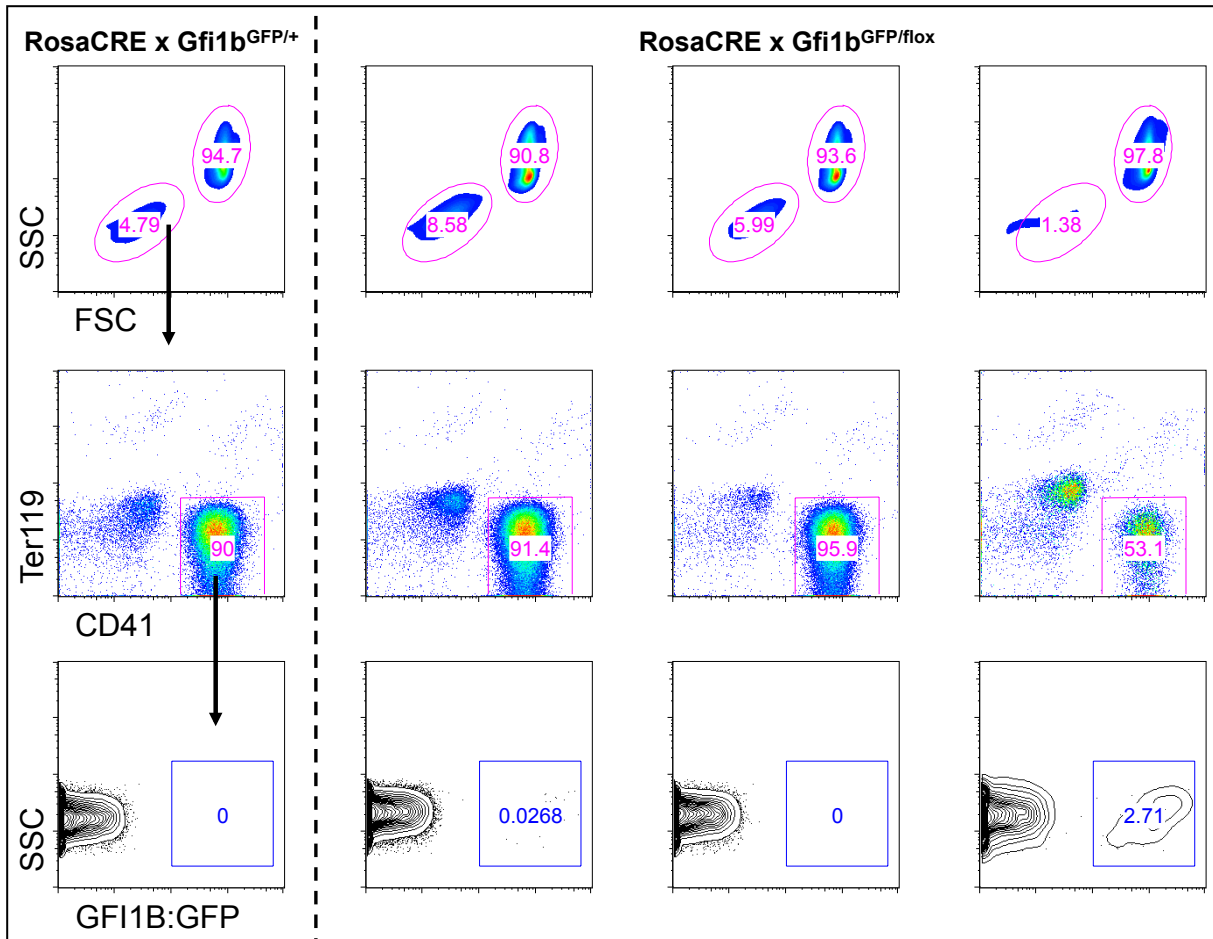
A) Après lyse des globules rouges, 150 µl de sang de souris  $CD45.2 Rosa26-Cre-ERT^+ \times Gfi1b^{GFP/+}$  (WT) ou  $Rosa26-Cre-ERT^+ \times Gfi1b^{GFP/flox}$  (KO), ainsi que des cellules de soutien  $CD45.1$  sont injectées chez des souris receveuses  $CD45.1$  après irradiation

Quatre souris  $CD45.1$  ont été transplantées dans la cohorte contrôle et quatre dans la cohorte KO. Parmi les souris transplantées avec des cellules sanguines de souris  $RosaCre^+ Gfi1b^{GFP/+}$  (WT), trois sont décédées avant l'analyse malgré l'addition de cellules de soutien lors de la transplantation. En revanche, toutes les souris transplantées avec des cellules sanguines de souris  $RosaCre^+ Gfi1b^{GFP/flox}$  (KO) ont survécu jusqu'à seize semaines après transplantations, nous permettant ainsi une analyse de la reconstitution à long terme par les CSH et progéniteurs sanguins. L'analyse sanguine des souris  $CD45.1$  montre que seize semaines après transplantations aucune plaquette  $GFP^+$  n'était détectable dans le sang de la souris transplantée avec des cellules sanguines de souris  $RosaCre^+ Gfi1b^{GFP/+}$  (Figure 19). Dans le groupe de souris transplantées avec des cellules sanguines de souris  $RosaCre^+ Gfi1b^{GFP/flox}$  (KO), deux souris montraient une faible proportion de plaquettes  $GFP^+$

(Figure 19) et deux ne présentent aucune cellule GFP<sup>+</sup> (Figure 19). La demi-vie des plaquettes murines dans le sang est de quelques jours, la persistance de plaquettes GFP<sup>+</sup> présentes dans l'échantillon d'origines est donc peu probable. La présence de ces cellules dans le sang des souris receveuses suggère donc une reconstitution à long terme, au moins du compartiment des mégacaryocytes par des cellules GFI1b KO. Nous avons montré précédemment que la délétion de GFI1b n'est pas efficace dans la lignée érythroïde. Ainsi, la présence de globules rouges GFP<sup>+</sup> n'indique pas si des CSH KO pour GFI1b étaient bien présentes dans le sang des souris donneuses. Par ailleurs, seule une partie des globules blancs expriment GFI1b et donc la GFP. Nous avons cependant pu détecter un petit nombre de cellules CD45.2<sup>+</sup> et GFP<sup>+</sup> chez la souris receveuse avec le plus haut taux de plaquettes GFP<sup>+</sup> circulantes, suggérant également une reconstitution à long terme. En revanche, la survie d'une seule souris dans le groupe contrôle ne permet pas de réaliser une analyse quantitative comparative du nombre de CSH circulantes entre les souris de type sauvage et les souris GFI1b KO.

Afin d'examiner la reconstitution de l'hématopoïèse médullaire, nous avons ensuite sacrifié les souris receveuses et analysé les CSH et progéniteurs, ainsi que les mégacaryocytes.

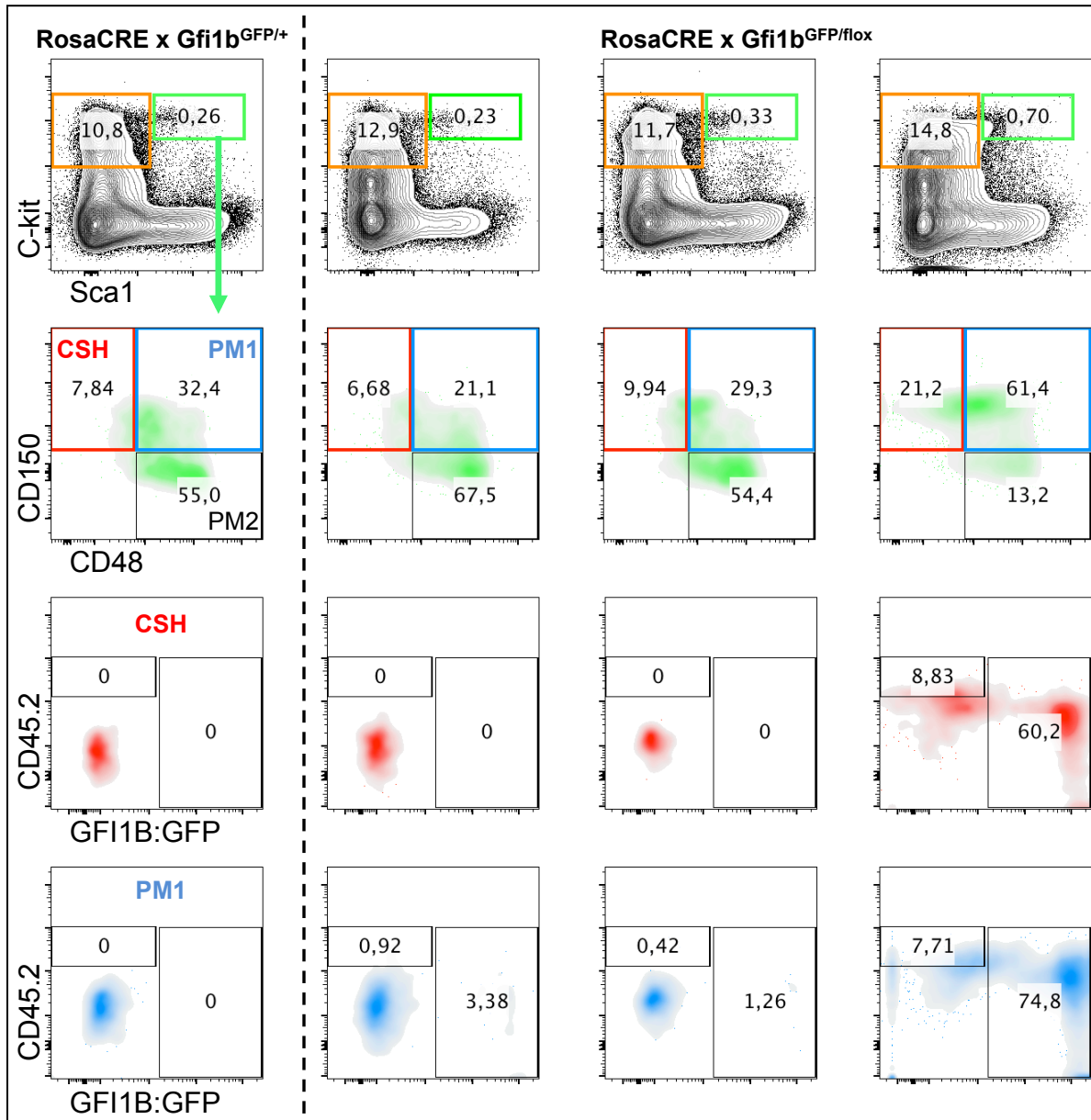
Comme attendu, nous n'avons retrouvé ni de CSH ni de progéniteurs exprimant la GFP ou le CD45.2 dans la MO de la souris survivante du groupe contrôle (Figure 20). Cependant, de manière intéressante, nous avons retrouvé un grand nombre de CSH et PM1 exprimant ces marqueurs chez une des souris du groupe KO suggérant ainsi la présence de CSH dans le sang de la souris GFI1b KO donneuse (Figure 20). Chez les deux autres souris du groupe KO, nous n'avons pas observé de CSH CD45.2<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup>. Toutefois, une faible proportion des PM était GFP<sup>+</sup>. La présence de ces progéniteurs précoces nous permet de supposer une reconstitution de l'hématopoïèse à long terme par un très petit contingent de CSH indétectables par cytométrie en flux. Par ailleurs, l'ensemble des souris du groupe transplanté avec du sang de souris GFI1b KO présente des progéniteurs mégacaryocytaires CD45.2<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> ou GFP<sup>+</sup> uniquement (Figure 21). Enfin, les souris transplantées avec des cellules sanguines KO pour GFI1b montrent également une reconstitution de la lignée B par des cellules CD45.2<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> ou GFP<sup>+</sup>, confirmant ainsi la présence de CSH fonctionnelles dans le sang des souris KO (Figure 22).



**Figure 19 : Analyse par cytométrie en flux des plaquettes sanguines des souris receveuses CD45.1**

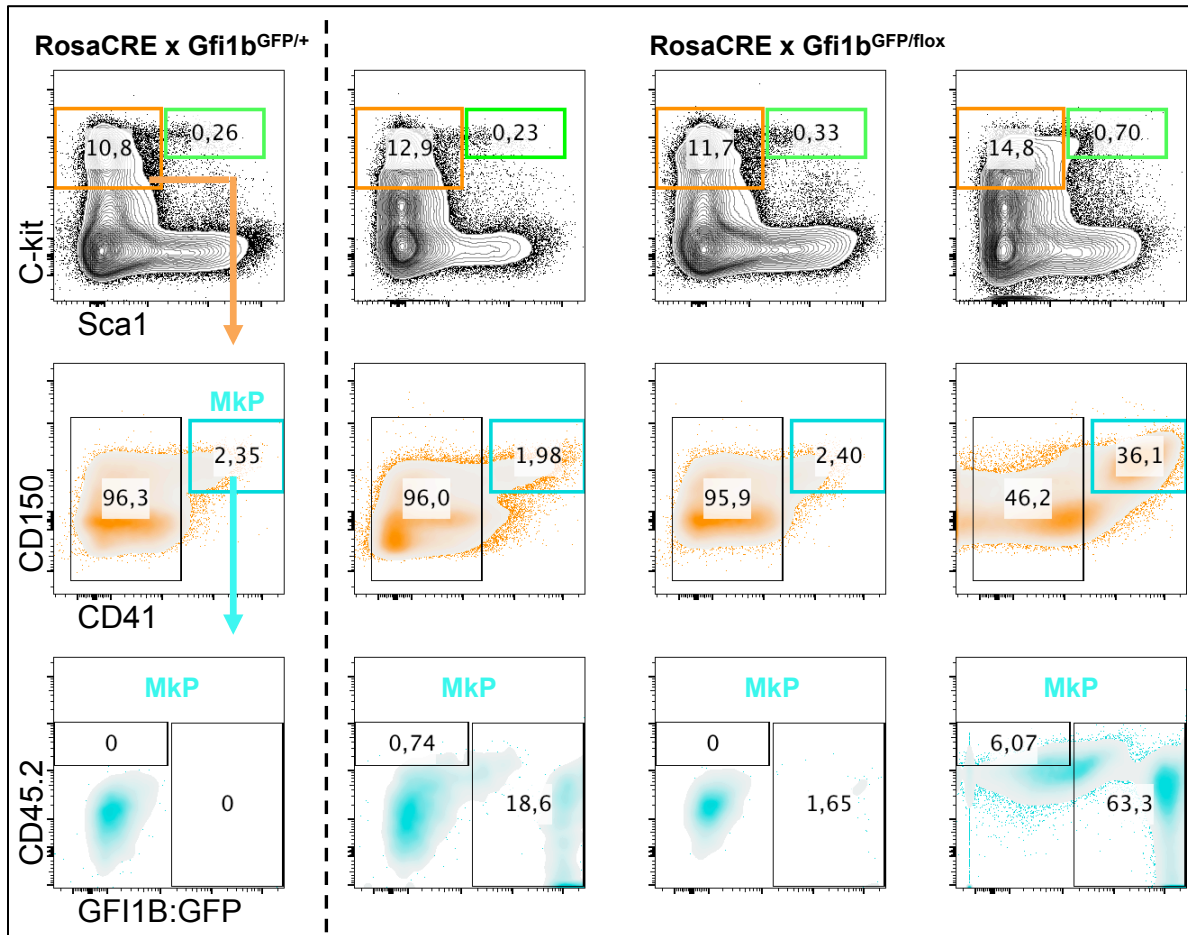
16 semaines après transplantation, du sang des souris CD45.1 est prélevé et analysé pour comparer les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/+</sup> (souris contrôle, colonne de gauche), et les cellules Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/flox</sup> (KO, colonnes de droite). Le FSC et SSC sont présentés en échelle logarithmique pour visualiser les plaquettes.





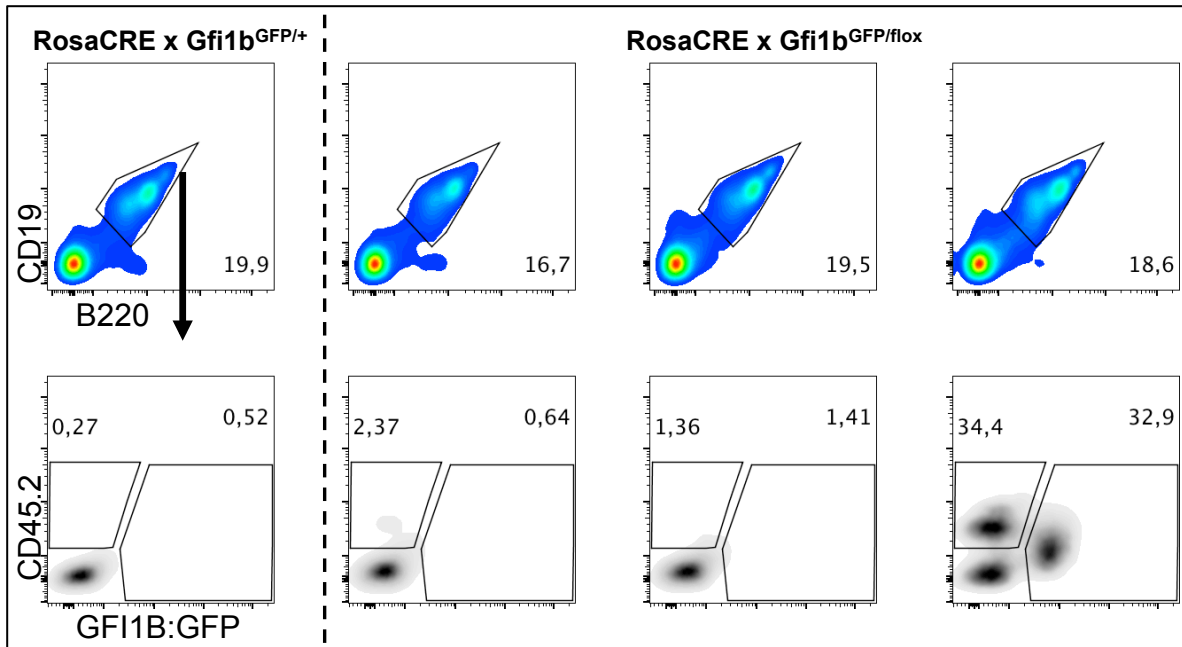
**Figure 20 : Analyse des CSH chez les souris receveuses CD45.1**

Analyse comparative par cytométrie en flux des CSH et PM de la moelle osseuse des souris receveuses 16 semaines après transplantation avec les cellules sanguines des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/+</sup> (souris contrôle, colonne de gauche), et les cellules Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/flox</sup> (KO, colonnes de droite).



**Figure 21 : Analyse des progéniteurs mégacaryocytaires chez les souris receveuses CD45.1**

Analyse comparative par cytométrie en flux des MkP de la moelle osseuse des souris receveuses 16 semaines après transplantation avec les cellules sanguines des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/+</sup> (souris contrôle, colonne de gauche), et les cellules Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/flox</sup> (KO, colonnes de droite).



**Figure 22 : Analyse des lymphocytes B matures chez les souris receveuses CD45.1**

Analyse comparative par cytométrie en flux des cellules B de la moelle osseuse des souris receveuses 16 semaines après transplantation avec les cellules sanguines des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/+</sup> (souris contrôle, colonne de gauche), et les cellules Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/flox</sup> (KO, colonnes de droite).

L'ensemble de ces résultats suggère fortement la présence des CSH GFI1b KO dans le sang des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>GFP/flox</sup>. Toutefois, cette hypothèse reste à confirmer en reproduisant ces expériences avec des cohortes plus importantes et également en faisant varier la quantité de cellules sanguines transplantées pour réellement quantifier le nombre de CSH circulantes et évaluer l'augmentation face aux souris contrôles. En parallèle de ces résultats préliminaires, nous avons également débuté l'étude du rôle de GFI1b dans les mécanismes de régulation de la mobilisation des CSH dans le sang périphérique.

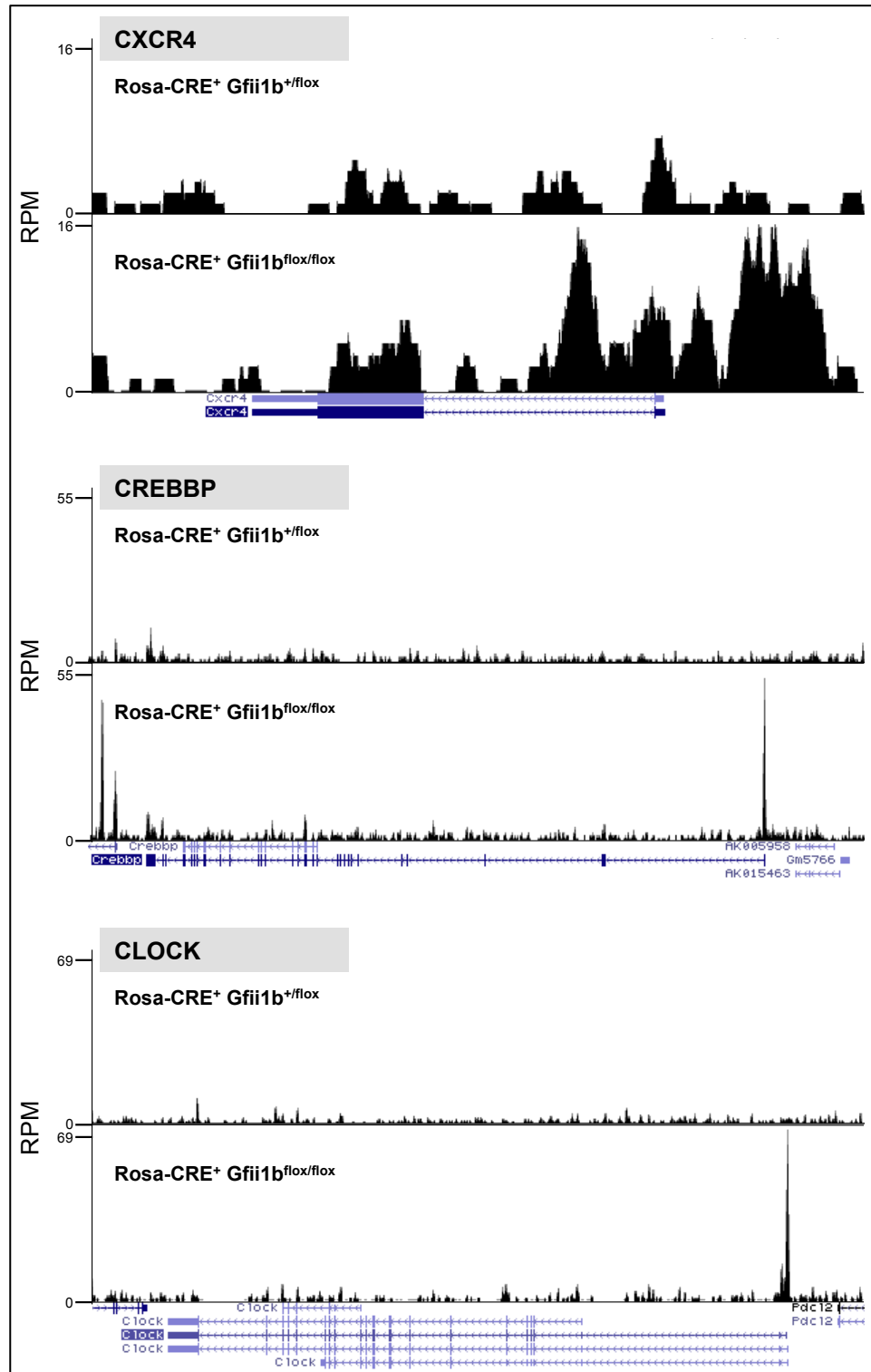
### **Régulation de la mobilisation des CSH et Mk par Gfi1b**

Plusieurs facteurs peuvent réguler la mobilisation des CSH dans le sang ou leur retour dans la MO, notamment les cellules de la niche hématopoïétique (Asada et al., 2013; Kollet et al., 2006), ainsi que les chimiokines, comme CXCL12 (Greenbaum et al., 2013). Il a également été montré que les variations de lumière au cours du cycle circadien peuvent influencer directement sur la mobilisation des CSH *via* la sécrétion de noradrénaline par le système nerveux sympathique (Mendez-Ferrer et al., 2008). Nous nous sommes donc intéressés au rôle de GFI1b dans la régulation de gènes des molécules d'adhésion, ainsi que des protéines impliquées dans le cycle circadien.

Dans un premier temps, nous avons analysé des données de ChIP-seq de GFI1b réalisées dans une lignée de cellules dérivées de progéniteurs multipotents de souris, la lignée HPC7 (Pinto do et al., 2001). Nous avons trouvé que GFI1b se liait notamment au locus de *Cxcr4*, le récepteur de CXCL12, mais également aux gènes *Clock* et *Crebbp*, qui sont des régulateurs clés du cycle circadien (Curtis et al., 2014) (Figure 23).

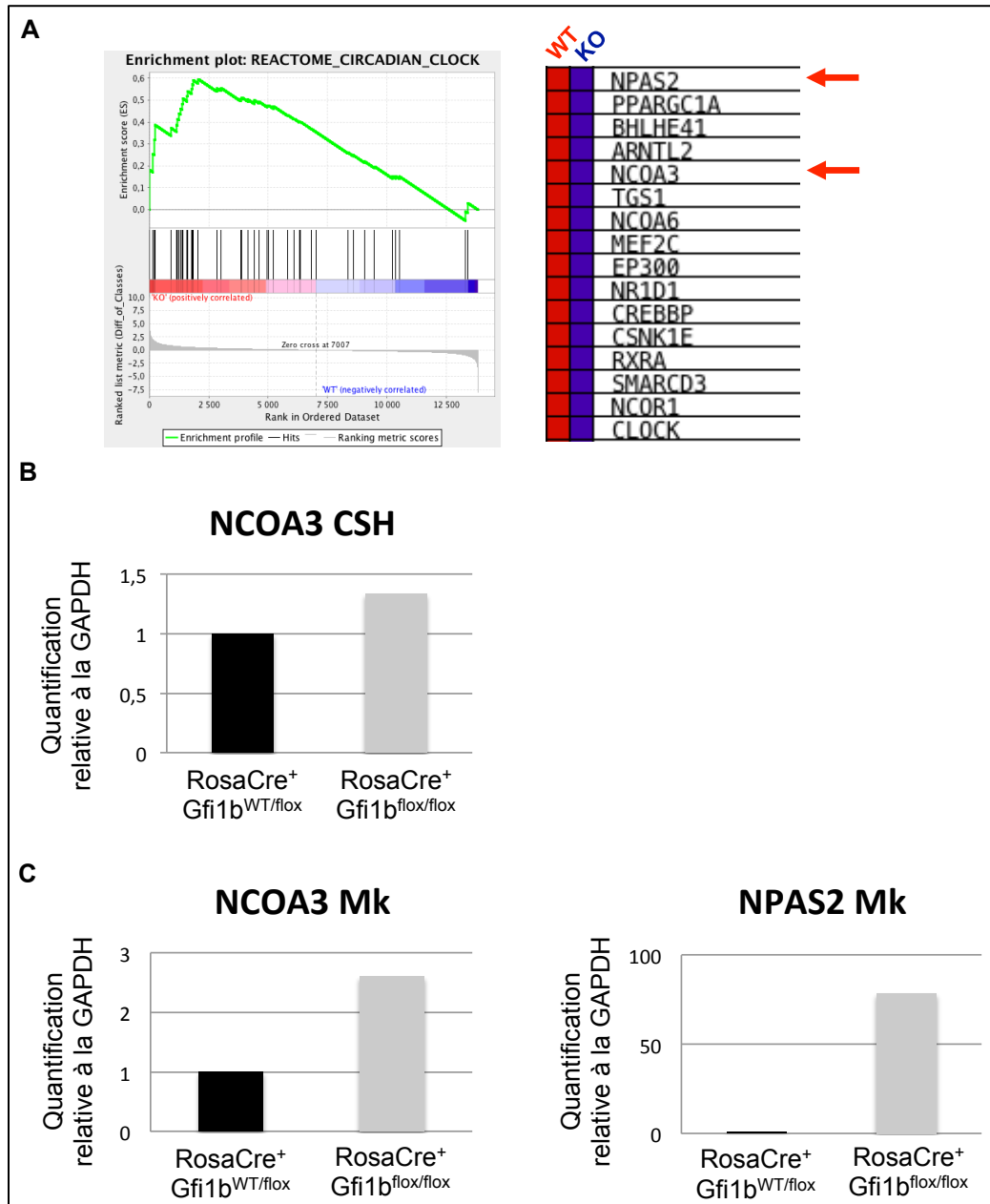
Notre laboratoire a également réalisé un RNA-Seq comparant des Mk de souris contrôles avec des CSH GFI1b KO. L'analyse de ces données par *Gene Set Enrichment* (GSEA) confirme qu'en absence de GFI1b, de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle circadien sont régulés à la hausse (Figure 24A). De plus, les gènes *Clock* et *Crebbp*, pour lesquels nous avons trouvé un pic de liaison de GFI1b par ChIP-Seq, sont également régulés à la hausse dans nos données de RNA-Seq. Ainsi, ces résultats suggèrent un rôle de GFI1b dans l'inhibition de la transcription de ces gènes du cycle circadien dans les CSH et progéniteurs. Par la suite, nous avons cherché à confirmer les résultats observés en RNA-Seq par RT-qPCR. De manière surprenante et inattendue, nous avons observé que le gène *Ncoa3*,

également impliqué dans la régulation du cycle circadien (Curtis et al., 2014), était régulé à la hausse dans les mégacaryocytes, mais pas dans les CSH GFI1b KO (Figure 24B et C), laissant entrevoir une différence de régulation entre les deux types cellulaires. Par ailleurs le gène *Npas2* était fortement régulé à la hausse dans les Mk GFI1b KO, suggérant également une forte implication de GFI1b dans la régulation transcriptionnelle des gènes du cycle circadien dans ces cellules. Ces résultats préliminaires suggèrent donc une implication de GFI1b dans la régulation du cycle circadien qui pourrait influencer la mobilisation des CSH, mais également des Mk dans le sang périphérique.



**Figure 23 : Chip-Seq de la liaison de Gfii1b dans les cellules HPC7**

Analyse par [usegalaxy.org](http://usegalaxy.org) des données de Chip-Seq de GFII1b dans des cellules de moelle osseuse montrant la liaison de GFII1b au locus des gènes indiqués (*Cxcr4*, *Crebbp* et *Clock*).



**Figure 24 : Analyse de l'expression de gènes du cycle circadien dans les CSH et Mk**

**A)** Analyse par GSEA des données de RNA-Seq montrant un enrichissement des gènes contrôlant le cycle circadien et régulés à la hausse dans les CSH *Gfi1b* KO en comparaison au CSH contrôles (WT). La liste des 16 gènes dont l'expression est la plus forte est présentée à droite. **B)** Comparaison par RT-qPCR de l'expression de *Ncoa3* dans des CSH de souris contrôles (en noir) et de souris KO (en gris) et triées par cytométrie en flux. **C)** Comparaison par RT-qPCR de l'expression de *Ncoa3* (gauche) et *Npas2* (droite) dans des mégacaryocytes de souris contrôles (en noir) et de souris KO (en gris) et triés par cytométrie en flux.

## Discussion & Perspectives

### Expansion médullaire des CSH et progéniteurs mégacaryocytaires après la délétion conditionnelle de *GFI1b*

#### Résultats précédents et marquage « classique » des CSH

Grâce à un système de Cre inducible par le pIpC, notre équipe a précédemment démontré que la délétion conditionnelle de *GFI1b* induit une expansion des CSH dans la MO et le sang périphérique des souris adultes (Khandanpour et al., 2010). Cependant, dans ce modèle Cre-Lox, la délétion des allèles flox de *Gfi1b* est induite après l'activation de la Cre recombinase par l'interféron-alpha produit en réponse au pIpC. Nous avons donc choisi de reconduire cette étude dans un modèle non-inflammatoire afin d'en confirmer les résultats et d'élargir l'étude à d'autres lignées cellulaires. En effet, des études récentes montrent que l'inflammation peut par elle même avoir un effet sur la production de cellules mégacaryocytaires (Haas et al., 2015).

Dans ce travail, j'ai donc utilisé un second modèle de souris transgéniques pour une Cre recombinase inducible, la Rosa26-Cre-ERT. Chez les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> *Gfi1b*<sup>flox/flox</sup>, la délétion de *GFI1b* est induite par injection de tamoxifène et n'est pas létale. J'ai étudié l'effet à long terme de la délétion de *GFI1b* sur l'hématopoïèse et ainsi confirmé l'augmentation des CSH (LSK<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup>) et PM1 (LSK<sup>+</sup> CD48<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup>) dans la MO des souris KO, par rapport aux souris contrôles, selon le modèle classique d'étude des CSH. J'ai également remarqué que cette augmentation des CSH et progéniteurs s'accompagnait d'une augmentation de l'expression de marqueurs mégacaryocytaires CD9 et CD41 à la surface de ces mêmes cellules.

Comme lors de l'étude précédente de notre laboratoire, les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x *Gfi1b*<sup>flox/flox</sup> présentaient une forte diminution des plaquettes circulantes, suggérant un blocage de la maturation des mégacaryocytes. Par ailleurs, la population LK, qui contient entre autres les progéniteurs mégacaryocytaires (LK CD150<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup>) et les mégacaryocytes (LK CD9<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup>) apparaissait augmentée chez les souris KO. Sachant que *GFI1b* est fortement exprimé dans les cellules de la lignée mégacaryocytaire, nous nous sommes intéressés à cette lignée.



L'analyse par cytométrie en flux a alors démontré que les progéniteurs mégacaryocytaires (MkP), ainsi que les mégacaryocytes (Mk) étaient également fortement augmentés après la délétion de GFI1b dans les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup>.

### **Lignée érythroïde et globules rouges**

La population LK contient, en plus de la lignée mégacaryocytaire, les progéniteurs et précurseurs érythroïdes, ainsi que les progéniteurs granulo-monocytaires. Parmi ces cellules, GFI1b est indispensable au développement de la lignée érythroïdes et sa délétion au stade embryonnaire entraîne un arrêt de la production de globules rouges matures (Saleque et al., 2002). Nous n'observons cependant pas un tel phénomène dans notre modèle de délétion conditionnelle chez la souris adulte. En effet, contrairement à ce qui a été observé par *Khandanpour et al.* en 2010 (Khandanpour et al., 2010), le taux de globules rouges circulants n'est pas significativement diminué dans le groupe KO. De plus, nous avons montré que, à l'inverse de ce que nous observons dans le compartiment des mégacaryocytes, la délétion de GFI1b n'est pas efficace dans les progéniteurs érythroïdes. Ainsi, deux mois après injections de tamoxifène seule des cellules érythroïdes non délétées subsistent chez les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> et permettent la production de globules rouges matures. On peut supposer que tous les progéniteurs et précurseurs érythroïdes délétés après injection sont rapidement éliminés, alors qu'une fraction de progéniteurs dans laquelle la Cre n'a pas été activée persiste et est capable de se multiplier pour reconstituer l'ensemble du compartiment érythroïde et ainsi assurer la production de globules rouges matures.

Puisque *Khandanpour et al.* ne montrent pas l'efficacité de la délétion dans la lignée érythroïde et que l'anémie observée dans cette étude est limitée, on peut spéculer que celle-ci, comme dans notre modèle, est la conséquence des nombreux saignements internes suite à la baisse des plaquettes, et non pas le résultat de la délétion de GFI1b. Par ailleurs, ceci n'est pas en contradiction avec la forte augmentation des splénocytes décrite dans cette étude de 2010 et que l'on pourrait alors attribuer à une érythropoïèse de stress extra-médullaire en réponse aux saignements. De plus, cette augmentation des splénocytes est également retrouvée dans notre modèle (données non présentées et (Vassen et al., 2014)).

Dans une étude récente, Foudi et al. (Foudi et al., 2014) ont utilisé un autre modèle de délétion conditionnelle de GFI1b chez la souris adulte avec la MxCre. Les auteurs montrent

une diminution des plaquettes sanguines, mais également une baisse du taux d'hémoglobine dans leur modèle de souris GFI1b KO. De plus, les auteurs constatent que le développement de la lignée érythroïde est interrompu dans la MO au stade des progéniteurs bivalents (PEM), qui sont incapables de générer des cellules érythroïdes matures aussi bien *in vitro* que *in vivo*. Finalement, dans leur modèle, les souris KO meurent trois semaines après délétion, probablement des suites d'une anémie sévère. L'ensemble de leurs résultats confirme ainsi le rôle essentiel de GFI1b dans l'érythropoïèse précoce et qui avait déjà été observé chez l'embryon (Saleque et al., 2002; Vassen et al., 2014).

L'absence de délétion de GFI1b dans nos souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> permet leur survie et donc l'étude à long terme de l'effet dans les compartiments des CSH et des mégacaryocytes. Enfin, par l'absence de cellules érythroïdes GFI1b KO, nos résultats confirment de manière indirecte l'importance de GFI1b dans l'érythropoïèse.

### **Nouvelle stratégie de sélection des CSH par cytométrie en flux**

Deux mois après injection de tamoxifène, les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> présentent une forte augmentation de la fréquence et du nombre absolu des Mk et MkP en comparaison aux souris contrôles Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>+ / flox</sup>. Ces cellules expriment des marqueurs, comme CD9 et CD41, qui sont également retrouvés sur les CSH et progéniteurs multipotents. Par ailleurs, les MK et MkP sont retrouvées par cytométrie en flux dans la population LK, alors que les CSH et PM sont parmi les LSK. La limite entre ces deux populations est ténue et repose sur l'intensité d'expression du marqueur Sca1 qui peut varier d'une expérience à l'autre. En situation physiologique, les mégacaryocytes et leurs progéniteurs sont parmi les cellules les plus rares de la MO (Kim et al., 1998; Machlus and Italiano, 2013). Une contamination des LSK par des cellules mégacaryocytaires ayant conservé une expression détectable de Sca1 est donc négligeable. En revanche, dans notre modèle GFI1b KO, la forte prolifération des cellules mégacaryocytaires entraîne un changement morphologique de la population LK et nous avons émis l'hypothèse que cette population en expansion puisse contaminer le compartiment LSK et ainsi biaiser notre analyse des CSH chez la souris GFI1b KO. Nous avons donc ajouté une étape d'exclusion de l'ensemble des cellules Lin<sup>-</sup> CD9<sup>+</sup> CD41<sup>+</sup> avant de sélectionner les CSH dans le profil LSK. Notre analyse comprend donc uniquement la population des cellules doubles négatives, ainsi

que les cellules CD9 ou CD41 simples positives. Ceci nous a permis d'observer qu'après l'exclusion de ces cellules, le profil LSK des souris KO était semblable à un profil de souris de type sauvage. De plus, en excluant ainsi les cellules  $\text{Lin}^- \text{CD9}^+ \text{CD41}^+$ , la prolifération des CSH ( $\text{LSK}^- \text{CD48}^- \text{CD150}^+$ ) et PM ( $\text{LSK}^+ \text{CD48}^+ \text{CD150}^+$ ) chez la souris GFI1b KO est fortement réduite.

Par la suite, nous avons cherché à évaluer la présence de CSH dans la population  $\text{Lin}^- \text{CD9}^+ \text{CD41}^+$  que nous excluons. Nous avons été capable de démontrer par des tests fonctionnels en milieu semi-solide que ces cellules représentent majoritairement des progéniteurs mégacaryocytaires. En revanche, notre expérience de reconstitution à long terme montre une souris avec une prise de greffe hématopoïétique après transplantation de cellule  $\text{CD41}^{++} \text{CD9}^{++} \text{RosaCre}^+ \text{Gfi1b}^{\text{GFP/flox}}$ . Ainsi, si notre expérience montre que cette population n'est pas majoritairement constituée de CSH, nous ne pouvons pas formellement exclure la présence de cellules souches dans cette population. Il est donc nécessaire de déterminer à l'aide d'essais de reconstitution à long terme et clonogéniques le profil d'expression des marqueurs de surface des CSH GFI1b KO. Nous pourrions ainsi isoler et étudier cette population indépendamment des mégacaryocytes en expansion et déterminer si la délétion de GFI1b a bien un effet sur la fonction des CSH.

Enfin, il a déjà été démontré que les CSH qui expriment CD41 conservent leur capacité de reconstitution à long terme de l'hématopoïèse, mais ont un biais marqué vers le compartiment myéloïde et mégacaryo-érythrocytaire (Gekas and Graf, 2013). Il est ainsi, probable que l'expression de marqueurs tels que CD41 (ou CD9) sur les CSH des souris GFI1b KO indique un biais vers le compartiment mégacaryocytaire en réponse à la thrombopénie et l'accumulation de progéniteurs mégacaryocytaires incapables de produire des plaquettes.

### **Autre définition des CSH par cytométrie en flux**

Une étude de Karlsson *et al.* publiée dans *Cell Reports* en 2013 (Karlsson et al., 2013) propose que le CD9 soit un marqueur discriminant des CSH. Ainsi, l'expression de ce marqueur sur les cellules  $\text{LSK}^- \text{CD48}^-$  serait associée chez les souris à la capacité de reconstituer efficacement toutes les lignées hématopoïétiques. Les cellules  $\text{LSK}^- \text{CD48}^- \text{CD9}^+$  représenteraient la véritable population des CSH indépendamment de l'expression du CD150.

Alors que les cellules LSK CD48<sup>-</sup> CD9<sup>-</sup> ne seraient, en revanche, pas capables de reconstituer l'hématopoïèse à long terme.

Dans notre modèle de délétion conditionnelle de GFI1b chez la souris adulte, l'analyse de l'expression du CD9 dans la population LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>totale</sup> démontre une diminution des populations CD9 négatives (LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>-</sup> CD9<sup>-</sup> et LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup> CD9<sup>-</sup>), chez la souris KO. À l'inverse, les populations LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>-</sup> CD9<sup>+</sup> et LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>+</sup> CD9<sup>+</sup>, considérées comme des populations de cellules souches dans ce nouveau modèle d'analyse, sont augmentées lorsque GFI1b est absent. Ainsi, d'après l'étude de Karlsson *et al.*, (Karlsson et al., 2013) nos résultats suggèrent que la délétion conditionnelle de GFI1b dans les souris adultes entraîne bien une prolifération des CSH fonctionnelles. Cette prolifération est cependant moins importante que celle observée précédemment par notre équipe avec le marquage classique des CSH et s'accompagne également d'une forte prolifération des cellules de la lignée des mégacaryocytes, ainsi que d'un arrêt de la thrombopoïèse. Par ailleurs, il est connu que l'ensemble des cellules de la lignée des mégacaryocytes exprime CD9. L'augmentation des cellules CD9<sup>+</sup> pourrait donc n'être qu'une indication d'un biais des CSH vers ce compartiment et non pas une réelle augmentation des CSH fonctionnelles.

Afin de déterminer le potentiel souche des populations LSK CD48<sup>-</sup> CD150<sup>totale</sup> CD9<sup>+</sup> chez les souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup> (Gfi1b KO), il est indispensable de réaliser des tests fonctionnels en méthylcellulose pour des tests clonogéniques et des essais de reconstitution à long terme. Pour cela, chacune des quatre populations LSK CD48<sup>-</sup> définies par Karlsson *et al.* (Karlsson et al., 2013) selon leur expression du CD9 et CD150 devraient être triées par cytométrie en flux et étudiées indépendamment après délétion de GFI1b. Ces tests permettront de démontrer une augmentation des CSH si elle existe et également de déterminer si ces cellules CD9<sup>+</sup> ont un biais vers les mégacaryocytes.

## **Transplantations des cellules GFI1b KO**

### **Variation d'expression du CD45.2**

De manière surprenante, lors de nos expériences de transplantations, nous avons constaté à plusieurs reprises que certaines cellules GFP<sup>+</sup> étaient CD45.2<sup>-</sup> et cela de manière inversement proportionnelle à l'intensité de fluorescence de la GFP (Figure 20 et 21 et données non présentées). Nous n'avons cependant pas détecté de liaison spécifique de GFI1b au locus du gène *Ptprc* codant pour le CD45 et qui aurait pu expliquer un lien direct entre GFI1b et l'expression de ce marqueur de surface (données non présentées). A ce stade de l'étude et avec les données recueillies lors de l'expérience il n'est pas possible d'exclure formellement un défaut de l'anticorps dirigé contre le CD45.2 ou de son fluorochrome associé (BUV395). Il est donc essentiel de répéter cette expérience avec un anticorps CD45.2 issu d'un clone différent ou couplé à un autre fluorochrome. Il est également nécessaire d'inclure le CD45.1 au panel des antigènes étudiés afin de pouvoir procéder à l'exclusion de la population de soutien et ainsi confirmer l'origine des cellules observées.

### **Cellules souches sanguines**

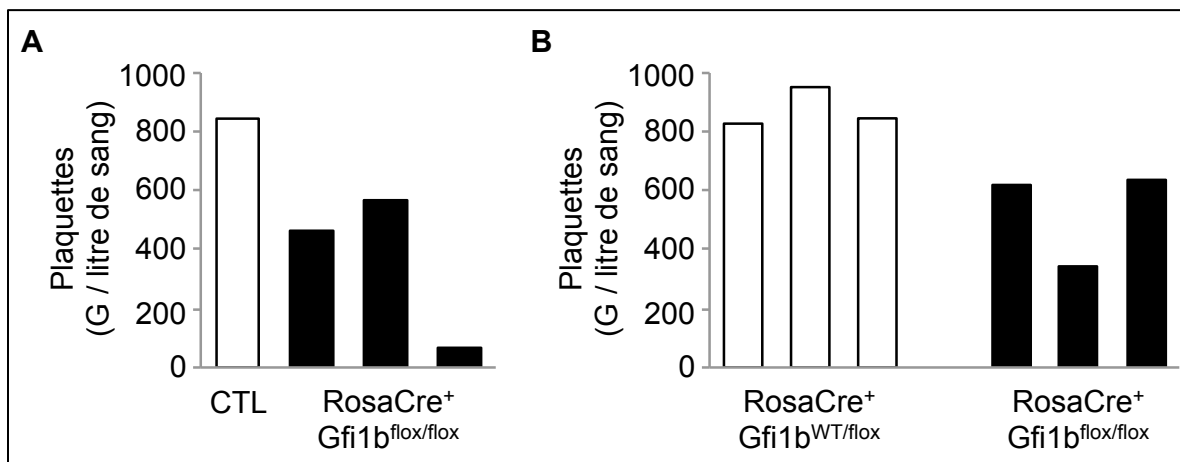
Nous avons transplanté 150 µl de sang total de souris contrôles ou GFI1b KO dans des souris receveuses irradiées létalement afin, dans un premier temps, de démontrer la présence de cellules souches fonctionnelles dans le sang de ces souris et, dans un second temps, d'évaluer l'augmentation des CSH circulantes chez la souris KO. Ultimement, notre expérience ne nous permet pas de mettre en évidence des CSH circulantes dans les souris contrôles. Celle-ci demande donc à être répétée avec un plus grand nombre d'animaux afin de pouvoir quantifier les CSH circulantes. En revanche, l'expérience montre bien une prise de greffe et une reconstitution de l'hématopoïèse à long terme chez 3 des 4 souris receveuses ayant été transplantées avec des cellules sanguines issues des souris GFI1b KO, confirmant ainsi la présence de CSH fonctionnelles dans le sang des souris GFI1b KO.

### **Reproduction du phénotype GFI1b KO par transplantation**

Lors des expériences de transplantation nous avons remarqué que les souris transplantées avec des cellules GFI1b KO avaient toujours un taux de plaquettes inférieur à la

norme, et ce malgré l'utilisation systématique de cellules de soutien issues de souris de type sauvage (Figure 25A et B). Par ailleurs, les souris montraient également une reproduction, au moins partielle, du phénotype d'expansion des mégacaryocytes lors de la prise de greffe. Ceci suggère que la prolifération de cette population est bien intrinsèque aux mégacaryocytes KO eux-mêmes et non au microenvironnement médullaire des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup>.

Par ailleurs, cette observation indique que l'expansion des mégacaryocytes GFI1b KO dans la MO des souris receveuses altère également la production de plaquettes par la population de mégacaryocytes CD45.1. Le mécanisme par lequel les mégacaryocytes GFI1b KO pourraient agir est cependant indéterminé. On peut supposer que la prolifération de ces cellules dans la MO perturbe la niche et le microenvironnement médullaire, limitant alors le développement des mégacaryocytes de type sauvage. Une autre hypothèse est la production par les cellules mégacaryocytaires GFI1b KO d'un ou plusieurs facteurs solubles limitant la croissance et/ou la maturation des autres mégacaryocytes.



**Figure 25 : Comparaison entre les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires**

**A)** Histogramme comparant les plaquettes sanguines totales chez les souris transplantées avec du sang de souris de type sauvage (blanc) et KO pour GFI1b (noir). **B)** Histogramme comparant les plaquettes sanguines totales chez les souris transplantées avec de la moelle osseuse totale de souris de type sauvage (blanc) et KO pour GFI1b (noir).

## Mobilisations des cellules Gfi1b KO dans le sang périphérique

### Présence de CSH GFI1b KO dans le sang périphérique

Nos résultats de cytométrie en flux, méthylcellulose, ainsi que la transplantation de cellules sanguines, montrent que des CSH GFI1b KO sont bien retrouvées dans le sang périphérique des souris Rosa26-Cre-ERT<sup>+</sup> x Gfi1b<sup>flox/flox</sup>. Ces cellules sont fonctionnelles et capable d'établir une reconstitution à long terme de l'hématopoïèse chez les souris receveuses et de reproduire le phénotype observé chez les souris GFI1b KO. L'augmentation du nombre de ces CSH circulantes par rapport aux souris de type sauvage reste encore à confirmer, notamment par des tests d'épuisement en méthylcellulose et par l'augmentation du nombre de souris transplantées dans les groupes contrôles et GFI1b KO.

### Régulation par GFI1b de la mobilisation des CSH et progéniteurs

Nous avons également montré que GFI1b pourrait être impliqué, par son rôle de régulateur transcriptionnel, dans la mobilisation des CSH. Ainsi, des données de ChIP-Seq de notre laboratoire montre que GFI1b se fixe à l'ADN au locus *Cxcr4*, un récepteur essentiel à la séquestration des CSH dans la MO (Broxmeyer et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré que la mobilisation des CSH peut suivre un cycle circadien (Mendez-Ferrer et al., 2008) et nos données montrent que GFI1b est retrouvé au locus de gènes essentiels du cycle circadien : *Clock* et *Crebbp*.

Enfin, de manière inattendue, nous avons montré que certains gènes impliqués dans les rythmes circadiens, *Npas2* (un partenaire de CLOCK) et *Ncoa3* sont régulés à la hausse dans les mégacaryocytes GFI1b KO de la MO. Il est intéressant de noter qu'en revanche, *Npas2* ne semble pas régulé à la hausse dans les CSH.

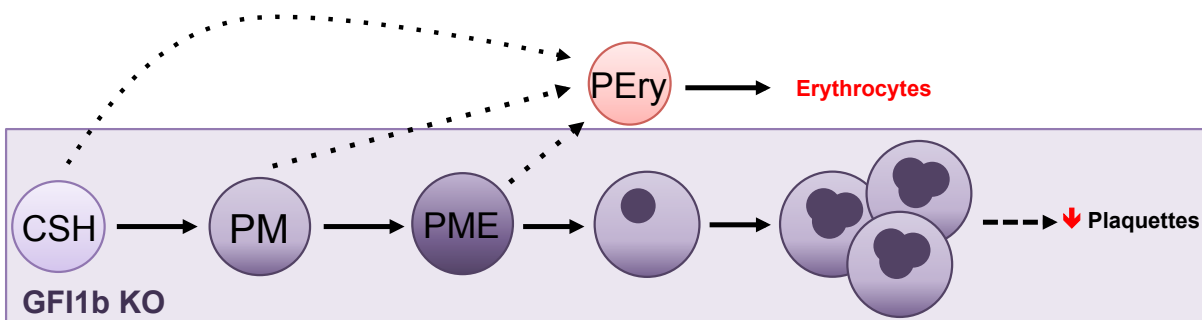
L'ensemble de ces résultats préliminaires ouvre de nombreuses perspectives pour la suite de ce travail. Tout d'abord, il serait intéressant de déterminer si la régulation des gènes du cycle circadien est différente entre les mégacaryocytes et les CSH GFI1b KO. Ensuite, il a été montré que les mégacaryocytes sont des acteurs importants du maintien de la quiescence des CSH dans la niche hématopoïétique (Bruns et al., 2014; Zhao et al., 2014). Sachant que les Mk sont en expansion dans les souris GFI1b KO et que l'expression de certains gènes potentiellement impliqués dans la régulation de la mobilisation des CSH est régulée à la

hausse dans cette population en expansion, nous pouvons spéculer que l'homéostasie de la niche médullaire est affectée dans les souris KO. Ainsi, la mobilisation des CSH dans le sang des souris KO pourrait être affectée en conséquence. Dans le futur, il conviendrait donc d'étudier séparément les populations de CSH et Mk et de tester dans chacune d'elles les niveaux d'expression d'un ensemble de gènes du cycle circadien, tels que *Clock* ou *Crebbp*, mais aussi de chimiokines telles que CXCL12 ou CXCL4. Par ailleurs, il a été montré que des Mk peuvent être libérés dans la circulation pour rejoindre des sites de thrombopoïèse secondaires, comme les poumons ou le foie. En revanche, il n'a jamais été montré que cette libération ou la production de plaquettes puisse suivre un cycle circadien.



## Conclusion

Dans ce travail, en utilisant un modèle de délétion conditionnelle par le RosaCre et grâce à une nouvelle des approche de sélection CSH par cytométrie en flux, nous avons montré que la délétion de GFI1b chez la souris induit une prolifération des mégacaryocytes, mais pas des CSH. Ceci est en contradiction avec un travail précédent de notre laboratoire, qui observait une prolifération des CSH dans la MO et le sang des souris GFI1b KO (Khandanpour et al., 2010). Cependant, nous avons confirmé l'observation antérieure de notre équipe en montrant avec ce modèle une forte thrombopénie chez les souris KO, suggérant ainsi que la production de plaquettes circulantes par les mégacaryocytes GFI1b KO est fortement diminuée.



Cette étude montre également la présence de CSH GFI1b KO dans le sang périphérique et que celles-ci sont bien fonctionnelles, car elles sont capables de générer des cellules matures, comme par exemple les lymphocytes B, après transplantation. De plus, nous avons constaté que le phénotype de prolifération des mégacaryocytes GFI1b KO peut être retrouvé chez les souris receveuses, indiquant ainsi que ce phénotype est bien intrinsèque aux mégacaryocytes eux-mêmes et n'est pas une réponse des cellules au tamoxifène, ni la conséquence du microenvironnement médullaire. De manière intéressante, nous avons également constaté que l'ensemble des souris transplantées avec des cellules GFI1b KO présentait une thrombopénie, suggérant que la prolifération de mégacaryocytes GFI1b KO peut affecter la thrombopoïèse des cellules de soutien par un mécanisme qui reste à identifier. Enfin, des études complémentaires doivent être réalisées pour expliquer la présence des CSH dans le sang des souris GFI1b KO.

## Bibliographie

- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* *11*, R106.
- Anguita, E., Villegas, A., Iborra, F., and Hernandez, A. (2010). GFI1B controls its own expression binding to multiple sites. *Haematologica* *95*, 36-46.
- Arai, F., Hirao, A., and Suda, T. (2005). Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. *International journal of hematology* *82*, 371-376.
- Ardlie, N.G., and Han, P. (1974). Enzymatic basis for platelet aggregation and release: the significance of the 'platelet atmosphere' and the relationship between platelet function and blood coagulation. *British journal of haematology* *26*, 331-356.
- Asada, N., Katayama, Y., Sato, M., Minagawa, K., Wakahashi, K., Kawano, H., Kawano, Y., Sada, A., Ikeda, K., Matsui, T., *et al.* (2013). Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell stem cell* *12*, 737-747.
- Baltzer, F. (1964). Theodor Boveri. *Science* *144*, 809-815.
- Bartley, T.D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y.S., Lu, H.S., Martin, F., Chang, M.S., Samal, B., Nichol, J.L., Swift, S., *et al.* (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* *77*, 1117-1124.
- Bhattacharya, D., Czechowicz, A., Ooi, A.G., Rossi, D.J., Bryder, D., and Weissman, I.L. (2009). Niche recycling through division-independent egress of hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine* *206*, 2837-2850.
- Boucheix, C., Benoit, P., Frachet, P., Billard, M., Worthington, R.E., Gagnon, J., and Uzan, G. (1991). Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *The Journal of biological chemistry* *266*, 117-122.
- Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., *et al.* (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *The Journal of experimental medicine* *201*, 1307-1318.
- Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M.P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A., *et al.* (2014). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nature medicine* *20*, 1315-1320.
- Calvi, L.M. (2006). Osteoblastic activation in the hematopoietic stem cell niche. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1068*, 477-488.
- Coulon, S., Dussiot, M., Grapton, D., Maciel, T.T., Wang, P.H., Callens, C., Tiwari, M.K., Agarwal, S., Fricot, A., Vandekerckhove, J., *et al.* (2011). Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia. *Nature medicine* *17*, 1456-1465.
- Curtis, A.M., Bellet, M.M., Sassone-Corsi, P., and O'Neill, L.A. (2014). Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* *40*, 178-186.

de Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., Kuang, W.J., *et al.* (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* *369*, 533-538.

Desterke, C., Martinaud, C., Guerton, B., Pieri, L., Bogani, C., Clay, D., Torossian, F., Lataillade, J.J., Hasselbach, H.C., Gisslinger, H., *et al.* (2015). Tetraspanin CD9 participates in dysmegakaryopoiesis and stromal interactions in primary myelofibrosis. *Haematologica* *100*, 757-767.

Elmaagacli, A.H., Koldehoff, M., Zakrzewski, J.L., Steckel, N.K., Ottinger, H., and Beelen, D.W. (2007). Growth factor-independent 1B gene (GFI1B) is overexpressed in erythropoietic and megakaryocytic malignancies and increases their proliferation rate. *British journal of haematology* *136*, 212-219.

Fiolka, K., Hertzano, R., Vassen, L., Zeng, H., Hermesh, O., Avraham, K.B., Duhrsen, U., and Moroy, T. (2006). Gfi1 and Gfi1b act equivalently in haematopoiesis, but have distinct, non-overlapping functions in inner ear development. *EMBO reports* *7*, 326-333.

Fliedner, T.M., Graessle, D., Paulsen, C., and Reimers, K. (2002). Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* *17*, 405-426.

Foudi, A., Kramer, D.J., Qin, J., Ye, D., Behlich, A.S., Mordecai, S., Preffer, F.I., Amzallag, A., Ramaswamy, S., Hochedlinger, K., *et al.* (2014). Distinct, strict requirements for Gfi-1b in adult bone marrow red cell and platelet generation. *The Journal of experimental medicine* *211*, 909-927.

Gekas, C., and Graf, T. (2013). CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* *121*, 4463-4472.

Gilks, C.B., Bear, S.E., Grimes, H.L., and Tschlis, P.N. (1993). Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Molecular and cellular biology* *13*, 1759-1768.

Greenbaum, A., Hsu, Y.M., Day, R.B., Schuettpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* *495*, 227-230.

Grimes, H.L., Chan, T.O., Zweidler-McKay, P.A., Tong, B., and Tschlis, P.N. (1996). The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Molecular and cellular biology* *16*, 6263-6272.

Grosveld, F., Rodriguez, P., Meier, N., Krpic, S., Pourfarzad, F., Papadopoulos, P., Kolodziej, K., Patrinos, G.P., Hostert, A., and Strouboulis, J. (2005). Isolation and characterization of hematopoietic transcription factor complexes by in vivo biotinylation tagging and mass spectrometry. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1054*, 55-67.

Haas, S., Hansson, J., Klimmeck, D., Loeffler, D., Velten, L., Uckelmann, H., Wurzer, S., Prendergast, A.M., Schnell, A., Hexel, K., *et al.* (2015). Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell stem cell*.

- Hamlett, I., Draper, J., Strouboulis, J., Iborra, F., Porcher, C., and Vyas, P. (2008). Characterization of megakaryocyte GATA1-interacting proteins: the corepressor ETO2 and GATA1 interact to regulate terminal megakaryocyte maturation. *Blood* *112*, 2738-2749.
- Hernandez, A., Villegas, A., and Anguita, E. (2010). Human promoter mutations unveil Oct-1 and GATA-1 opposite action on Gfi1b regulation. *Annals of hematology* *89*, 759-765.
- Howell, W.H., and Donahue, D.D. (1937). The Production of Blood Platelets in the Lungs. *The Journal of experimental medicine* *65*, 177-203.
- Huang, D.Y., Kuo, Y.Y., and Chang, Z.F. (2005). GATA-1 mediates auto-regulation of Gfi-1B transcription in K562 cells. *Nucleic acids research* *33*, 5331-5342.
- Huang, D.Y., Kuo, Y.Y., Lai, J.S., Suzuki, Y., Sugano, S., and Chang, Z.F. (2004). GATA-1 and NF-Y cooperate to mediate erythroid-specific transcription of Gfi-1B gene. *Nucleic acids research* *32*, 3935-3946.
- Ikuta, K., and Weissman, I.L. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 1502-1506.
- Jafar-Nejad, H., and Bellen, H.J. (2004). Gfi/Pag-3/senseless zinc finger proteins: a unifying theme? *Molecular and cellular biology* *24*, 8803-8812.
- Karlsson, G., Rorby, E., Pina, C., Soneji, S., Reckzeh, K., Miharada, K., Karlsson, C., Guo, Y., Fugazza, C., Gupta, R., *et al.* (2013). The tetraspanin CD9 affords high-purity capture of all murine hematopoietic stem cells. *Cell reports* *4*, 642-648.
- Khandanpour, C., Sharif-Askari, E., Vassen, L., Gaudreau, M.C., Zhu, J., Paul, W.E., Okayama, T., Kosan, C., and Moroy, T. (2010). Evidence that growth factor independence 1b regulates dormancy and peripheral blood mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood* *116*, 5149-5161.
- Kim, M., Cooper, D.D., Hayes, S.F., and Spangrude, G.J. (1998). Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux. *Blood* *91*, 4106-4117.
- Kollet, O., Dar, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y., Tesio, M., Samstein, R.M., Goichberg, P., Spiegel, A., *et al.* (2006). Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nature medicine* *12*, 657-664.
- Kuo, Y.Y., and Chang, Z.F. (2007). GATA-1 and Gfi-1B interplay to regulate Bcl-xL transcription. *Molecular and cellular biology* *27*, 4261-4272.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* *9*, 357-359.
- Lasky, L.C., Ascensao, J., McCullough, J., and Zanjani, E.D. (1983). Steroid modulation of naturally occurring diurnal variation in circulating pluripotential haematopoietic cells (CFU-GEMM). *British journal of haematology* *55*, 615-622.

- Laurent, B., Randrianarison-Huetz, V., Kadri, Z., Romeo, P.H., Porteu, F., and Dumenil, D. (2009). Gfi-1B promoter remains associated with active chromatin marks throughout erythroid differentiation of human primary progenitor cells. *Stem cells* *27*, 2153-2162.
- Laurent, B., Randrianarison-Huetz, V., Marechal, V., Mayeux, P., Dusanter-Fourt, I., and Dumenil, D. (2010). High-mobility group protein HMGB2 regulates human erythroid differentiation through trans-activation of GFI1B transcription. *Blood* *115*, 687-695.
- Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* *21*, 605-631.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., *et al.* (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *82*, 7580-7584.
- Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.J., Heipel, M.D., Burkhead, S.K., Kramer, J.M., *et al.* (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* *369*, 565-568.
- Machlus, K.R., and Italiano, J.E., Jr. (2013). The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *The Journal of cell biology* *201*, 785-796.
- Maehle, A.H. (2011). Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes and records of the Royal Society of London* *65*, 359-378.
- McGhee, L., Bryan, J., Elliott, L., Grimes, H.L., Kazanjian, A., Davis, J.N., and Meyers, S. (2003). Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *Journal of cellular biochemistry* *89*, 1005-1018.
- Mendez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* *452*, 442-447.
- Monteferrario, D., Bolar, N.A., Marneth, A.E., Hebeda, K.M., Bergevoet, S.M., Veenstra, H., Laros-van Gorkom, B.A., MacKenzie, M.A., Khandanpour, C., Botezatu, L., *et al.* (2014). A dominant-negative GFI1B mutation in the gray platelet syndrome. *The New England journal of medicine* *370*, 245-253.
- Moroy, T., and Khandanpour, C. (2011). Growth factor independence 1 (Gfi1) as a regulator of lymphocyte development and activation. *Seminars in immunology* *23*, 368-378.
- Moroy, T., Vassen, L., Wilkes, B., and Khandanpour, C. (2015). From cytopenia to leukemia: the role of Gfi1 and Gfi1b in blood formation. *Blood* *126*, 2561-2569.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* *505*, 327-334.
- Namen, A.E., Lupton, S., Hjerrild, K., Wignall, J., Mochizuki, D.Y., Schmierer, A., Mosley, B., March, C.J., Urdal, D., and Gillis, S. (1988a). Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* *333*, 571-573.

Namen, A.E., Schmierer, A.E., March, C.J., Overell, R.W., Park, L.S., Urdal, D.L., and Mochizuki, D.Y. (1988b). B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *The Journal of experimental medicine* *167*, 988-1002.

Oguro, H., Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell stem cell* *13*, 102-116.

Osawa, M., Yamaguchi, T., Nakamura, Y., Kaneko, S., Onodera, M., Sawada, K., Jegalian, A., Wu, H., Nakauchi, H., and Iwama, A. (2002). Erythroid expansion mediated by the Gfi-1B zinc finger protein: role in normal hematopoiesis. *Blood* *100*, 2769-2777.

Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., *et al.* (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* *180*, 1955-1960.

Pinto do, O.P., Wandzioch, E., Kolterud, A., and Carlsson, L. (2001). Multipotent hematopoietic progenitor cells immortalized by Lhx2 self-renew by a cell nonautonomous mechanism. *Experimental hematology* *29*, 1019-1028.

Potocnik, A.J., Brakebusch, C., and Fassler, R. (2000). Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity* *12*, 653-663.

Ramalho-Santos, M., and Willenbring, H. (2007). On the origin of the term "stem cell". *Cell stem cell* *1*, 35-38.

Rodel, B., Wagner, T., Zornig, M., Niessing, J., and Moroy, T. (1998). The human homologue (GFI1B) of the chicken GFI gene maps to chromosome 9q34.13-A locus frequently altered in hematopoietic diseases. *Genomics* *54*, 580-582.

Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F., and Strouboulis, J. (2005). GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *The EMBO journal* *24*, 2354-2366.

Saleque, S., Cameron, S., and Orkin, S.H. (2002). The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. *Genes & development* *16*, 301-306.

Saleque, S., Kim, J., Rooke, H.M., and Orkin, S.H. (2007). Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Molecular cell* *27*, 562-572.

Schuh, A.H., Tipping, A.J., Clark, A.J., Hamlett, I., Guyot, B., Iborra, F.J., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Enver, T., Vyas, P., *et al.* (2005). ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Molecular and cellular biology* *25*, 10235-10250.

- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* *119*, 941-953.
- Shi, Y.J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T., and Shi, Y. (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Molecular cell* *19*, 857-864.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* *241*, 58-62.
- Stevenson, W.S., Morel-Kopp, M.C., Chen, Q., Liang, H.P., Bromhead, C.J., Wright, S., Turakulov, R., Ng, A.P., Roberts, A.W., Bahlo, M., *et al.* (2013). GFI1B mutation causes a bleeding disorder with abnormal platelet function. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* *11*, 2039-2047.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 15545-15550.
- Thon, J.N., and Italiano, J.E. (2010). Platelet formation. *Seminars in hematology* *47*, 220-226.
- Thon, J.N., Macleod, H., Begonja, A.J., Zhu, J., Lee, K.C., Mogilner, A., Hartwig, J.H., and Italiano, J.E., Jr. (2012). Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nature communications* *3*, 852.
- Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research* *14*, 213-222.
- Tong, B., Grimes, H.L., Yang, T.Y., Bear, S.E., Qin, Z., Du, K., El-Deiry, W.S., and Tschlis, P.N. (1998). The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation. *Molecular and cellular biology* *18*, 2462-2473.
- Tsakiris, D.A., Scudder, L., Hodivala-Dilke, K., Hynes, R.O., and Coller, B.S. (1999). Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review. *Thrombosis and haemostasis* *81*, 177-188.
- Vassen, L., Beauchemin, H., Lemsaddek, W., Krongold, J., Trudel, M., and Moroy, T. (2014). Growth factor independence 1b (*gfi1b*) is important for the maturation of erythroid cells and the regulation of embryonic globin expression. *PloS one* *9*, e96636.
- Vassen, L., Fiolka, K., Mahlmann, S., and Moroy, T. (2005). Direct transcriptional repression of the genes encoding the zinc-finger proteins *Gfi1b* and *Gfi1* by *Gfi1b*. *Nucleic acids research* *33*, 987-998.
- Vassen, L., Fiolka, K., and Moroy, T. (2006). *Gfi1b* alters histone methylation at target gene promoters and sites of gamma-satellite containing heterochromatin. *The EMBO journal* *25*, 2409-2419.
- Vassen, L., Khandanpour, C., Ebeling, P., van der Reijden, B.A., Jansen, J.H., Mahlmann, S., Duhrsen, U., and Moroy, T. (2009). Growth factor independent 1b (*Gfi1b*) and a new splice

variant of Gfi1b are highly expressed in patients with acute and chronic leukemia. *International journal of hematology* *89*, 422-430.

Vassen, L., Okayama, T., and Moroy, T. (2007). Gfi1b:green fluorescent protein knock-in mice reveal a dynamic expression pattern of Gfi1b during hematopoiesis that is largely complementary to Gfi1. *Blood* *109*, 2356-2364.

Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L., and Weissman, I.L. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* *294*, 1933-1936.

Xiao da, W., Yang, M., Yang, J., Hon, K.L., and Fok, F.T. (2006). Lung damage may induce thrombocytopenia. *Platelets* *17*, 347-349.

Xu, W., and Kee, B.L. (2007). Growth factor independent 1B (Gfi1b) is an E2A target gene that modulates Gata3 in T-cell lymphomas. *Blood* *109*, 4406-4414.

Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., Ahamed, J., and Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nature medicine* *20*, 1321-1326.

Zweidler-Mckay, P.A., Grimes, H.L., Flubacher, M.M., and Tschlis, P.N. (1996). Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Molecular and cellular biology* *16*, 4024-4034.