

Université de Montréal

Les rôles des gènes *Hoxa9* et *Meis1* dans
l'hématopoïèse normale et leucémique

Aline Mamo

Département de médecine
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de doctorat
En biologie moléculaire

Avril, 2005



© Aline Mamo, 2005

QH

506

U54

2006

v.007

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

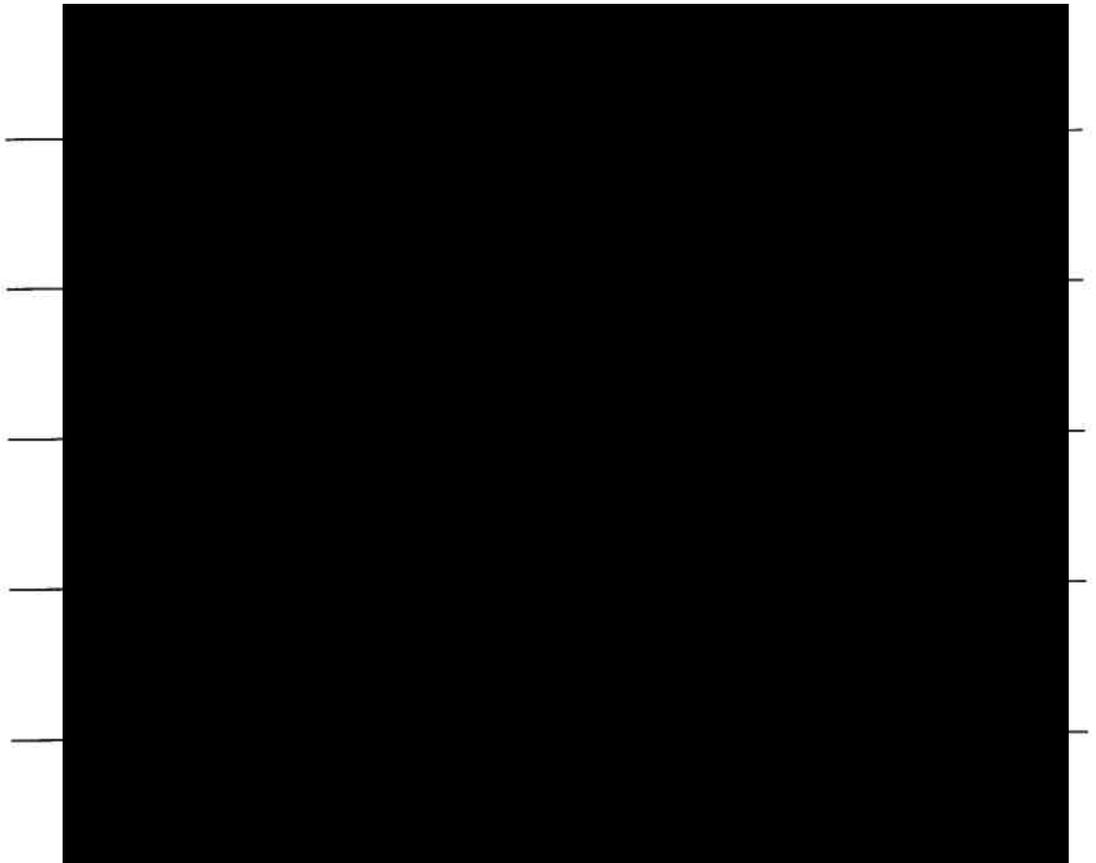
Université de Montréal

Cette thèse intitulée:
Les rôles des gènes *Hoxa9* et *Meis1* dans
l'hématopoïèse normale et leucémique

présentée par:

Aline Mamo

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:



SOMMAIRE

Des études de surexpression ont démontré que les gènes homéotiques *Hoxa9* et *Meis1* collaborent génétiquement pour accélérer l'induction d'une leucémie myéloïde aigue dans des modèles de transplantation murins. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents cette transformation leucémique ne sont pas identifiés. *Hoxa9* et *Meis1* sont exprimés dans les sous-populations hématopoïétiques les plus primitives ($\text{Sca-1}^+ \text{Lin}^-$). Une perte de fonction de *Hoxa9* induit une réduction du nombre des cellules souches hématopoïétiques. Récemment, des études sur l'orthologue de *Meis1* chez la Drosophile (HTH) ont démontré que la fusion de HTH avec le domaine de transactivation VP16 induit un gain de fonction, suggérant que HTH est inclus dans un complexe de transactivation. De plus, des études de structure-fonction indiquent que le domaine C-terminal de MEIS1 possède une activité de transactivation. La contribution de cette activité au potentiel oncogénique de *Meis1* en collaboration avec *Hoxa9* n'a pas été déterminée. Mon projet consiste à étudier les rôles de *Hoxa9* et *Meis1* dans l'hématopoïèse normale et leucémique. Dans un premier temps, j'ai surexprimé *Hoxa9* dans des cellules souches hématopoïétiques à l'aide de constructions rétrovirales et généré des modèles de transplantation murins. Par rapport aux souris contrôles, les souris surexprimant *Hoxa9* présentent une augmentation de 15x du nombre de leurs cellules souches, indiquant que cet oncogène confère à ces dernières un avantage de prolifération. En utilisant la même approche expérimentale, j'ai démontré que la délétion du domaine C-terminal de MEIS1 renfermant un domaine de transactivation, affecte négativement son potentiel oncogénique en collaboration avec *Hoxa9*. De plus, cette délétion est complétée par l'addition d'un domaine exogène de transactivation tel que VP16. Ces résultats ont suggéré que MEIS1 fait partie d'un complexe de transactivation recruté dans le contexte leucémique *Hoxa9* + *Meis1*. Pour identifier les modulateurs de la fonction de MEIS1 dans ce contexte leucémique, j'ai adopté le système du double hybride et une librairie d'ADN complémentaire générée dans le laboratoire à partir des cellules *Hoxa9* + *Meis1*.

Des études de biochimie et d'expression sur les candidats retenus du double hybride m'ont permis de sélectionner BAF250, un membre du complexe de transactivation SNF/SWI comme partenaire potentiel de MEIS1. Pour étudier la fonction de BAF250 dans l'hématopoïèse, j'ai utilisé comme première approche la technique du 'short hairpin RNA (shRNA)'. Les résultats préliminaires démontrent qu'une réduction des niveaux protéiques de BAF250 affecte le système hématopoïétique à court et à long terme. J'ai ensuite généré un allèle conditionnel pour étudier l'interaction de BAF250 avec MEIS1 dans l'hématopoïèse normale et leucémique.

Mots clés : *Hoxa9*, *Meis1*, HSC, leucémie myéloïde aigue, BAF250, système du double hybride, ciblage génique.

SUMMARY

HOX, PBX and MEIS proteins display numerous genetic and biochemical interactions. Recently, we have demonstrated that two different *Hox* genes (*Hoxa9* and *Hoxb3*) genetically interact with *Meis1* in leukemic transformation, thus suggesting a common pathway for *Hox*-induced leukemia. My project will address specifically the roles of *Hoxa9* and *Meis1* in normal and leukemic hematopoiesis. Since MEIS1 and HOXA9 proteins have different capacity to induce acute leukemia (e.g., MEIS1 is not independently leukemogenic but HOXA9 is), we postulated that HOXA9 and MEIS1 induced transformation must occur through distinct mechanisms. To gain further insight into how *Hoxa9* affects hematopoietic development at the preleukemic stage, I have engineered its over-expression in hematopoietic stem cells using retrovirus-mediated gene transfer and generated bone marrow transplantation chimeras. Compared with controls, recipients of *Hoxa9*-transduced cells had an about 15 fold increase in transplantable lymphomyeloid long-term repopulating cells, indicating the capacity for this oncogene to confer a growth advantage to hematopoietic stem cells.

Recent studies performed with the fly ortholog of MEIS1 (HTH) showed that the trans-activating form of HTH fused to the trans-activating domain of VP16 mimicked gain of function phenotypes. Also, the C-terminal domain starting (from amino acid 334) of MEIS1 appears to contain a trans-activating domain. My aim is to understand whether this trans-activating function of MEIS1 is conserved in mammalian cells and whether the C-terminal domain is essential for its transforming activity in collaboration with HOXA9. I generated chimeric proteins between the trans-activating domains of VP16 and MEIS1 or VP16 and the C-terminal mutant of MEIS1. Using transplantation chimera models, I show that the trans-activating domain of VP16 can restore and even rescue the oncogenic potential of MEIS1 mutant lacking the C-terminal 49 amino acids. This suggested that MEIS1 might be included in a trans-activating complex required for its oncogenic potential in *Hoxa9*-induced leukemia. To identify such

partners, I performed a yeast-two-hybrid screen using an expression library generated from leukemic cells over-expressing *Hoxa9* + *Meis1*. This enabled me to characterize a member of the chromatin remodelling complex SNF/SWI (BAF250) as an interacting partner for MEIS1 in the context of *Hoxa9* + *Meis1* leukemic cells. To study BAF250's function in hematopoiesis, I developed shRNA (short hairpin RNA) vectors to knock down the protein levels of BAF250. Preliminary results indicate that a reduction of BAF250 protein levels affects hematopoietic reconstitution in short and long term. To better understand the interaction of BAF250 and MEIS1 in normal and leukemic hematopoiesis, I generated a chimeric mouse with a conditional BAF250 allele, which characterization will be carried out by another student in the laboratory.

Key words: *Hoxa9*, *Meis1*, HSC, acute myeloid leukemia, BAF250, yeast-two hybrid, conditional allele.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	i
SOMMAIRE	v
TABLEAU DES MATIÈRES	ix
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	
CHAPITRE I:	
INTRODUCTION	1
ORGANISATION ET RÉGULARISATION DU SYSTÈME HÉMATOPOÏÉTIQUES	1
1. Développement et hiérarchie de l'hématopoïèse	2
2. Définition des cellules hématopoïétiques primitives	3
3. Caractérisation fonctionnelle des HSCs	4
4. Caractérisation phénotypique des cellules hématopoïétiques	6
5. Régularisation du système hématopoïétique	8
5.1. Les facteurs internes	8
5.1.1. Spécification des HSCs	9
5.1.2. Auto-renouvellement des HSCs	10
5.1.2.1. Régularisation intrinsèque de l'auto-renouvellement des HSCs chez l'adulte	11
5.1.3. Engagement-prolifération et différenciation des HSCs	12
5.1.3.1. Lignée myéloïde	12
5.1.3.2. Lignée lymphoïde	16
5.2. La niche des cellules souches	19
6. Les protéines homéotiques	24
6.1. Interactions entre les homéoprotéines et l'ADN	27
6.2. Expression des gènes Hox et de leurs cofacteurs dans l'hématopoïèse	29
7. Les rôles des gènes Hox et de leurs cofacteurs dans l'hématopoïèse normale	32
7.1. Études de perte de fonction	32
7.2. Études de surexpression	34
8. Organisation et régularisation de l'hématopoïèse leucémique	36
8.1. La cellule souche leucémique	36
8.2. Les propriétés fonctionnelles des cellules souches leucémiques	38

9. Les rôles des gènes Hox et de leurs cofacteurs dans l'hématopoïèse leucémique	39
9.1 Hoxa9 et la transformation leucémique	40
9.2. Meis1 et la transformation leucémique	41
10. Le complexe de remodelage de la chromatine SNF/SWI	44
11. Référence	49
CHAPITRE II	82
ARTICLE	
LA SUREXPRESSIION DU GÈNE HOXA9 ASSOCIÉ À UNE LEUCÉMIE MYÉLOÏDE INDUIT UNE EXPANSION DES CELLULES SOUCHES DE LA MOELLE OSSEUSE	82
Introduction	86
Matériel et méthodes	89
Résultats	94
Discussion	109
Références	113
CHAPITRE III	118
ARTICLE	
LA DISSECTION MOLÉCULAIRE DE MEIS1 RÉVÈLE DEUX DOMAINES IMPLIQUÉS DANS L'INDUCTION LEUCÉMIQUE ET UN RÔLE CLÉ POUR L'ACTIVATION DES GÈNES DU LOCUS HOXA	118
Introduction	122
Matériels et méthodes	126
Résultats	131
Discussion	148
Références	153

CHAPITRE IV	161
IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE MODULATEURS DE LA FONCTION DE MEIS1 DANS LES CELLULES LEUCÉMIQUES HOXA9 + MEIS1	161
1. Introduction	162
2. Matériel et méthodes	163
3. Identification de partenaires de Meis1	180
4. BAF250, un modulateur potentiel de l'activité de Meis1 dans l'hématopoïèse	185
5. Génération d'outils pour étudier la fonction de BAF250 dans l'hématopoïèse	189
5.1. Slany RNA interference	189
CHAPITRE V	198
GÉNÉRATION D'UN ALLÈLE CONDITIONNEL POUR BAF250, UNE PROTÉINE QUI INTERAGIT AVEC MEIS1	198
1. Introduction	199
2. Matériel et méthodes	200
3. Génération du vecteur de ciblage conditionnel BAF250	204
4. Génération d'un allèle conditionnel BAF250	208
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET DISCUSSION	213

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1.1: La caractérisation phénotypique des cellules hématopoïétiques	7
Figure 1.2: Les facteurs de transcription impliqués dans la myélopoïèse	13
Figure 1.3: Les gènes Hox chez les vertébrés	26
Figure 1.4: Les niveaux d'expression de Hox, Pbx1 et Meis1 dans des sous-populations de la moelle osseuse	31
Figure 1.5: Les complexes SNF/SWI et leurs sous-unités chez la levure, la Drosophile et l'humain	45

CHAPITRE II

Figure 2.1 : Demonstration of high level regeneration of transplantation chimeras by retrovirally transduced cells	97
Figure 2.2 : Overexpression of Hoxa9 in the transplantation chimeras enhances myelopoiesis and suppresses B-lymphopoiesis	100
Figure 2.3 : The numbers of lymphoid pre-B CFC are severely reduced in Hoxa9 transgenic mice	104
Figure 2.4 : Overexpression of Hoxa9 enhances self-renewal divisions of HSC	108

CHAPITRE III

Figure 3.1 : Identification of Meis1 domains implicated in acceleration of HOXA9-induced leukemia	135
Figure 3.2 : VP16-Meis is independently oncogenic	139
Figure 3.3 : Phenotypical analysis of leukemic cells	143
Figure 3.4 : Morphological characterization of leukemias	143
Figure 3.5 : Hox and TALE gene expression in leukemia specimens	147

CHAPITRE IV

Figure 4.1 : Transforamtion et criblage des levures	163
Figure 4.2: Génération d'une lillbrairie d'ADN complémentaire à partir des cellules leucémiques Hoxa9 + Meis1	166
Figure 4.3 : Modèle proposé pour le rôle joué par TRIP-Br dans la régularisation de la progression du cycle cellulaire	182
Figure 4.4 : Représentation schématique des différents orthologues de BAF250	184
Figure 4.5: Représentations schématiques de la protéine humaine BAF250 et du clone 29 isolé du double hybride	185
Figure 4.6 : BAF250 est exprimé dans les sous-populations primitives de la moelle osseuse	187
Figure 4.7 : BAF250 interagit spécifiquement avec Meis1 dans le système du double hybride	187
Figure 4.8: BAF250 co-immunoprécipite avec Meis1 dans les cellules humaines 293T	188
Figure 4.9: BAF250 endogène immunoprécipite avec Meis1 à partir des cellules leucémiques Hoxa9 + Meis1	188
Figure 4.10: Un modèle du mécanisme de "RNA interference"	190
Figure 4.11 : Un vecteur rétroviral qui médie le mécanisme de "RNA interference"	195

CHAPITRE V

Figure 5.1 : Représentation schématique du clone génomique BAF250	204
Figure 5.2: Recombinaison intramoléculaire de 3 lox P inclus dans le vecteur conditionnel BAF250 en présence de la recombinaise Cre	207
Figure 5.3 : Buvardage de southern démontrant la recombinaison homologue pour les clones 1 et 2	211
Figure 5.4 : Buvardage de southern démontrant l'intégration unique pour les clones 1 et 2	211

Figure 5.5: Criblage par PCR de l'intégrité du lox P situé en 5' du vecteur conditionnel BAF250	212
---	-----

CHAPITRE VI

Figure 6.1: Un modèle d'activation et de répression par les complexes HOX-PBX	221
Figure 6.2: Le réseau Meis1 proposé	223
Figure 6.3 : Évaluation du rôle de BAF250 dans la leucémie Hoxa9 + Meis1	223

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE II

Tableau I. Absolute numbers of untransduced and transduced myeloid colony forming cells (CFC)* transplanted per mouse	95
---	----

CHAPITRE III

Tableau II. Meis1/PBX1 swapping mutants: transplantation doses of the transduced fetal liver-derived CFCs	134
---	-----

Tableau III. PBX1 DNA-binding mutants: transplantation doses of the transduced bone marrow derived CFCs	134
---	-----

Tableau IV. Meis 1 mutants: transplantation doses of the transduced CFCs	138
--	-----

Tableau V. Detailed characterization of leukemias	142
---	-----

CHAPITRE IV

Tableau VI. Identification des partenaires de Meis1	180
---	-----

Tableau VII. Nombres absolus de CFCs totaux et transduits transplantés par souris	196
---	-----

Tableau VIII. Une réduction des niveaux protéiques BAF250 affecte négativement la reconstitution à court terme in vivo	197
--	-----

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Abréviation	Signification
3-AT:	3-amino-1,2,4-triazole
a.a.:	Amino acid
AD:	Activation domain
Ade:	Adnine
AND/DNA:	Acide Désoxyribonucléique/ Deoxyribonucleic acid
ADNc:	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AGM:	Aorte-Gonade-Mesonephros
ALL:	Acute Lymphoblastic Leukemia
AML:	Acute Myeloid Leukemia
ARNm :	Acide Ribonucleique messenger
ATP:	Adenosine triphosphate
BFU-E:	Burst-Forming-Unit-Erythroid
BMP:	Bone Morphogenic Protein
bp:	base pair
b-ME:	Beta-mercaptoethanol
Brm:	Brahma
CD:	Cluster of Differentiation
C-EBPa:	CCAAT enhancer binding protein alpha
CFC:	Colony-forming cell
CFU-C:	Colony Forming Units-Culture
CFU-E:	Colony Forming Unit-Erythroid
CFU-GEMM:	Colony Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte
CFU-GM:	Colony Forming Unit-Granulocyte/Monocyte
CFU-S:	Colony Forming Units-Spleen
CKI:	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CLP:	Common Lymphoid Progenitor
CMP:	Common Myeloid Progenitor
CRU:	Competitive Repopulating Units
DAPK:	Death Associated Protein Kinase
DN:	Double Negative for CD4/CD8
E:	Embryonic/Embryonnaire
ECM:	Extracellular Matrix
Epo:	Erythropoeitin
FACS:	Fluorescence activated cell sorting
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
G-CSF:	Granulocyte Colony-Stimulation Factor
GM-CSF:	Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulation Factor

GMP:	Granulocyte/Macrophage progenitor Progenitor
HA:	Hemagglutin protein
HDAC:	Histone deacetylase
Hox:	Homeobox
HSC:	Hematopoietic Stem Cells
IgH:	Immunoglobulin heavy chain
IL :	Interleukin
INK4A:	Inhibitors of Cdk 4
IRF:	Interferon Regulating Factor
Kb:	Kilobase
Leu:	Leucine
L-HSC:	Leukemic hematopoietic stem cell
LIM:	Lin-Isl-Mec
Lib:	Library
Lin:	Lineage
LTC-IC:	Long Term Culture-Initiating Cell
LT-HSC:	Long Term HSC
LTRC:	Long Term Reconstitution Capacity
M-CSF:	Macrophage Colony-Stimulation Factor
MEF:	Mouse embryonic fibroblast
MEP:	Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor
MIM:	Meis Interacting Motif
MLL:	Mixed lineage leukemia
MMLV:	Moloney murine leukemia virus
MMP:	Multipotential Progenitor
N.D.:	Not determined
NK:	Natural Killer
NOD/SCID:	Non-Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency
PBS:	Phosphate-buffered salt
PE:	Phycoerythrin
PI:	Propidium iodine
PIM:	Pbx Interacting Protein
PS:	Paraortic splanchnopleura
Q-PCR:	Quantitative real time -PCR
Rb:	Retinoblastoma protein
RNA/ARN:	Ribonucleic acid/acide ribonucléique
RNA _m /ARN _m :	messenger ribonucleic acid/acide ribonucléique messenger
RNAi:	RNA interference
RT-PCR:	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
Sca-1:	stem cell antigen-1
SCF:	Stem Cell Factor
SCL/TAL-1:	Stem Cell Leukemia/T-cell Acute Leukemia-1
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
Shh:	Sonic Hedghog
SL-IC:	SCID Leukemia-Initiating Cell
SRC:	SCID Repopulating Cells

ST-HSC:	Short Term-HSC
STRC:	Short Term Reconstitution Capacity
TALE:	Three Amino Acid Loop Extension
TBP:	TATA-binding protein
TCR:	T-cell receptor
TGFb:	Transforming Growth Factor beta
TPO:	Thrombopoietin
Trp:	Tryptophane
WW-IC:	Whitlock-White-initiating cell

CHAPITRE I: INTRODUCTION

ORGANISATION ET RÉGULARISATION DU SYSTÈME HÉMATOPOÏÉTIQUE

1. Développement et hiérarchie de l'hématopoïèse

Le maintien de l'hématopoïèse normale requiert le remplacement quotidien d'un nombre élevé de cellules hématopoïétiques (Goldman, 1982). Une fois différenciées, les cellules sont incapables de proliférer et doivent ainsi être remplacées par d'autres provenant de la prolifération et de la différenciation de cellules plus primitives connues sous le nom de cellules souches hématopoïétiques (HSCs) (Goldman, 1982). Les HSCs sont une population distincte, caractérisée par un important potentiel d'auto-renouvellement et par une capacité de générer divers types cellulaires différenciés et fonctionnels tels que les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les basophiles, les éosinophiles, les érythrocytes, les plaquettes, les mastocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes de type T et B (Klein, 1990). Des essais fonctionnels ont suggéré l'existence de 2 types de HSCs. Les cellules possédant un potentiel de repopulation à long terme (LTRC pour 'long term reconstitution capacity') sont capables de s'auto-renouveler et de produire tous les types cellulaires hématopoïétiques et ce durant toute la durée de la vie de l'individu (Harrison & Zhong, 1992; Morrison & Weissman, 1994). Les cellules ayant un potentiel de repopulation à court terme (STRC pour 'short term reconstitution capacity'), sont capables de reconstituer les compartiments lymphoïdes et myéloïdes pour une période de 6-8 semaines uniquement (Morrison, 1997; Morrison & Weissman, 1994). Le processus par lequel les cellules souches donnent naissance à des cellules différenciées implique la génération d'une variété de progéniteurs contribuant à l'une ou l'autre des cellules hématopoïétiques matures (Dexter,

1984; Golde, 1991). Les premiers progéniteurs identifiables provenant des HSCs sont les progéniteurs multipotentiels (MPP pour 'multipotential progenitors') qui possèdent une capacité de différenciation multipotentielle mais ne possèdent pas une activité d'auto-renouvellement détectable *in vivo* (Adolfsson, 2001). La différenciation des MPPs produit les précurseurs myéloïdes communs (CMP) et les précurseurs lymphoïdes communs (CLP) (Akashi, 2000; Kondo, 1997; Manz, 2002). Les CMPs produisent les érythrocytes et les mégakaryocytes ou les granulocytes et les macrophages (GMP) alors que les CLPs génèrent tous les lymphocytes de type B et T ainsi que les cellules NK (pour 'Natural Killer'). Puisque les populations de CMP et de CLP sont capables de produire plus d'une lignée cellulaire mature, la génération d'une lignée cellulaire mature spécifique, découle de l'engagement de plus en plus étroit du progéniteur vers un type cellulaire défini aux dépens d'un autre, durant le processus de différenciation.

2. Définition des cellules hématopoïétiques primitives

La HSC est définie comme une cellule possédant un potentiel d'auto-renouvellement et de repopulation lymphomyéloïde à long terme (Orlic & Bodine, 1994). En 1965, des expériences menées par Till, McCullosh, Wu, Becker, Siminovitch et collaborateurs ont démontré que la moelle osseuse adulte contient des cellules capables de former des nodules macroscopiques de cellules myéloérythroïdes au niveau de la rate 8-12 jours après une injection intraveineuse de ces cellules dans des receveurs myélosupprimés (Becker, 1963; Siminovitch, 1963). Ces colonies sont clonales (Wu, 1968a, b) et génèrent parfois des colonies similaires dans des receveurs secondaires (Siminovitch, 1963). Comme les cellules de ces colonies (colony-forming unit-spleen, CFU-S) partageaient

plusieurs caractéristiques attribuées aux HSCs, incluant un potentiel prolifératif élevé, une capacité d'auto-renouvellement et de multipotentialité, ces CFU-S étaient considérées des HSCs, initialement (Siminovitch, 1963).

La validité des essais CFU-S (ayant pour objectif de détecter les HSCs caractérisées par un potentiel de repopulation à long terme) a été mise en question après la découverte que certaines de ces cellules étaient capables uniquement de se différencier en une lignée hématopoïétique et/ou la majorité était incapable de s'auto-renouveler. Même si toutes les cellules pouvaient se différencier en lignées érythrocytaires et myéloïdes, elles ne génèrent pas des lymphocytes de type T et B (Wu, 1968a, b; Lala & Johnson, 1978; Lepault, 1993). À présent, il est établi que chez l'adulte, la plupart des cellules de CFU-S dans la moelle osseuse sont des progéniteurs myéloïdes (Worton, 1969; Jones, 1989) qui peuvent être physiquement séparés des progéniteurs lymphoïdes et des cellules les plus primitives ayant un potentiel de repopulation lymphomyéloïde à long terme (Mulder & Visser, 1987; Visser & de Vries, 1988; Jones, 1990; Spangrude, 1991; van der Loo, 1994).

3. Caractérisation fonctionnelle des HSCs

L'essai de 'Competitive Repopulating Unit (CRU)', décrit par Szilvassy en 1990 (Szilvassy, 1990), vise à quantifier les cellules souches possédant un potentiel de repopulation à long terme et utilise 2 propriétés principales des HSCs: 1) la transplantation à dilution limite dans des receveurs irradiés permet la détection d'une classe de cellules souches primitives capables de reconstituer le système hématopoïétique de ces souris à long terme; 2) cette reconstitution implique la génération de toutes les lignées hématopoïétiques par les cellules des donneurs.

Ainsi, cet essai *in vivo* devient le paradigme des essais fonctionnels visant à détecter les cellules souches primitives. L'essai CRU a été aussi utilisé pour quantifier les cellules souches humaines. Les premières tentatives de 'xéno-graft' échouèrent suite au rejet des cellules humaines par le système immunitaire murin. Cependant, les souris 'nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID)', caractérisées par une absence des lymphocytes T et B et une réduction du nombre des cellules NK, ne développent pas une réponse immunitaire aux cellules humaines et permettent ainsi, une récapitulation partielle de l'hématopoïèse humaine (Shultz, 1995). Les cellules de moelle osseuse capables de reconstituer ces souris sont appelées 'SCID repopulating cells (SRC)' (Kamel-Reid & Dick, 1988; Vormoor, 1994; Lapidot, 1994; Larochelle, 1995; Larochelle, 1996).

L'essai *in vitro* connu sous le nom de 'long-term culture initiating cells (LTC-IC)', vise à quantifier les cellules primitives cultivées sur une couche de cellules stromales détectables après 5 semaines de culture cellulaire (Eaves, 1992). Durant cette période de culture, les progéniteurs intermédiaires présents dans l'échantillon se différencient et meurent, alors que les cellules plus primitives restent viables et génèrent de nouveaux progéniteurs détectables *in vitro*. Les cellules stromales assurent la production de facteurs nécessaires à la survie de la population des cellules primitives. Les systèmes de culture excluant les cellules stromales, permettent l'expansion de toutes les populations hématopoïétiques (incluant les progéniteurs), cependant ils ne promouvoient pas le maintien et l'expansion des cellules les plus primitives (Verfaillie & Miller, 1995).

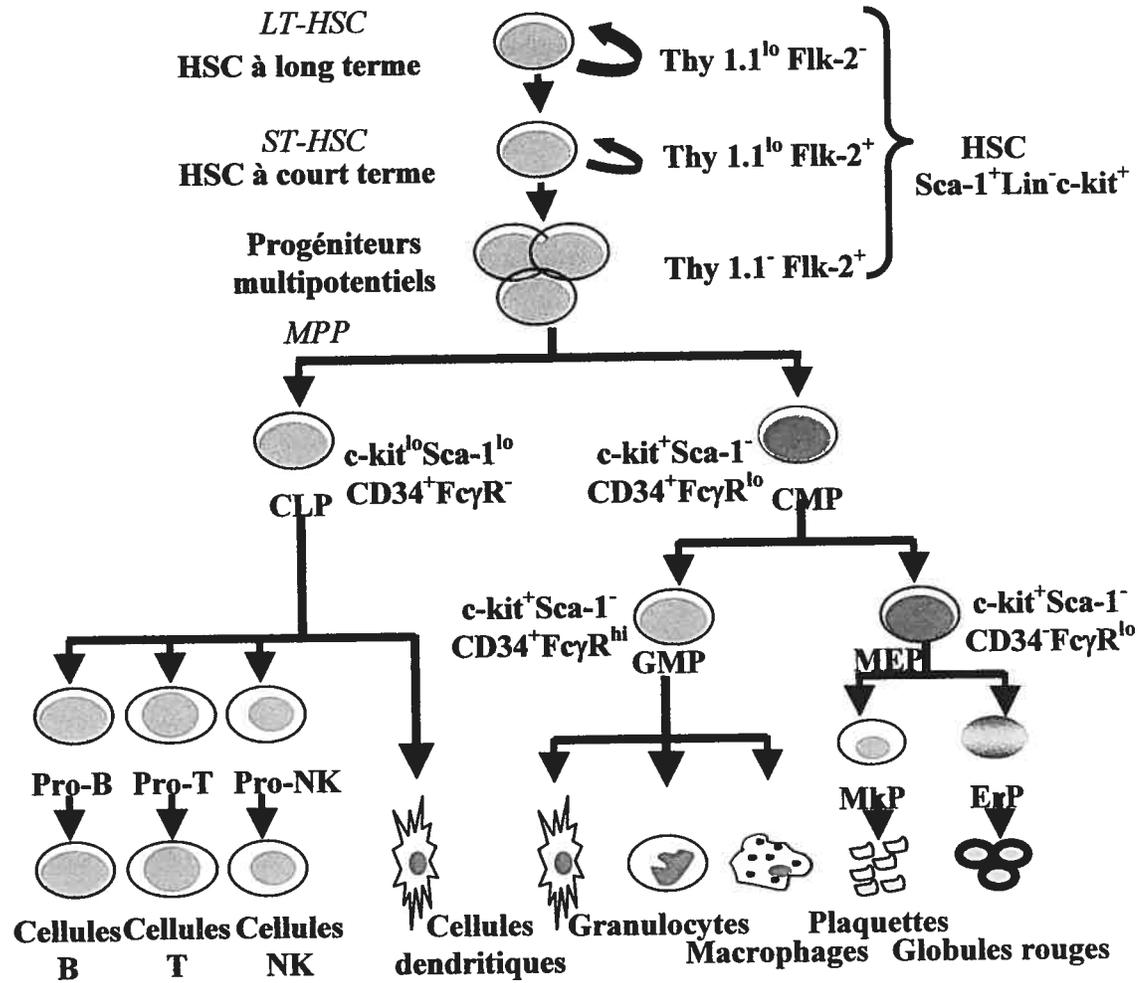
L'essai *in vitro* mesurant les progéniteurs est connu sous le nom de 'colony forming unit-culture (CFU-C)' (Pluznick, 1965; Bradley, 1966). Les CFCs sont

définies comme des cellules capables de proliférer et de former des colonies dans un milieu semi-solide contenant la méthylcellulose et des facteurs de croissance. Plusieurs types cellulaires hématopoïétiques sont retrouvés dans les colonies formées. Les CFU-GEMM (Johnson, 1977) qui génèrent des granulocytes, des érythrocytes, des monocytes et des mégakaryocytes, sont considérées comme les plus primitives détectées à l'aide de cet essai *in vitro*. Les CFU-GEMM possèdent peu ou pas de potentiel d'auto-renouvellement et s'engagent de plus en plus à donner d'autres colonies formées de 1 à 2 types cellulaires; ainsi nous identifions les 'erythroid burst-forming units (BFU-E)' (Gregory, 1976), les 'erythroid colony forming units (CFU-E)' (Stephenson, 1971), les 'granulocyte/monocyte forming units (CFU-GM)' (Bradley, 1966) et les 'megakaryocyte colony forming units (CFU-Mega)' (Metcalf, 1975).

4. Caractérisation phénotypique des cellules hématopoïétiques

La figure 1.1 démontre que les tentatives de purification des cellules souches hématopoïétiques reposaient sur l'identification d'antigènes de surface distincts exprimés par des sous-populations de cellules hématopoïétiques tels que : Thy1.1, Sca-1 et CD34 ou les capacités métaboliques de ces cellules à inclure la rhodamine 123.

Figure 1.1: La caractérisation phénotypique des cellules hématopoïétiques



Chez la souris, les populations de la moelle osseuse enrichies en HSC expriment à des niveaux élevés Sca-1 et c-Kit. Thy1.1 est exprimé faiblement alors que les marqueurs pour les lignées myéloïde (CD11b), érythroïde (ter-119) et lymphoïde de type B (CD45) et T (CD3) sont absents (Morrison, 1995). De façon analogue, chez l'Homme, les combinaisons de marqueurs [Lin^- , Thy1^+ , CD34^+ , $\text{CD38}^{-/\text{faible}}$] sont utilisées pour purifier des populations hématopoïétiques riches en HSCs (Morrison, 1995). Ces caractéristiques phénotypiques ont confirmé que les HSCs sont rares. Par exemple, chez la souris, $\sim 1:5000$ cellules de la moelle osseuse ont le phénotype [$\text{Lin}^{-/\text{faible}}$, $\text{Thy 1.1}^{\text{faible}}$, $\text{c-kit}^{\text{élevé}}$, Sca-1^+] et sont caractérisées par une capacité de repopulation multipotentielle à long terme. Ce type de cellules représente une LT-HSC. Récemment, les niveaux d'expression du récepteur de tyrosine kinase Flk-2 a été identifié comme un marqueur fiable discriminant entre les LT-HSCs [$\text{Thy1.1}^{\text{faible}}$, Flk-2^-], les ST-HSCs [$\text{Thy1.1}^{\text{faible}}$, Flk-2^+], et les MPPs [Thy1.1^- , Flk-2^+] qui comprennent aussi les cellules Sca-1^+ c-Kit^+ Lin^- (Christensen, 2001).

5. Régularisation du système hématopoïétique

5.1. Les facteurs internes

Au moins trois programmes génétiques distincts sont requis pour maintenir l'homéostasie du système hématopoïétique. Ceux-ci incluent : a) la spécification des HSCs, b) leur auto-renouvellement et c) leur engagement vers la prolifération et vers la différenciation.

5.1.1. Spécification des HSCs

Chez la souris, l'hématopoïèse débute au jour embryonnaire 7.5 (E7.5) avec l'apparition des érythrocytes embryonnaires ou primitifs retrouvés à l'intérieur des îlots hématopoïétiques de la membrane vitelline extra-embryonnaire. Au jour E11.5, l'hématopoïèse se déplace au niveau du foie foetal où des cellules rouges matures et définitives et des cellules appartenant à plusieurs lignées hématopoïétiques, apparaissent. Par contre, le site d'origine des HSCs demeure controversé. Au début, il a été convenu que les cellules HSCs et les progéniteurs migrent de la membrane vitelline vers le foie foetal durant le développement. Cependant, des études récentes, utilisant des modèles de transplantation pour reconstituer le système hématopoïétique des receveurs, suggèrent les régions intra-embryonnaires 'para-aortic splanchnopleura (PS) et aortic-gonadal mesonephros (AGM)' comme source de l'hématopoïèse définitive ou adulte (Godin, 1993; Medvinsky, 1993; Medvinsky & Dzierzak, 1996). Les HSCs provenant de ces régions migrent et colonisent le foie foetal et la rate où elles donnent naissance à des progéniteurs de toutes les lignées hématopoïétiques. Après la naissance, l'hématopoïèse définitive est principalement restreinte à la moelle osseuse. Dans certaines conditions pathologiques, elle est retrouvée au niveau de sites extra-médullaires comme la rate, le foie et occasionnellement le poumon et le cerveau.

De plus, des études par le groupe Dzierzak ont rapporté la présence de cellules souches hématopoïétiques dans la région du placenta, suggérant ainsi la présence d'une troisième niche préhépatique pour les cellules HSCs (Ottersbach et Dzierzak, 2005). Leurs résultats montrent que l'expansion de la population des

HSCs dans le placenta est 15x plus grande que celle de l'AGM. Cette expansion a lieu avant ou durant l'expansion de la population des HSCs du foie foetal et diminue vers la fin de la gestation (jour embryonnaire E15), reflétant probablement la mobilisation des HSCs du placenta vers le foie foetal. Ainsi, les chercheurs suggèrent que les HSCs du placenta constituent la meilleure ressource comparativement aux régions du sac vitellin et de l'AGM, pour l'expansion des HSCs dans le foie foetal (Ottersbach, 2005).

Le développement d'un système hématopoïétique fonctionnel et stable implique plusieurs processus complexes tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, le contrôle de la migration des cellules dans l'espace et le temps, le 'homing', l'auto-renouvellement/la prolifération et la survie de tous les types cellulaires incluant les HSCs. Le complexe transcriptionnel contrôlant la fonction des HSCs est indiscutablement très élaboré. Durant l'embryogenèse, les gènes impliqués dans la spécification des HSCs incluent : SCL/tal-1 (Shivdasani, 1995) 'Stem cell leukemia hematopoietic transcription factor' et Rbtn2 (Warren, 1994) (connu sous le nom de Lmo2 ou ttg-2), qui sont essentiels pour l'hématopoïèse primitive et définitive, et AML-1 (Okuda, 1996; Lacaud, 2002) (connu sous le nom de RUNX1/CBFA2 et PEBP2B) qui est spécifiquement requis pour l'hématopoïèse définitive.

5.1.2. Auto-renouvellement des HSCs

Après leur spécification, les HSCs migrent vers le foie foetal où elles sont soumises à une expansion et ensuite se déplacent vers la moelle osseuse où elles sont maintenues pour toute la vie adulte. L'expansion au niveau du foie foetal

implique des divisions symétriques des HSCs (une cellule mère donne naissance à 2 cellules filles HSCs) (auto-renouvellement-expansion) alors que le maintien au niveau de la moelle osseuse suggère des divisions asymétriques (une cellule mère donne naissance à une cellule fille HSC et une autre cellule plus différenciée) (auto-renouvellement-maintien).

5.1.2.1. Régularisateurs intrinsèques de l'auto-renouvellement-maintien des HSCs chez l'adulte

Aujourd'hui encore, les mécanismes génétiques responsables des programmes intrinsèques du maintien des cellules hématopoïétiques primitives de la moelle osseuse sont très peu connus. Cependant, plusieurs études récentes impliquent les facteurs nucléaires comme Bmi-1 et Mph-1/Rae 28 appartenant à la famille des gènes Polycomb, ainsi que GATA-2 et TEL comme régularisateurs de ce processus. Des études récentes indiquent que le gène polycomb Bmi-1 est dispensable pour la spécification des HSCs et leur auto-renouvellement mais est absolument requis pour leur maintien *in vivo*. Le rôle de Bmi-1 *in vivo* est discuté ultérieurement dans cette introduction. Le produit du gène Mph-1/Rae-28 semble aussi jouer un rôle dans le maintien de l'activité des HSCs au niveau du foie foetal. Chez les embryons Mph-1^{-/-}/Rae-28^{-/-}, le nombre et le potentiel prolifératif des cellules primitives myéloïdes et des progéniteurs CFCs de foie foetal (E14.5) déclinent progressivement, avec une réduction de 20X chez ces embryons mutants par comparaison à ceux de type sauvage. Ces études suggèrent que Mph-1/Rae-28 joue un rôle crucial dans le maintien de l'activité des HSCs au stade foetal (Ohta, 2002). Le facteur de transcription de type 'zinc finger', GATA-2, un membre de la famille GATA, joue un rôle critique dans le maintien des HSCs et

des progéniteurs multipotentiels, chez l'embryon et chez l'adulte (Tsai, 1994; Tsai & Orkin, 1997). La perte de fonction de GATA-2 résulte en une réduction du nombre de tous les progéniteurs hématopoïétiques. La surexpression de GATA-2 bloque l'hématopoïèse normale en empêchant la croissance et la différenciation clonogénique *in vitro* et *in vivo* (Persons, 1999).

5.1.3. Engagement-prolifération et différenciation des HSCs

Les HSCs se divisent et génèrent des cellules filles différenciées. Après 10 à 15 divisions, des lignées cellulaires hématopoïétiques spécifiques lymphoïdes et myéloïdes sont générées. Ces processus d'engagement et de différenciation sont contrôlés par les différents programmes génétiques. Les premières étapes de ces processus ne sont pas bien identifiées mais l'hypothèse dominante propose un engagement dans la génération soit des progéniteurs lymphoïdes soit myéloïdes. Il est probable que l'expression différentielle des facteurs de transcription détermine le sort des HSCs quant à leur auto-renouvellement versus leur engagement dans la différenciation en progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes.

5.1.3.1. Lignée myéloïde

Des études entreprises il y a 10 ans ont démontré l'importance de 2 facteurs de transcription PU.1 et C/EBP α . PU.1 est requis pour le développement des macrophages et des cellules B. Une perte de fonction de PU.1 retarde le développement des granulocytes et des cellules T (Figure 1.2).

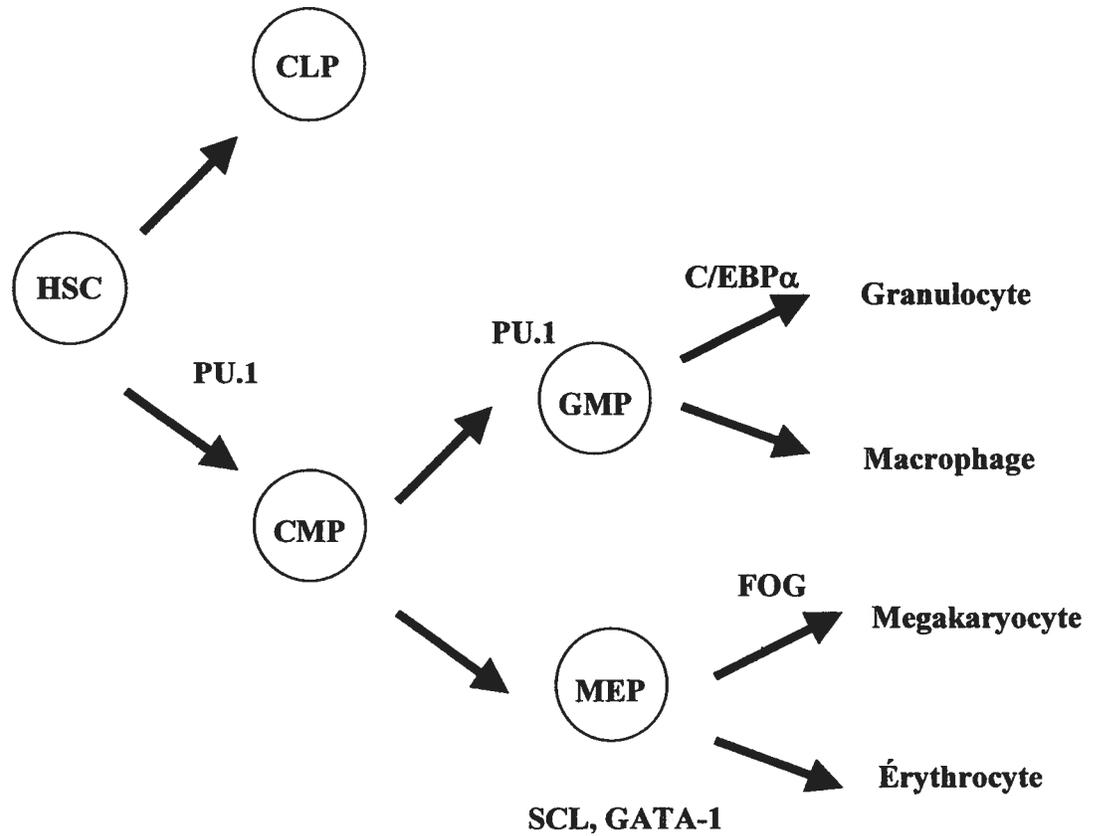


Figure 1.2: Les facteurs de transcription impliqués dans la myélopoïèse.
 Abbrev. HSC : cellule souche hématopoïétique; CLP : progéniteur commun lymphoïde; CMP : progéniteur commun myéloïde; GMP : progéniteur granulocyte/macrophage; MEP : progéniteur mégakaryocyte/érythrocyte

De plus, PU.1 joue un rôle dans le développement des précurseurs primitifs myéloïdes multipotentiels. Même si les mécanismes précis impliqués dans la maturation de ces précurseurs myéloïdes en monocyte/macrophage ou en progéniteurs granulocytaires ne sont pas compris, un modèle propose qu'une expression continue de PU.1 mène par défaut au développement des monocytes/macrophages. La différenciation en granulocytes résulte d'une inhibition de la fonction de PU.1 par les facteurs C/EBP. Donc, dans la myélopoïèse normale, PU.1 a 2 fonctions bien définies. La première est définie au niveau du développement des précurseurs myéloïdes multipotentiels. La

deuxième est au niveau du développement des monocytes/macrophages. Les souris 'knockout conditionnel' PU.1 sont bloquées au niveau des transitions entre les HSCs et les CLPs et entre les HSCs et les CMPs. PU.1 régularise presque chaque gène myéloïde incluant ceux des récepteurs des facteurs de croissance et de survie exprimés à la surface des cellules myéloïdes tels que 'granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) et granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)'. À l'opposé de PU.1, C/EBP α , appartenant à la famille des facteurs de transcription de type 'leucine zipper', possède une fonction plus spécifique dans la régularisation du développement des granulocytes. Une perte de fonction de C/EBP α bloque la maturation des granulocytes, sans pour autant affecter d'autres lignées hématopoïétiques incluant les monocytes. D'autres études ont démontré qu'une surexpression de C/EBP α au niveau d'un progéniteur myéloïde bipotent induit le développement des granulocytes et inhibe celui des monocytes (Radomska, 1998). Ceci indique aussi que C/EBP α peut inhiber la fonction de PU.1. Ces résultats sont en accord avec un modèle proposant que PU.1 est requis pour le développement des HSCs et des progéniteurs myéloïdes multipotents alors que celui de C/EBP α est d'acheminer la voie monocyttaire dirigée 'par défaut' par PU.1 vers une direction alternative consistant en la production de granulocytes. En accord avec ceci, l'analyse de l'hématopoïèse adulte dans des modèles de mutants conditionnels PU.1 démontre un blocage de transition entre les HSCs et les CMPs suite à la perte de fonction de PU.1 alors qu'un blocage de transition entre les CMPs et les GMPs est noté chez les souris mutées en C/EBP α suite à une perte de fonction de C/EBP α . Puisque les souris mutantes C/EBP α

possèdent des monocytes (Zhang, 1997), il est probable qu'au niveau de la différenciation des progéniteurs, les facteurs PU.1 et C/EBP α aient des fonctions distinctes à différentes étapes de la différenciation myéloïde. À l'opposé de PU.1, une perte de fonction de C/EBP α affecte l'expression du récepteur de G-CSF mais n'affecte pas celle du récepteur de GM-CSF ou celui de M-CSF (Iwama, 1998).

De plus, plusieurs groupes ont étudié le rôle de GATA-1 dans le développement des lignées d'érythrocytes et de mégakaryocytes (Shivdasani, 1996; Orkin, 2000). Au début, GATA-1 a été considéré comme un facteur de transcription régularisant la lignée érythroïde plutôt que la lignée myéloïde en inhibant la fonction de PU.1 pour diriger la différenciation des cellules de progéniteurs primitifs en érythrocytes et en mégakaryocytes (Rekhtman, 1999; Zhang, 1999; Nerlov, 2000). Plusieurs études ont évalué les mécanismes impliqués dans le contrôle transcriptionnel de GATA-1 (Mcdevitt, 1997). Ainsi, une région hypersensible à la DnaseI, localisée en amont du promoteur de GATA-1 a été identifiée (Mcdevitt, 1997). Le remplacement de cette région par une cassette de néomycine a causé une réduction des niveaux d'ARNm et de protéines de GATA-1 (Mcdevitt, 1997). Ceci a induit un ralentissement de la maturation des érythrocytes, suggérant que la différenciation des érythrocytes est dépendante de la dose de GATA-1. De plus, les niveaux d'expression de GATA-1 et de son cofacteur FOG 'friend of GATA' régularisent la production d'érythrocytes et de mégakaryocytes au niveau du système hématopoïétique (Cantor, 2002).

5.1.3.2. Lignée lymphoïde

Durant les 5 dernières années, plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la spécification des cellules lymphoïdes de type B ont été identifiés (Reya & Grosschedl, 1998). Des expériences de ciblage génétique ont identifié 5 facteurs de transcription (PU.1, Ikaros, E2A, EBF (Early B Cell) et Pax5) essentiels à la génération et à la différenciation des progéniteurs lymphoïdes de type B. Parmi ces 5 protéines régulatrices, l'activité et l'expression de 3 d'entre elles dont E2A, EBF et Pax5 sont spécifiquement régulées dans la lignée lymphoïde de type B du système hématopoïétique. Le gène E2A code pour 2 protéines de type 'basic helix-loop-helix (bHLH)' connues sous E12 et E47, et générées par épissage alternatif. Ces 2 protéines collaborent pour promouvoir le développement des cellules B (Bain, 1997). Chez les souris E2A^{-/-}, très peu de progéniteurs B (B220⁺) sont générés. Ces cellules n'expriment pas les transcrits Rag1, mb-1, λ 5 et CD19 et n'ont pas de réarrangement des gènes codant les chaînes lourdes des immunoglobulines. C. Murre a décrit des expériences de gain de fonction du gène E12, qui ont suggéré que E2A régularise l'expression de EBF (Kee & Murre, 1998). Il a démontré que la conversion d'une lignée cellulaire 70Z/3 lymphoïde (pré-B) en une autre myéloïde (de type macrophage) est accompagnée par une perte d'activité de E2A et de EBF. L'expression ectopique de E12 dans les macrophages induit une différenciation en cellule lymphoïde de type B exprimant les gènes EBF et IL-7R α (la chaîne α du récepteur d'interleukine 7), λ 5 et Rag-1 (Kee & Murre, 1998). De façon intéressante, la sur-expression de EBF induit l'expression des gènes cibles de E12. Ces résultats ainsi que ceux de Grosschedl et collaborateurs (Lin & Grosschedl, 1995; Sigvardsson, 1997)

suggèrent que E2A fonctionne en amont de EBF. E2A régularise l'expression de EBF et de concert avec ce dernier, induisent l'expression des gènes spécifiques aux cellules B. Le gène Pax5, codant pour le facteur de transcription BSAP fonctionne en aval de PU.1, Ikaros, E2A et EBF dans le développement des cellules B (Nutt, 1997; Thevenin, 1998). Dans la moelle osseuse de mutants Pax5, les progéniteurs pro-B sont générés mais ne peuvent pas se différencier en cellules pré-B. Les cellules mutantes Pax5 peuvent proliférer *in vitro* en présence de cellules stromales et d'IL-7. Elles expriment les transcrits PU.1, Ikaros, E2A et EBF à des niveaux normaux. De plus, l'expression des gènes Rag-1, Rag-2 et la chaîne légère est intacte. Les cellules pro-B de mutants Pax5 expriment mb-1 à de faibles niveaux et n'induisent pas l'expression de CD19, suggérant que Pax5 régularise directement l'expression de ces 2 gènes spécifiques aux cellules lymphoïdes de type B (Nutt, 1998). Finalement, les cellules pro-B de mutants Pax5 sont sélectivement compromises au niveau de la recombinaison de V à DJ du locus IgH, un phénotype associé aussi à une mutation retrouvée au niveau de l'IL-7R α (Corcoran, 1998). M. Busslinger en collaboration avec T. Rolink et F. Melchers ont présenté une série d'expériences visant à analyser le potentiel de développement de clones de cellules pro-B provenant des mutants de Pax5. Malgré leur engagement au niveau de la différenciation en cellules B, ces cellules mutantes sont capables de donner naissance à des macrophages et à des ostéoclastes *in vitro* ainsi qu'à des cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ *in vivo*. Ces résultats ont 2 implications importantes au niveau du développement. Premièrement, elles démontrent que Pax5 est nécessaire pour l'engagement dans la lignée lymphoïde de type B. En son absence, PU.1, Ikaros, E2A et EBF génèrent des progéniteurs de type B qui conservent des potentiels de développement en cellules T ou en

macrophages. Deuxièmement, les résultats de Busslinger et collègues renforcent le lien entre le développement des lignées lymphoïdes et myéloïdes.

Parmi les facteurs de transcription qui affectent uniquement la génération des cellules T, le facteur de transcription de type 'zinc finger' GATA-3 agit au niveau des premiers stades du développement des cellules T. La différenciation des cellules ES GATA-3^{-/-} est bloquée au niveau ou même avant le stade double négatif (DN) du développement des thymocytes car ces cellules mutantes ne contribuent pas aux populations de thymocytes DN (Ting, 1996).

Le 'lymphoid enhancer factor 1' (LEF-1) et le 'T cell factor' (TCF1) sont des membres étroitement liés et appartiennent à la famille 'High Mobility Group' (HMG) de facteurs de transcriptions contrôlant les régions régulatrices telles que l' 'enhancer' du TCR α (chaîne α du récepteur de cellule T) *in vitro*. La perte de fonction de l'un de ces gènes affecte partiellement (Tcf1) ou non (Lef1) le développement des thymocytes (Okamura, 1998). En effet, les thymocytes de souris âgées Tcf1^{-/-} sont bloqués au stade DN mais de façon intéressante, les cellules T peuvent être générées pendant une courte période de temps (Verbeek, 1995). À la naissance, les souris Tcf1^{-/-} possèdent un nombre normal de cellules T mais ont un arrêt de développement du thymus, 2 semaines plus tard. Dans les 2 cas, la nature de ce défaut est reliée au maintien et à la génération des cellules T.

Notch spécifie la génération des cellules T en inhibant l'expression des gènes spécifiques aux cellules B, en induisant l'apoptose de ces cellules B et l'arrêt du cycle cellulaire des progéniteurs de granulocytes.

5.2. *La niche des cellules souches*

Dans la moelle osseuse, les HSCs sont entourées par un micro-environnement défini par les interactions entre cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire (ECM) et cellule-facteurs de croissance (incluant les cytokines) présents à des concentrations et des combinaisons variables. Les cellules stromales, présentes au niveau du micro-environnement, comprennent les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les ostéoblastes et autres. Ces cellules forment un support pour les cellules souches et les progéniteurs et produisent des ligands transmembranaires, des composantes de la matrice extracellulaire et des protéines solubles requis pour l'activité normale des HSCs.

In situ, les HSCs sont exposées à différents facteurs de croissance. Certains sont solubles, d'autres sont liés soit à la matrice extracellulaire ou aux cellules adjacentes. Par exemple, le facteur Steel (le ligand de c-Kit) est produit sous une forme soluble ou attachée à la membrane (Anderson, 1991; Anderson, 1990; Flanagan, 1991; Huang, 1992). En plus de fonctionner comme une molécule d'adhésion par liaison à son récepteur, la forme membranaire du facteur Steel possède des activités distinctes de celles de sa forme soluble. Les souris mutantes Sl/Sl^d qui produisent uniquement la forme soluble du facteur Steel ont les mêmes défauts hématopoïétiques que les souris mutantes Sl/Sl (Flanagan, 1991; Brannan, 1991). Même si les souris Sl/Sl^d possèdent un nombre normal de plaquettes, leurs moelles osseuses ont un nombre réduit de mégakaryocytes matures et de progéniteurs de mégakaryocytes, soulignant le rôle essentiel joué par le facteur Steel membranaire, au niveau de cette lignée cellulaire (Ebbe, 1973; Adrados, 1984; Ebbe, 1986). De plus, des cellules stromales dérivées de souris Sl/Sl et transfectées avec l'isoforme codant pour la forme membranaire de Steel

maintiennent l'hématopoïèse plus longtemps par rapport à celles exprimant la forme soluble de Steel (Toskoz, 1992). Les souris exprimant une version mutée du récepteur de c-Kit de la famille des tyrosines kinases, ont un microenvironnement normal mais leurs cellules hématopoïétiques ne sont pas compétitives, suggérant que le défaut est intrinsèque aux cellules transplantées.

Le ligand Flt3, exprimé sur les cellules stromales mésenchymateuses, est le ligand du récepteur Flt3 exprimé au niveau des populations CD34⁺ de la moelle osseuse et du cordon ombilical (Broudy, 1996). La perte de fonction de Flt3 induit une réduction significative des nombres des progéniteurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse et des cellules myéloïdes matures, des cellules B, des cellules NK et des cellules dendritiques. Vu la difficulté d'étudier les HSCs dans leur microenvironnement, les mécanismes d'action des différents facteurs de croissance solubles contrôlant le sort des HSCs, ont été déduit des expériences *in vitro* où les concentrations, les ratios entre les différents facteurs et la durée d'exposition ne reflètent pas nécessairement les conditions physiologiques *in vivo*. Ainsi, le grand défi a été d'isoler et d'analyser les facteurs solubles (McNiece & Bridle, 2001). Les facteurs de croissance contrôlant la prolifération des cellules souches et des progéniteurs sont les ligands de 'fms like tyrosine kinase 3 (Flt3), stem cell factor (SCF), interleukine 6 (IL-6) et thrombopoïétine (Tpo)' (Henschler, 1994; Zandstra, 1997). Leurs effets dépendent des concentrations de chaque composant ainsi que des combinaisons spécifiques des facteurs de croissance présents. Par exemple, à l'aide des essais de reconstitution des souris NOD/SCID, il a été démontré que l'IL-6 et son récepteur soluble (IL-6/sIL-6R) agissent en synergie avec Flt3 et SCF pour induire l'expansion des HSCs humaines (Lyman, 1993; Small, 1994). Des données ont aussi suggéré que

certaines facteurs de croissance assurent la survie des cellules souches en inhibant leur prolifération cellulaire. L'exemple classique est celui du "transforming growth factor beta (TGF- β), connu pour maintenir les HSCs en état de quiescence par induction de plusieurs voies impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire (Eaves, 1991; Fortunel, 2000; Jacobsen, 1995; Liu, 1997; Sitnicka, 1996). Plusieurs études suggèrent que le rôle des cytokines est d'assurer la survie des cellules engagées dans la différenciation en une lignée cellulaire déterminée. L'erythropoïétine (Epo) est requise pour la maturation des cellules rouges *in vivo*. Cependant, l'Epo ou son récepteur (EpoR) sont dispensables pour la génération des progéniteurs d'érythrocytes. Ainsi, les cellules déficientes en EpoR et stimulées par le récepteur de la thrombopoïétine forment *in vitro* des colonies d'érythrocytes. Ceci suggère que la différenciation en érythrocytes est déterminée intrinsèquement et qu'Epo est requise pour assurer la survie des cellules. De façon analogue, des souris mutantes en un ou plusieurs 'colony-stimulating factor (CSF)' ou de leurs récepteurs, se développent normalement, en dépit de quelques anomalies dans la production et la maturation des cellules myéloïdes. De plus, afin de déterminer si les récepteurs c-Mpl ou de G-CSF ont un effet sur le développement des mégakaryocytes ou des granulocytes, le gène de c-mpl a été remplacé par recombinaison homologue, par une construction chimère fusionnant le domaine extracellulaire de c-Mpl au domaine intracellulaire du récepteur de G-CSF (Stoffel, 1999). Les souris exprimant ce récepteur chimère ont des paramètres hématologiques normaux, ce qui n'est pas observé pour les souris c-Mpl^{-/-} qui n'ont pas de plaquettes. Ceci a suggéré que la partie extracellulaire de c-Mpl est nécessaire pour recruter les partenaires impliqués dans la formation des mégakaryocytes alors que la signalisation via la partie

cytoplasmique du récepteur de G-CSF est requise pour la formation des granulocytes. Initialement, le GM-CSF a été décrit comme un facteur de croissance requis pour la génération des granulocytes et des macrophages *in vitro*. De plus, il a été suggéré que l'obtention de macrophages versus des granulocytes dépend de la dose du GM-CSF (Metcalf, 1980). La voie de signalisation du récepteur de G-CSF induit la différenciation en granulocytes, en augmentant les niveaux d'expression de C/EBP ϵ (Nakajima et Ihle, 2001) et de C/EBP α , changeant ainsi les ratios entre C/EBP α et PU.1 en faveur de la lignée des granulocytes (Dahl et Simon, 2003).

Durant la différenciation des cellules B, la voie de signalisation de c-Kit affecte négativement les niveaux d'expression du facteur de transcription E12 (Riley, 2002). Ceci a pour conséquence de bloquer la progression de la différenciation des cellules pro-B en pré-B (Riley, 2002). Ces études suggèrent que les facteurs extrinsèques comme les cytokines jouent un rôle dans la survie, la prolifération et la maturation fonctionnelle des cellules déjà engagées mais leur rôle est minime ou absent au niveau des progéniteurs multipotentiels.

Il a été proposé que les facteurs de croissance impliqués dans la formation des organes durant l'embryogenèse dont Wnt (Murdoch, 2003; Reya, 2003; Willert, 2003), Notch1 (Varnum-Finney, 2000), Sonic Hedgehog (Shh) (Bhardwaj, 2001) et BMP (pour 'bone morphogenetic protein') (Bhatia, 1999), sont aussi utilisés pour maintenir les cellules souches durant la vie adulte. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents leur rôle dans la détermination des nombres des cellules souches restent à élucider. Des études ont démontré qu'au niveau des HSCs purifiées, Wnt active l'expression des gènes Hoxb4 et Notch1

(Reya, 2003), impliqués dans l'auto-renouvellement cellulaire (Sauvageau, 1995; Varnum-Finney, 2000; Antonchuk, 2002, Amsellem, 2003). Mais il n'a pas encore été documenté que Hoxb4 et/ou Notch1 médient l'activité de Wnt au niveau des HSCs. Chacun des facteurs de croissance mentionnés plus haut possèdent plusieurs membres. Certaines études suggèrent que les HSCs présentent des réponses biologiques spécifiques aux différents membres d'une même famille. Par exemple, une déficience en Notch1 affecte le développement des cellules hématopoïétiques alors que ce n'est pas le cas pour Notch-2 (Kumano, 2003). De même, les activités de BMP-2, -4 et -7 sont différentes dans les essais de reconstitution *in vivo* utilisant les modèles murins SCID (Bhatia, 1999). Puisque les membres d'une même famille possèdent des voies de transduction de signaux comparables, il sera important d'élucider les mécanismes moléculaires spécifiques à chacun de ces facteurs pour l'expansion des HSCs à des fins thérapeutiques.

Il a été suggéré que les HSCs de la moelle osseuse résident proches de la surface osseuse et que la différenciation cellulaire procède vers l'axe longitudinal de la moelle (Nilsson, 2001). Des études génétiques récentes ont démontré que les ostéoblastes constituent un élément cellulaire crucial du microenvironnement des HSCs ou de leurs niches (Calvi, 2003; Zhang, 2003). Cependant, il a été difficile d'intégrer ces observations cellulaires et moléculaires et de démontrer directement que des voies de signalisation particulières sont activées par des molécules produites à partir des ostéoblastes ou d'autres composantes des niches des HSCs. Récemment, Arai et collaborateurs (2004) démontrent que le récepteur appartenant à la famille des tyrosines kinase (RTK) Tie2 et son ligand 'angiopoïetin-1 (Ang-1)' font partie des voies de signalisation entre les HSCs et

les ostéoblastes au niveau de la région osseuse. De plus, ces chercheurs présentent des preuves que cette voie de signalisation est fonctionnelle *in situ* car les HSCs exprimant Tie-2, rentrent en contact avec les ostéoblastes exprimant Ang-1. Clairement, une définition plus précise de la niche des HSCs est nécessaire puisqu'il est invraisemblable qu'un ostéoblaste puisse seul jouer le rôle de niche. Des études en cours visant à définir le profil génétique des lignées cellulaires stromales servant de support aux HSCs, devront identifier plusieurs marqueurs potentiels utilisés pour caractériser la niche *in vivo*.

Les HSCs présentent plusieurs molécules membranaires qui transmettent des signaux provenant de la matrice extracellulaire, à l'intérieur de la cellule. En général, l'adhésion des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs à l'ECM de la moelle inhibe la prolifération cellulaire et empêche l'apoptose, assurant ainsi la survie des HSCs quiescentes. Certains des mécanismes moléculaires sous-jacents ces effets viennent d'être élucidés. Par exemple, la liaison aux intégrines présentes sur les HSCs et les progéniteurs, induit une augmentation de l'expression de p27, favorisant l'arrêt du cycle cellulaire. Ceci suggère un rôle direct joué par l'ECM dans le maintien des populations de HSCs quiescentes requises pour l'homéostasie hématopoïétique.

6. Les protéines homéotiques

Le terme homéotique tire son origine des mutations observées chez la *Drosophile* où l'identité d'un segment du corps est transformée en une autre comme le développement de pattes à la place des antennes (McGinnis et Krumlauf, 1992). Les complexes de gènes homéotiques (comme l'Antennapedia, Bithorax ou autres) partagent une région conservée de 180 nucléotides (nt) appelée

l'homéobox. Cette région code pour un domaine de 60 acides aminés, impliqué dans la liaison à l'ADN et connu sous le nom de l'homéodomaine. Dans les génomes de mammifères, il existe une centaine de gènes homéotiques. Ceux-ci peuvent être divisés en superclasses, en classes et en familles. L'appartenance d'un gène à un groupe donné dépend du degré d'homologie partagé avec les autres membres du même groupe au niveau de l'homéodomaine et des régions avoisinantes. Parmi les groupes de gènes renfermant un homéobox et exprimés dans les cellules hématopoïétiques, nous retrouvons 1) la famille des protéines HOX possèdent un motif de 6 acides aminés Y/F-P-W-M-K/R situé en amont de l'homéodomaine; 2) le groupe Pit-Oct-Unc (POU) compte 8 facteurs et possède le domaine POU en commun retrouvé dans la partie N-terminale de la protéine; 3) le groupe LIM a le domaine LIM dans la partie N-terminale de la protéine en plus de l'homéodomaine; 4) le groupe TALE (Three Amino Acid Loop Extension) comprend les protéines Pbx et Meis.

Des analyses de NMR et de cristallographie indiquent que la région de l'homéodomaine forme une structure en 'helix-turn-helix' où 3 régions distinctes d'hélice α sont observées (Gehring, 1994). La troisième hélice de l'homéodomaine rentre en contact avec l'ADN à l'aide de paires de bases spécifiques. L'affinité de la liaison à l'ADN par les protéines homéotiques est augmentée grâce à l'interaction avec d'autres protéines tels que PBX et MEIS. Piper et al. (Piper, 1999) ont étudié la structure du dimère HOX-PBX lié à l'ADN. Ils ont démontré que les sites de reconnaissance de ces facteurs sont localisés de part et d'autre de la molécule d'ADN. De plus, l'hexapeptide de HOX rentre en contact avec PBX au niveau d'une poche formée par l'extension des 3 résidus d'acides aminés et l'hélice 3 de l'homéodomaine. De façon surprenante,

la portion C-terminale de PBX, requise pour une liaison coopérative et optimale fait partie du domaine de liaison à l'ADN mais ne rentre en contact ni avec l'ADN ni avec HOX. Les résidus de cette partie C-terminale appartiennent plutôt à l'hélice 4 de l'homéodomaine de PBX et maintiennent les structures de l'hélice de reconnaissance d'ADN et de la poche liant l'hexapeptide de la protéine HOX (Piper, 1999).

Chez les mammifères, il existe 39 gènes *Hox*, organisés en 4 groupes conservés comprenant chacun 9 à 11 gènes. Les 4 groupes désignés A, B, C et D sont distribués chez l'Homme sur les chromosomes 7, 17, 12 et 2 (Apiou, 1996) alors que chez la souris, ils sont retrouvés au niveau des chromosomes 6, 11, 15 et 12 respectivement. À l'intérieur de chaque groupe, les gènes individuels sont numérotés suivant leur ordre en 3' ou en 5' le long du chromosome (Figure 1.3). Cet ordre chromosomique corrèle avec l'ordre temporel et spatial d'expression de ces gènes le long des axes du corps durant le développement. Il a été démontré que l'acide rétinoïque favorise la différenciation des cellules 'EC' et induit l'expression des gènes *Hox* en allant du 3' vers le 5' de chaque groupe (Simeone, 1990; Simeone, 1991).

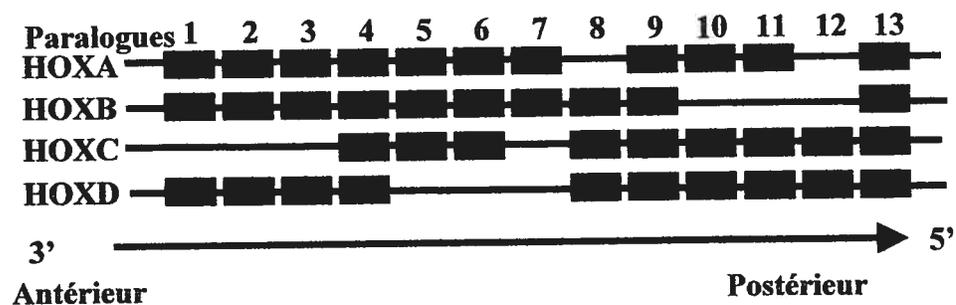


Figure 1.3: Les gènes *Hox* chez les vertébrés. Les 13 paralogues sont numérotés (1 à 13) au-dessus et les 4 groupes principaux de gènes *Hox* sont désignés par A, B, C, et D à gauche. Chaque boîte fermée correspond à un gène

Hox. La flèche en bas indique la direction de la transcription ainsi que l'ordre de la segmentation en fonction du temps et de l'espace.

Les gènes retrouvés en même position, sur différents groupes forment les paralogues. Les 13 groupes de gènes paralogues partagent des séquences hautement identiques entre eux, indiquant qu'ils proviennent d'un même segment ancestral (Figure 1.3). Les groupes sont assez compacts et s'étendent jusqu'à 100 Kb environ. Chez les mammifères, les gènes *Hox* ont des séquences significativement identiques à d'autres retrouvées au niveau des gènes homéotiques du groupe HOM-C chez les insectes. Ceci suggère qu'une pression évolutive s'est exercée afin de conserver l'organisation génomique relative des gènes *Hox*.

6.1. Interactions entre les homéoprotéines et l'ADN

La majorité des protéines *Hox* lient la séquence d'ADN TAAT à l'aide de résidus d'acides aminés retrouvés au niveau de l'homéodomaine. Particulièrement, des études de mutation ont démontré que l'acide aminé asparagine en position 51 de l'homéodomaine est essentiel pour la liaison du site cible (Billeter, 1996; Billeter, 1993; Kissinger, 1990; Passner, 1999; Piper, 1999; Wolberger, 1991). Des études *in vitro* ont démontré que l'affinité et la spécificité de la liaison à l'ADN par les protéines HOX sont renforcées grâce aux interactions avec des membres protéiques de la famille TALE. La famille TALE comprend les protéines PBC (*Drosophila melanogaster* EXD et PBX chez les mammifères) et MEIS (*Drosophila melanogaster* HTH et MEIS (1, 2, 3) et PREP (1, 2) chez les mammifères) (Chang, 1996; Chang, 1997; Knoepfler, 1996).

Chez les mammifères, les protéines HOX des paralogues 1 à 10 interagissent avec PBX (Chang, 1996) alors que ceux des paralogues 9-13 interagissent avec MEIS (Shen, 1997). Les hétérodimères PBX/HOX et MEIS/HOX reconnaissent les séquences cibles d'ADN 5'-TGATNNAT(G/A)(G/T)-3' (où l'homéodomaine de PBX interagit avec les premiers 6bp, alors que celui de HOX interagit avec les 6 derniers) et 5'-TGACNNNNTTATNN-3' (où l'homéodomaine de MEIS interagit avec les premiers 6 bp, alors que celui de HOX interagit avec les 6 derniers) respectivement. L'interaction entre les protéines HOX et PBX requiert les homéodomains des 2 protéines, une séquence de 20 acides aminés situés dans la partie C-terminale de l'homéodomaine de PBX et une séquence pentapeptidique conservée YPWMX (ou ANW) (Neuteboom, 1995; Phelan, 1995; Shen, 1996) située en amont de l'homéodomaine de HOX. Les interactions entre les protéines PBX et MEIS sont médiées par 2 séquences situées au niveau des parties N-terminales des protéines. Chez MEIS1, ce motif est connu sous le nom de "Pbx Interacting Motif ou (PIM)" et chez PBX, il est nommé "Meis Interacting Motif ou (MIM)" (Chang, 1997). L'interaction de MEIS avec PBX induit un changement conformationnel au niveau de ce dernier et expose un signal de localisation nucléaire retrouvé au niveau de son homéodomaine (Abu-Shaar, 1999). Ainsi, PBX est transporté au niveau du noyau où il peut interagir avec les protéines HOX. Les protéines MEIS et PREP partagent 2 domaines similaires uniquement. Le premier est situé au niveau du N-terminal et est responsable de la liaison et de la translocation de PBX dans le noyau (Steeman, 1997; Nakamura, 1996b; Berthelsen, 1998a) alors que le deuxième est situé au niveau de la partie C-terminale de la protéine, connu sous le nom d'homéodomaine.

Un nombre de groupes ont démontré la formation d'un trimer entre les protéines HOX, PBX et MEIS/PREP1 (Berthelsen, 1998b; Shen, 1999). Ainsi, l'hétérodimère HOX-PBX lie l'ADN et recrute un membre de la famille de MEIS/PREP via des interactions protéiques, d'où l'obtention du complexe HOX-PBX/MEIS/PREP qui module l'activité transcriptionnelle des gènes cibles. De plus, d'autres études ont noté que des mutations au niveau de l'homéodomaine de PREP1 renforcent la formation du trimer, suggérant que l'activation des gènes cibles par PREP1 ne requiert pas sa liaison à l'ADN. Le même scénario est observé pour MEIS1 et le dimer PDX1-HOX (Swift, 1998). Finalement, le trimer PBX-HOXA9-MEIS lie une séquence d'ADN dépourvue d'éléments réponses pour MEIS et dans la cellule, ce complexe stable est retrouvé en absence de liaison à l'ADN (Shen 1999).

6.2. Expression des gènes *Hox* et de leurs cofacteurs dans l'hématopoïèse

Les premières études d'expression des gènes *Hox* se sont concentrées sur des lignées cellulaires leucémiques immortalisées myéloïdes exprimant les gènes *Hox* dans certains types cellulaires. L'expression des gènes *Hoxa* caractérise les lignées cellulaires myéloïdes. Les gènes *Hoxb* sont actifs dans des lignées cellulaires érythroïdes et les gènes *Hoxc* le sont dans des cellules lymphoïdes alors que les gènes *Hoxd* sont généralement silencieux (van Oostveen J, 1999). Dans les cellules hématopoïétiques normales, les niveaux d'expression des gènes *Hox* ont été détectés en utilisant une approche de RT-PCR. Les cellules de moelle humaine CD34⁺ riches en cellules souches hématopoïétiques et en progéniteurs engagés, expriment au moins 9 des 11 gènes *Hoxa*, 8 des 10 gènes

Hoxb et 4 des 9 gènes *Hoxc*, alors que l'expression des gènes *Hoxd* n'a pas été détectée (Giampaolo, 1994; Sauvageau, 1994; Moretti, 1994).

Giampaola et al. ont étudié l'expression des gènes *Hoxb* dans les cellules CD34⁺ en réponse à différentes conditions de culture cellulaire (Giampaolo, 1994). Tout de suite après la purification des cellules CD34⁺, *Hoxb3* est uniquement détecté. Cependant, 24 heures après la mise en culture, les niveaux d'expression des gènes voisins tels que *Hoxb2*, *b4*, *b5* et *b6* sont détectables. Ainsi, *Hoxb2* est exprimé à des niveaux élevés durant les dernières étapes de l'érythropoïèse. *Hoxb3-b5* sont détectés dans des conditions de différenciation en granulocytes/monocytes et érythrocytes. Finalement, *Hoxb6* est activé dans des conditions de différenciation en granulocytes. Ces résultats quoique non quantitatifs ont confirmé que l'expression des gènes *Hox* change au cours de la différenciation des cellules hématopoïétiques.

Pineault et al. (Pineault, 2002) ont utilisé la technique de RT-PCR pour étudier l'expression des gènes *Hox*, *Pbx* et *Meis*, dans des populations hématopoïétiques fonctionnellement distinctes et dérivées de la moelle osseuse murine adulte et du foie foetal de fœtus murin de jour embryonnaire 14.5 (E14.5). Les gènes *Hoxa* sont exprimés dans les sous-populations primitives de la moelle osseuse et du foie foetal et leur expression diminue significativement au moment de la différenciation/maturation des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs multipotentiels. De façon intéressante, des niveaux d'expression faibles mais détectables de *Hoxb1* et *Hoxb4* ont persisté dans des sous-populations myéloïdes plus matures. Les gènes *Pbx1*, *Pbx2* et *Meis1* sont tous exprimés dans les fractions Sca-1⁺Lin⁻ de la moelle osseuse et de foie foetal. Cependant, à l'opposé de la majorité des gènes *Hox*, les gènes *Pbx* sont détectés

dans les fractions plus matures $Sca-1^{-}Lin^{+}$. Des différences significatives entre les profils d'expression de *Meis* et *Pbx* sont aussi observées. À l'opposé de *Pbx1*, l'expression de *Meis1* n'est pas détectée dans les sous-populations $Sca-1^{-}Lin^{+}$ de la moelle osseuse chez l'adulte et du foie foetal. De plus, au niveau des cellules myéloïdes, les niveaux d'expression de *Meis1* sont plus élevés dans les fractions $Gr-1^{low}$ que $Gr-1^{high}$ (Pineault, 2002), ce qui est observé aussi pour la majorité des gènes *Hox* (Pineault, 2002). La Figure 1.4 résume les changements généraux d'expression de *Hox/Meis/Pbx1* au cours de la différenciation des cellules hématopoïétiques.

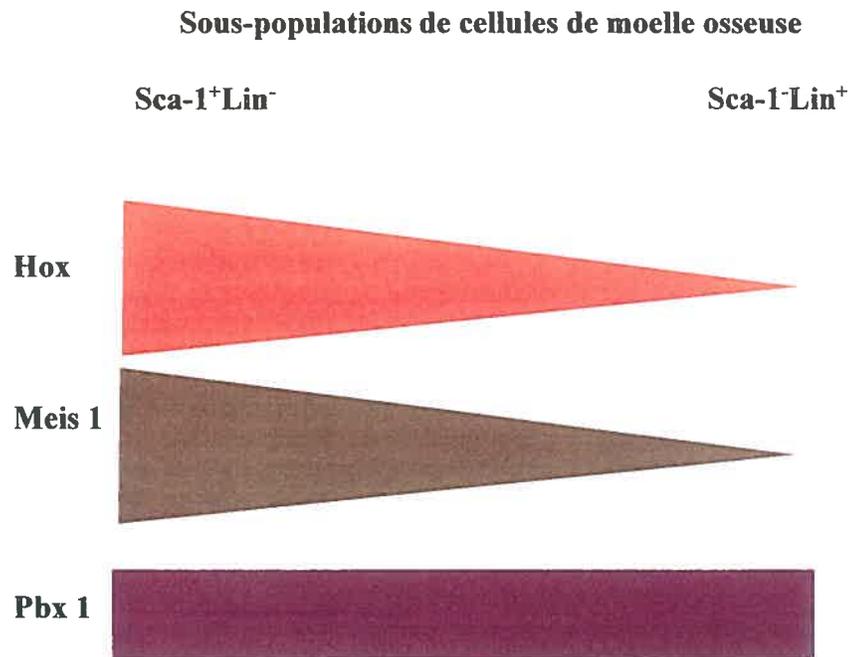


Figure 1.4: Les niveaux d'expression de *Hox*, *Pbx1* et *Meis1* dans des sous-populations de la moelle osseuse

7. Les rôles des gènes *Hox* et de leurs cofacteurs dans l'hématopoïèse normale

7.1. Études de perte de fonction

Afin d'élucider le rôle des gènes homéotiques dans l'hématopoïèse, des souris déficientes pour les 2 allèles des gènes *Hox* ('knockout') ont été développées pour examiner l'impact de la délétion du gène *Hox* en question sur le développement hématopoïétique.

Les souris 'knockout' *Hoxa9* ont généré le phénotype hématopoïétique le mieux caractérisé. Les souris *Hoxa9*^{-/-} sont viables, fertiles et ont des défauts squelettiques mineurs. Les plaquettes et l'hématocrite des souris *Hoxa9*^{-/-} sont comparables aux souris contrôles mais leurs granulocytes et leurs cellules T et B sont modestement réduits en nombre dans le sang périphérique. Les rates de ces souris sont petites de taille et leurs progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes (cellules pré-B) sont 2 à 3 fois moins nombreux par rapport aux souris contrôles (Lawrence, 1997). Au stade adulte, les souris *Hoxa9*^{-/-} ont 2 fois moins de thymocytes et les thymus des fœtus de jour embryonnaire E15.5 sont 5 à 10 fois plus petits par rapport aux contrôles. Dans des cultures d'organes de thymus foetal, la différenciation des thymocytes vers CD4⁺CD8⁺ est retardée (Izon, 1998). Ce défaut est associé à une diminution d'expression du récepteur d'IL-7 et de E-cadhérine, une diminution d'expression de bcl-2 et une augmentation d'apoptose. Les essais fonctionnels de CFU-S et de LTC-IC révèlent que les compartiments hématopoïétiques primitifs sont déficients chez les souris *Hoxa9*^{-/-}. Ces souris ont une suppression prolongée de l'hématopoïèse après une dose d'irradiation sub-létale et les cellules de la moelle possèdent une capacité de reconstitution 10 fois plus faible par rapport aux cellules de la moelle des souris

contrôles (Lawrence, article soumis). Ces observations ont suggéré qu'une déficience en *Hoxa9* affecte négativement le compartiment des HSCs.

Des études récentes de ciblage génique indiquent que *Meis1* est requis pour le développement embryonnaire. Les embryons *Meis1*^{-/-} présentent plusieurs défauts hématopoïétiques. Ils sont hémorragiques, ne produisent pas de mégakaryocytes et meurent au jour embryonnaire 14.5 (E14.5) (Hisa, 2004). Au niveau des progéniteurs, le nombre des CFCs est réduit chez les embryons *Meis1*^{-/-}. De plus, les cellules provenant de foie fœtal *Meis1*^{-/-} ont une capacité compétitive faible dans des essais de compétition/reconstitution *in vivo* (Hisa, 2004), suggérant une réduction du nombre des HSCs ou un défaut au niveau de la prolifération/la différenciation des progéniteurs. Les études d'expression et de fonction suggèrent que *Meis1* est requis pour la prolifération/auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques mais des études plus approfondies de quantification du nombre des cellules souches (essai de CRU) sont nécessaires. Par comparaison à d'autres facteurs de transcription, MEIS1 agirait en aval de GATA3 (Pandolfi, 1995) ou RUNX1 (Okuda, 1996; Wang, 1996a) par exemple, durant le développement embryonnaire. En effet, une perte de fonction de GATA3 ou RUNX1 affecte l'hématopoïèse définitive, et les embryons mutants meurent d'hémorragie entre les jours embryonnaires E11.5 et E12.5.

Les animaux *Pbx*^{-/-} et *Meis*^{-/-} présentent plusieurs caractéristiques phénotypiques en commun au niveau de l'hématopoïèse définitive (DiMartino, 2001). Ainsi, les lignées myéloérythroïdes matures sont présentes mais les nombres des CFCs sont substantiellement réduits (DiMartino, 2001). Les cellules de foie fœtal de *Pbx1*^{-/-} et de *Meis1*^{-/-} sont de faibles compétiteurs dans les essais de reconstitution *in vivo*.

Cependant, des différences phénotypiques entre les 2 mutants sont aussi notées. Au niveau du système hématopoïétique, les mutants *Pbx1*^{-/-} produisent des plaquettes, ne sont pas hémorragiques et meurent plus tard que ceux de *Meis1*^{-/-}, soit au jour embryonnaire E15.5 - E16.5 (DiMartino, 2001). Les cellules de foie foetal de *Pbx1*^{-/-} protègent les souris irradiées avec une dose radioactive létale même si elles sont 2 fois moins efficaces que les cellules de foie foetal de type sauvage *Pbx1*^{+/+} (Chang, 1997).

7.2. Études de surexpression

La stratégie complémentaire pour déterminer la fonction d'un gène homéotique dans le développement hématopoïétique a été l'adoption d'expériences de gain de fonction. Dans plusieurs cas, les protocoles de surexpression des gènes *Hox*, se résument au transfert de gène à l'aide de constructions rétrovirales dans des cellules hématopoïétiques primaires. Le premier rapport impliquait la surexpression de *Hoxb8* (Perkins, 1990; Perkins & Cory, 1993). Les cellules de moelle surexprimant *Hoxb8* ont des progéniteurs clonogéniques myéloïdes à l'aspect normal sauf pour un type de colonie caractérisée par un centre compact, un halo diffus et une capacité à former des colonies secondaires. Les progéniteurs *Hoxb8* sont dépendants des facteurs de croissance disponibles dans le milieu et ne génèrent pas de lignées cellulaires en absence de doses élevées d'IL-3. Les souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse surexprimant *Hoxb8* sont normales mais présentent un nombre élevé de progéniteurs myéloïdes.

La surexpression de *Hoxb4* n'affecte pas la cellularité de la moelle ou de la rate significativement. Les nombres et la distribution des cellules au niveau du sang périphérique sont normaux. Une très faible augmentation (< 2 fois) du nombre

des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes de type B a été déterminée (Sauvageau, 1995). De plus, les souris transplantées avec des cellules surexprimant *Hoxb4* ne développent pas de leucémie même après une longue période d'observation. L'essai de CRU *in vivo* (Szilvassy, 1990) démontre que la surexpression de *Hoxb4* induit une expansion (50 fois) du nombre des HSCs par rapport aux souris contrôles. Des études étalées sur une période de 12 mois indiquent que *Hoxb4* est un régulateur positif de l'expansion des HSCs sans affecter la différenciation ou l'engagement de ces cellules (Thorsteinsdottir, 1999).

Les études de surexpression de *Hoxb3* ont généré des résultats différents (Sauvageau, 1997). Les chimères *Hoxb3* sont caractérisées par une réduction drastique du nombre des thymocytes $CD4^+CD8^+\alpha\beta$ et une augmentation du nombre des thymocytes $CD4^-CD8^-\gamma\delta$. La surexpression de *Hoxb3* est aussi associée à une réduction du nombre des progéniteurs lymphoïdes pré-B, une augmentation du nombre des progéniteurs myéloïdes et de la taille de la rate. Ces observations vont de paire avec le développement d'un syndrome myéloprolifératif.

Les souris surexprimant *Hoxa10* présentent une réduction du nombre des progéniteurs lymphoïdes pré-B et une perte quasi-totale des progéniteurs de macrophages. Par contre, leurs cellules T ne sont pas affectées. La surexpression de *Hoxa10* est aussi associée à l'apparition d'un grand nombre de progéniteurs de mégakaryocytes et de blastes. Les souris surexprimant *Hoxa10* développent une leucémie myéloïde aigue autour de 20 semaines (Thorsteinsdottir, 1997).

Ces études suggèrent que les gènes *Hox* exercent des effets chevauchants sur la prolifération des cellules hématopoïétiques primitives et affectent spécifiquement

l'engagement des cellules hématopoïétiques dans la différenciation. Elles suggèrent aussi que l'hématopoïèse normale requiert une régulation précise des gènes *Hox* et qu'une transformation leucémique implique une expression aberrante de ces derniers.

8. Organisation et régularisation de l'hématopoïèse leucémique

Les blastes sont des cellules leucémiques caractérisées par un ratio noyau/cytoplasme élevé. La majorité des blastes ont une capacité de prolifération limitée. Parmi ces derniers, une petite population cellulaire est capable de proliférer, de s'auto-renouveler et de reconstituer le système hématopoïétique à long terme. Ces cellules sont responsables du maintien du clone leucémique et sont désignées sous le nom de cellule souche leucémique ou L-HSC (pour 'leukemic stem cells'). La hiérarchie cellulaire leucémique est identique à celle retrouvée au niveau de l'hématopoïèse normale. Cependant, à l'opposé des morphologies phénotypiques spécifiques à chaque lignée hématopoïétique normale, les L-HSCs et les progéniteurs leucémiques ne se distinguent pas d'après leur morphologie.

8.1. La cellule souche leucémique

Comme pour les cellules souches hématopoïétiques normales, plusieurs groupes ont tenté d'identifier la cellule souche leucémique à l'aide d'antigènes de surface ou par leur capacité métabolique à exclure Hoescht 33342. Les résultats obtenus jusqu'à présent ont démontré que les L-HSCs sont CD34⁺, CD38⁻, CD71⁻, HLA-DR⁻, CD90⁻, CD117⁻ (c-kit⁻) et CD123⁺ (Lapidot, 1994; Bonnet, 1997; Blair, 1997; Blair, 1998; Blair, 2000). Le mécanisme d'exclusion de Hoescht 33342

repose sur la présence d'un transporteur connu sous BCRP (Wulf, 2001). Ce dernier est surexprimé dans les leucémies myéloïdes aiguës et affecte négativement la réponse à la chimiothérapie (Steinbach, 2002; Ross, 2000). Ainsi, la capacité des L-HSCs à exclure un marqueur métabolique suggère qu'elles sont aussi capables d'exclure des produits pharmaceutiques cytotoxiques, expliquant la raison pour laquelle les patients font une rechute peu de temps après un traitement thérapeutique.

Bien que les L-HSCs et les HSCs normales aient un phénotype et une fonction similaires, les mécanismes régularisateurs maintenant le nombre des HSCs normales à un niveau stable sont perturbés dans la transformation leucémique. Une étude récente visant à déterminer les mécanismes moléculaires qui sont spécifiques aux L-HSCs, a utilisé les micropuces d'ADN complémentaire pour évaluer l'expression des gènes dans les sous-populations primitives ($CD34^+ CD38^-$) de cellules leucémiques par rapport à la même sous-population incluse dans les cellules hématopoïétiques normales. Ces études ont démontré que 2 gènes suppresseurs de tumeur, DAPK (pour 'death associated protein kinase') et IRF-1 (pour 'interferon regulator factor 1'), sont surexprimés (Guzman, 2001). La surexpression de gènes suppresseurs de tumeurs est une observation contradictoire à la définition même du gène suppresseur de tumeur et suggère que les fonctions de DAPK et IRF-1 sont spécifiques à la biologie des L-HSCs. De plus, le facteur de survie NF-KB (pour 'nuclear factor-KB') (Mayo, 2000) a été aussi identifié comme étant un facteur constitutivement actif dans les sous-populations $CD34^+ CD38^- CD123^+$ de cellules primaires leucémiques. De façon intéressante, NF-KB n'est pas exprimé dans les cellules normales $CD34^+ CD38^-$,

suggérant que NF-KB constitue une cible thérapeutique potentielle (Guzman, 2001).

8.2. *Les propriétés fonctionnelles des cellules souches leucémiques*

Les essais fonctionnels *in vivo* et *in vitro* développés pour les HSCs normales, ont été utilisés et modifiés pour les cellules leucémiques. Les conditions de culture favorables à la croissance des cellules primitives LTC-IC normales *in vitro* se sont avérées moins efficaces pour le maintien des cellules leucémiques (Ailles, 1997). Afin d'optimiser les conditions de culture, différents mélanges de cytokines, de cultures sur des cellules stromales ou en suspension ont été testés (Sutherland, 2001; Hogge, 1997). La combinaison du facteur de croissance Flt3 aux cellules stromales constituent les meilleures conditions pour maintenir les cellules leucémiques jusqu'à présent.

L'essai du CRU adopté pour la quantification des cellules souches normales a servi pour déterminer la fréquence des cellules souches leucémiques (L-HSCs). De plus, cet essai a été utilisé pour quantifier les cellules souches leucémiques humaines dans les souris NOD/SCID. Cette population a été désignée sous le nom de SL-IC (pour ('SCID leukemia-initiating cell') Bonnet, 1997).

Plusieurs études ont suggéré que la cellule souche leucémique est une cellule souche hématopoïétique transformée (Bonnet, 1997; McCulloch, 1983). Pour le cas de la translocation chromosomique AML-1/ETO, une proportion significative des cellules souches hématopoïétiques contiennent cette translocation, suggérant que l'événement de transformation initial a eu lieu dans la cellule souche (Miyamoto, 2000). Ainsi, les cellules souches semblent constituer une cible de

choix pour la transformation leucémique car leur appareil d'auto-renouvellement est actif et leur longue durée de vie favorise l'accumulation de mutations clonales.

9. Les rôles des gènes *Hox* et de leurs cofacteurs dans l'hématopoïèse leucémique

La corrélation entre une aberration d'expression d'un gène *Hox* et la transformation leucémique a été démontrée en utilisant la lignée cellulaire leucémique WEHI-3B. Cette lignée surexprime *Hoxb8* et *IL-3* suite à des intégrations provirales activatrices et adjacentes à ces gènes. *In vivo*, les souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse surexprimant *Hoxb8* et *IL-3* développent une leucémie myéloïde aigue et polyclonale, suggérant que *Hoxb8* et *IL-3* collaborent génétiquement pour accélérer l'induction de la transformation leucémique. Les souris surexprimant *Hoxb8* ou *IL-3* individuellement ont une période de latence très longue avant l'apparition de la maladie (Perkins, 1990).

Des études récentes utilisant la technique de RT-PCR semi-quantitative ont démontré que des populations de blastes leucémiques provenant de 20 patients AML, surexpriment plusieurs gènes *Hox* dont *Hoxa10*, *Hoxb3* et *Hoxb4*. Utilisant la même technique, il a été démontré que les gènes *Hox* et spécifiquement le locus *Hoxc* sont exprimés dans les lymphomes. Ainsi, les gènes *Hoxc4* et *Hoxc6* sont exprimés dans les lymphomes Hodgkiniens et *Hoxc5* est détecté au niveau des lymphomes non-Hodgkiniens.

Afin d'élucider les mécanismes d'action sous-jacents le potentiel oncogénique des gènes *Hox*, des modèles de transplantation murins ont été générés pour certains d'entre eux dont *Hoxb6*, *Hoxb8*, *Hoxa10* et *Hoxb3* (Fischbach, 2005; Thorsteinsdottir, 1997; Sauvageau, 1997; Kroon, 1998; Thorsteinsdottir, 1999).

Les translocations chromosomiques fusionnant le gène de la nucléoporine *NUP98* aux gènes *Hox* (*NUP98-Hoxd13*, *NUP98-Hoxa13*, *NUP98-Hoxa11*, *NUP98-Hoxc11* et *NUP98-Hoxc1*) (Raza-Egilnez, 1998; Taketani, 2002; La Starza, 2003; Fujino, 2002) impliquent directement les gènes *Hox* dans la transformation leucémique. Pineault et al. ont démontré que la capacité des protéines de fusion *NUP98-HOX* à induire une leucémie est déterminée par le potentiel oncogénique intrinsèque de leur partenaire *HOX* (Pineault, 2003).

Je m'intéresserai particulièrement à l'implication de *Hoxa9* dans la transformation leucémique dans les dernières parties de cette thèse.

9.1. *Hoxa9* et la transformation leucémique

En plus de son implication dans les leucémies chez l'Homme (translocation chromosomique *NUP98-Hoxa9* (Borrow, 1996; Nakamura, 1996)) et la souris (surexpression), des études d'expression récentes ont démontré que parmi 6817 gènes testés, *Hoxa9* est le seul gène dont la surexpression est corrélée à un mauvais pronostic dans les leucémies myéloïdes aiguës humaines (Golub, 1999). Les mécanismes sous-jacents le potentiel oncogénique de *Hoxa9* sera discuté ultérieurement dans le chapitre II de cette thèse.

Durant l'embryogenèse, l'expression des gènes *Hox* est maintenue par le groupe Trithorax chez la Drosophile. L'orthologue de Trithorax chez les mammifères est connu sous le nom de MLL. Ce dernier est exprimé dans le système hématopoïétique et une perturbation de son expression suite à une translocation chromosomique affecte l'expression des gènes *Hox* (Yu, 1995; Hess, 1997; Yagi, 1998). En effet, les modèles de transplantation murins surexprimant MLL-GAS7, MLL-AF1P, MLL-AF9 et le dimère MLL expriment *Hoxa9* et *Hoxa7* à des

niveaux élevés suivant les techniques utilisées (Martin, 2003). La même observation est notée pour *Hoxa9* au niveau des leucémies humaines renfermant la protéine de fusion MLL (Armstrong 2002; Yeoh, 2002; Debernardi, 2003; Ferrando et Look, 2003). Récemment, il a été démontré que le dimère MLL lie le promoteur de *Hoxa9*, établissant ainsi un lien direct entre la transformation induite par MLL et la régularisation de l'expression des gènes *Hox*. En effet, des souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse *Hoxa9*^{-/-} et surexprimant MLL-ENL ne développent pas de leucémie myéloïde aigue mais la réintroduction de *Hoxa9* induit une transformation leucémique (Ayton et Cleary, 2003). Ces résultats suggèrent que *Hoxa9* est requis pour la transformation leucémique et que l'induction leucémique médiée par MLL-ENL nécessite absolument la présence de *Hoxa9*. En revanche, chez les souris 'Knock-in' pour le gène MLL-AF9, la période de latence pour la transformation leucémique est la même en présence ou en absence de *Hoxa9*, suggérant que ce gène n'est pas essentiel pour la leucémie du modèle 'knockin' (Kumar, 2004). Cette différence observée dans les 2 expériences mentionnées, peut être due soit aux modèles utilisés (i.e. transplantation de moelle osseuse pour MLL-ENL et knock in pour MLL-AF9) soit à des différences biologiques spécifiques aux protéines de fusion.

9.2. *Meis1* et la transformation leucémique

La nature monoclonale et la longue période de latence des leucémies induites par les gènes *Hox* seuls indiquent que ces derniers doivent coopérer avec d'autres oncogènes pour la transformation aigue des cellules de la moelle osseuse. Certains collaborateurs ont été identifiés dont *IL-3* avec *Hoxb8*, *Bcr-Abl*

(Mayotte, 2002) et *Meis1* (Kroon, 1998) avec *Hox9*. Dans la dernière partie de cette thèse, je m'attarderai sur le cofacteur MEIS1.

Au début, *Meis1* a été identifié comme un gène adjacent à un site d'intégration rétrovirale commun retrouvé dans les leucémies aiguës développées chez les souris BXH-2. Des résultats de notre laboratoire ont démontré que *Meis1* collabore génétiquement avec 2 gènes *Hox* divergents soit *Hoxa9* et *Hoxb3* pour induire une leucémie myéloïde aigue dans des modèles de transplantation murins (Thorsteinsdottir, 2001). Récemment, le groupe Kamps (Wang, 2005) essayé d'élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents la transformation leucémique induite par *Hoxa9* et *Meis1*. *In vitro*, des progéniteurs immortalisés par *Hoxa9* induisent une leucémie myéloïde après une longue période de latence soit de 250 jours. La co-expression de *Meis1* accélère l'induction leucémique *in vivo*, maintient les progéniteurs multipotents et induit l'expression de la tyrosine kinase Flt3, suggérant que *Meis1* assure la survie des progéniteurs leucémiques en induisant Flt3. Le même groupe a démontré que les domaines de liaison à PBX, à l'ADN ainsi que la partie C-terminale sont requis pour le potentiel oncogénique de MEIS1 (Wang, 2005). De façon intéressante, *Prep1* (le membre le plus divergent de la famille MEIS, ne partage avec MEIS1 que les domaines de liaison à PBX et à l'ADN) à l'opposé de *Meis1*, n'accélère pas l'induction leucémique par *Hoxa9* (Thorsteinsdottir, 2001). Ces données renforcent l'hypothèse déjà proposée que MEIS1 ait d'autres fonctions que celle de retenir PBX dans le noyau et qui la distingueraient de PREP1. Cette différence impliquerait un niveau additionnel de régularisation des voies moléculaires sous-jacentes l'activité des protéines appartenant aux familles HOX et TALE. Dans les leucémies humaines, il n'est pas encore clair si la co-activation de *Hoxa9* et *Meis1* est un mécanisme

commun. Pour ceci, le groupe de Largman a criblé 24 lignées cellulaires et 80 échantillons de leucémies primaires humaines pour l'expression de *Hoxa9* et *Meis1* en utilisant les techniques d'immunohistochimie et de la 'RNase protection'. Les résultats montrent que *Hoxa9* et *Meis1* sont exprimés dans les lignées cellulaires et les leucémies primaires d'origine myéloïde uniquement (Lawrence, 1999). De plus, dans une tentative de comparer le profil d'expression des gènes entre les leucémies T-ALL caractérisées par la présence de la translocation MLL-ENL et d'autres contenant différents facteurs transcriptionnels, le groupe de Thomas Look a démontré, en utilisant les micropuces d'expression, que les leucémies MLL-ENL surexpriment les gènes homéotiques *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxc6* et le cofacteur *Meis* à un niveau plus élevé par rapport aux autres leucémies T-ALL qui ne possèdent pas cette translocation chromosomique (Ferrando, 2003). Des études récentes de Q-PCR (pour 'quantitative real-time PCR') ont démontré que les leucémies surexprimant MLL suite à une amplification de la région chromosomique 11q23 expriment *Meis1* à des niveaux élevés (Poppe, 2004). Le rôle joué par *Meis1* dans la leucémie induite par *Hoxa9* sera discuté dans le chapitre III de cette thèse.

Le cofacteur *Pbx1* n'accélère pas la leucémie induite par *Hoxa9* dans les cellules primaires de moelle osseuse surexprimant *Hoxa9* ou *Hoxb3* (Thorsteinsdottir, 2001) mais est capable de transformer les cellules de fibroblastes en collaboration avec *Hoxb3* (Kros1, 1998), suggérant que le différent contexte cellulaire utilisé dans les 2 expériences pourrait influencer le potentiel oncogénique de *Pbx1*. Chez l'humain, la translocation chromosomique t(1;19) fusionne la partie N-terminale de E2A avec la partie C-terminale de PBX1 et est retrouvée au niveau des leucémies lymphoblastiques pré-B aiguës pédiatriques. La détermination du

mécanisme d'action d'*E2A-Pbx1* a été freinée au début par l'absence d'un modèle murin reproduisant la maladie observée chez l'humain. Récemment, notre groupe a utilisé la mutagenèse par insertion provirale et les souris transgéniques *E2A-Pbx1 CD3 epsilon^{-/-}* pour générer un modèle de leucémie pré-B. Les résultats de PCR inverse montrent qu'une région de 19 kb comprise dans le locus *Hoxa*, entre les gènes *Hoxa6* et *Hoxa10* est ciblée dans 86% de ces leucémies par rapport à 17% dans les contrôles. Les niveaux d'expression des gènes du groupe *Hoxa* ont été déterminés par la technique de Q-PCR. Les résultats démontrent une augmentation de 6600x des niveaux d'expression de plusieurs gènes *Hoxa*. D'après le modèle utilisé, ces résultats suggèrent que les gènes *Hoxa* et *E2A-Pbx1* ont une collaboration fonctionnelle dans les leucémies lymphoïdes pré-B (Bijl, 2005).

10. Le complexe de remodelage de la chromatine SNF/SWI

Le complexe SNF/SWI est impliqué dans le remodelage de la chromatine et dans la régularisation transcriptionnelle. Ce complexe utilise l'énergie dérivée de l'hydrolyse d'ATP pour changer les contacts entre les histones et l'ADN (Becker, 2002; Tsukiyama, 2002; Kadam, 2002; Narlikar, 2002; Katsani, 2003; Korber, 2004; Mizuguchi, 2004). Présentement, 4 différentes classes de complexes de remodelage sont identifiées: SNF/SWI, ISWI, Mi-2 et Ino80. Chaque classe est définie par une composition unique de sous-unités et la présence d'une ATPase distincte (Becker, 2002; Tsukiyama, 2002; Eberharter, 2004). Les études récentes ont divisé le groupe des remodeleurs SNF/SWI en 2 sous-classes distinctes et hautement conservées. Une sous-famille comprend les complexes SNF/SWI de la levure, BAP de la *Drosophile* et BAF des mammifères alors que la deuxième

inclut RSC de la levure, PBAP de la Drosophile et PBAF des mammifères (Figure 1.5).

Levure		Drosophile		Humain	
SNFSWI	RSC	BAP	PBAP	BAF	PBAF
Swi2/Snf2	Sth1	Brahma	Brahma	BRG1 or h BRM	BRG1
Swi1Ard6		OSA		BAF250	
	Rsc1, Rsc2, Rsc4		Polybromo		Polybromo/BAF180
	Rsc9		BAF170		
Swi3	Rsc8	Moirra	Moirra	BAF170/BAF155	BAF170/BAF155
		BAP111	BAP111	BAF57	BAF57
Swp73	Rsc6	BAP60	BAP60	BAF60a	BAF60a ou BAF60b
Swp61/Arp7 SWp59/Arp9	Rsc11/Arp7 Rsc12/Arp9	BAP55	BAP55	BAF53	BAF53
		actine	actine	actine	actine
Snf5	Sth1	Snr1	Snr1	hSNF5/INI1	hSNF5/INI1
	Rsc5, 7 10, 13-15				
Swp82	Rsc3, Rsc30				
Swo29/Tfg3/TAF30/Anc1					
Snf6, 11					

Figure reproduite de BBA 1681, 2005

Figure 1.5. Les complexes SNF/SWI et leurs sous-unités chez la levure, la Drosophile et l'humain. Les sous-unités conservées sont groupées horizontalement, avec la sous-unité ATPase affichée en premier.

Tel que discuté dans le chapitre IV, la sous-unité BAF250 interagit avec MEIS1 dans le contexte leucémique *Hoxa9 + Meis1*. En effet, le complexe SNF/SWI est lié au cancer par les 2 évidences suivantes :

a) Des études récentes ont démontré que certains membres des complexes SNF/SWI sont fréquemment altérés ou perdus dans les cellules tumorales humaines. De façon intéressante, une réduction des niveaux d'expression de BAF250 a été démontrée dans 3/21 lignées cellulaires de cancer du sein et de

carcinome cervical. D'autres études ont démontré que la majorité des tumeurs rhabdoïdes malignes possèdent des mutations au niveau de la sous-unité centrale de SNF/SWI qui est SNF5 (Biegel, 1999; Sevenet, 1999; Versteeg, 1998). Ces mutations sont bialléliques et inactivent *Snf5*, suggérant que *Snf5* pourrait agir comme un gène suppresseur de tumeur classique obéissant à l'hypothèse de Knudson (Sevenet, 1999; Taylor, 2000). Des souris 'knockout' pour le gène *Snf5* ont été générées (Roberts, 2000). La délétion homozygote de *Snf5* résulte en une létalité embryonnaire précoce. Les souris hétérozygotes développent des tumeurs dont 15-30% ont une période de latence moyenne de 12 mois. Les tumeurs sont sujettes à une perte d'hétérozygotie pour devenir *Snf5*^{-/-}. De façon intéressante, les tumeurs développées chez les souris sont identiques d'apparence à celles retrouvées chez l'humain (Roberts, 2000). Plusieurs études se sont intéressées à élucider les mécanismes d'action de *Snf5* dans la transformation cellulaire. La réintroduction de *Snf5* dans les lignées cellulaires humaines dérivées de tumeurs rhabdoïdes malignes induit un arrêt du cycle cellulaire suite à une augmentation du niveau d'expression de INK4A. Ainsi, l'inhibition de INK4, de la CDK4 (cyclin-dépendent kinase 4) ou du rétinoblastome Rb empêche SNF5 d'induire un arrêt du cycle cellulaire (Versteeg, 2002; Betz, 2002). Ces résultats suggèrent que SNF5 peut agir en amont du Rb dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Il n'est pas encore déterminé si l'activité du gène suppresseur de tumeur *Snf5* est entièrement dépendante du complexe SNF/SWI ou si elle en possède des fonctions indépendantes. Des mutations et/ou des pertes d'expression de gènes codant pour d'autres sous-unités du complexe SNF/SWI ont été identifiées dans certaines lignées cellulaires tumorales et dans certaines tumeurs primaires. Des mutations de *Brg1* ont été documentées dans des lignées

cellulaires de cancer du pancréas, du sein, du poumon et de la prostate. De plus, 30% des lignées cellulaires humaines de cancer du poumon et 10% des tumeurs primaires sont déficientes en *Brg1* et en *Brm*. Le pronostic de ces patients est pire par rapport à ceux dont les tumeurs expriment soit *Brg1* ou *Brm*. Les souris *Brg*^{-/-} meurent au stade de blastocyste du développement embryonnaire (Bultman, 2000) mais les souris hétérozygotes *Brg*^{+/-} sont viables et normales en apparence. Cependant, elles sont susceptibles à développer des tumeurs à faible fréquence. Les souris *Brm*^{-/-} sont viables et donnent des progénitures suivant la loi de Mendel. Les souris *Brm*^{-/-} sont 15% plus grosses par rapport aux contrôles de type sauvage (Reyes, 1998). Les fibroblastes embryonnaires *Brm*^{-/-} ont un taux de prolifération élevée, suite à un défaut au niveau de la phase G0-G1 du cycle cellulaire. Ceci indique que *Brm* joue un rôle dans la régularisation du cycle et de la croissance cellulaires. Chez les souris *Brm*^{-/-} les niveaux protéiques de BRG1 sont élevés, expliquant les phénotypes modérés obtenus chez ces derniers et suggérant une redondance fonctionnelle partielle entre *Brm* et *Brg1*.

b) Plusieurs interactions ont été identifiées entre le complexe SNF/SWI et les produits des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes connus tels que : Rb, BRCA1, c-Myc et MLL.

b.1) Rb: interagit avec les sous-unités BRG1/BRM du complexe SNF/SWI pour réprimer l'activité du facteur de transcription E2F. Le complexe répresseur Rb renfermant l'histone déacétylase (HDAC) et SNF/SWI, inhibe la transcription des gènes des cyclines E et A et induit ainsi un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Zhang, 2000). La phosphorylation de Rb par la cycline D/CDK4 dissocie Rb de HDAC, favorise la transcription du gène de la cycline E par E2F et assure la progression du cycle cellulaire vers la phase S.

b.2) BRCA1: fait partie du complexe d'anémie de Fanconie. Ce dernier comprend BRG1 et FANCA et est impliqué dans la réparation des dommages causés à l'ADN (D'Andrea, 2003).

b.3) c-Myc: possède une fonction de transactivation dépendante du complexe SNF/SWI. En effet, des mutants *Brg1* ou *Snf5* abolissent la fonction de c-Myc à transactiver des gènes cibles (Park, 2002; Cheng, 1999; Amati, 2001). Le mécanisme de cette interaction fonctionnelle a été élucidé par la découverte que SNF5 rentre en compétition avec le complexe répresseur ORC (inhibe la transcription des gènes régulés par les facteurs à "E-box") pour la liaison de la partie C-terminale de c-Myc (Takayama, 2000).

b.4) MLL: recrute le complexe SNF/SWI par l'intermédiaire de son partenaire de fusion ENL qui est lui-même membre de ce complexe (Nie, 2003). Ceci a pour conséquence d'activer la transcription de gènes cibles de MLL dont *Hoxa7*.

Références

- Abu-Shaar,M., Ryoo,H.D. & Mann,R.S. Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes & Development* **13**, 935-945 (1999).
- Adolfsson,J. *et al.* Upregulation of flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* **15**, 659-669 (2001).
- Adrados,C., S.Ebbe, E.Phalen, P.Garbutt, and C.Allan. 1984. Macrocytic megakaryocytes in cultures of S1/S1d bone marrow. *Exp.Hematol.* **12**: 237-243
- Ailles,L.E., B.Gerhard, and D.E.Hogge. 1997. Detection and characterization of primitive malignant and normal progenitors in patients with acute myelogenous leukemia using long-term coculture with supportive feeder layers and cytokines. *Blood* **90**: 2555-2564.
- Akashi,K., D.Traver, T.Miyamoto, and I.L.Weissman. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**: 193-197.
- Amsellem,S. *et al.* Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nature Medicine* **9**, 1423-1427 (2003).
- Anderson,D.M. *et al.* Molecular-Cloning of Mast-Cell Growth-Factor, A Hematopoietin That Is Active in Both Membrane-Bound and Soluble Forms. *Cell* **63**, 235-243 (1990).

Anderson,D.M. *et al.* Alternate Splicing of Messenger-Rnas Encoding Human Mast-Cell Growth-Factor and Localization of the Gene to Chromosome 12Q22-Q24. *Cell Growth & Differentiation* **2**, 373-378 (1991).

Antonchuk,J., Sauvageau,G. & Humphries,R.K. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* **109**, 39-45 (2002).

Apiou,F. *et al.* Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenetics and Cell Genetics* **73**, 114-115 (1996).

Armstrong,S.A. *et al.* MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature Genetics* **30**, 41-47 (2002).

Ayton,P.M. & Cleary,M.L. Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* **20**, 5695-5707 (2001).

Bain,G. *et al.* Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity* **6**, 145-154 (1997).

Becker,A.J., McCulloch,E.A. & Till,J.E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**, 452-454 (1963).

Becker,P.B. & Horz,W. ATP-dependent nucleosome modeling. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 247-273 (2002).

Berstein E. *Nature* **409**, 363-366 (2001)

Berthelsen,J., Zappavigna,V., Ferretti,E., Mavilio,F. & Blasi,F. The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *Embo Journal* **17**, 1434-1445 (1998).

Berthelsen,J., Zappavigna,V., Mavilio,F. & Blasi,F. Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *Embo Journal* **17**, 1423-1433 (1998).

Betz,B.L., Strobeck,M.W., Reisman,D.N., Knudsen,E.S. & Weissman,B.E. Re-expression of hSNF5/INI1/BAF47 in pediatric tumor cells leads to G(1) arrest associated with induction of p16ink4a and activation of RB. *Oncogene* **21**, 5193-5203 (2002).

Bhardwaj,G. *et al.* Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nature Immunology* **2**, 172-180 (2001).

Bhatia,M. *et al.* Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine* **189**, 1139-1147 (1999).

Biegel,J.A. *et al.* Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Research* **59**, 74-79 (1999).

Bijl,J, Sauvageau,M, Thompson,A & Sauvageau,G. High incidence of proviral integrations in the Hoxa locus in a new model of E2A-Pbx1 induced B cell leukemia. *Genes Dev.* **19(2)**, 224-233 (2005)

Billeter,M. *et al.* Determination of the Nuclear-Magnetic-Resonance Solution Structure of An Antennapedia Homeodomain-Dna Complex. *Journal of Molecular Biology* **234**, 1084-1094 (1993).

Billeter,M., Guntert,P., Luginbuhl,P. & Wuthrich,K. Hydration and DNA recognition by homeodomains. *Cell* **85**, 1057-1065 (1996).

Black, BE. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8616-8624 (1999)

Blair,A., D.E.Hogge, and H.J.Sutherland. 1998. Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR-. *Blood* **92**: 4325-4335.

Blair,A., D.E.Hogge, L.E.Ailles, P.M.Lansdorp, and H.J.Sutherland. 1997. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo*. *Blood* **89**: 3104-3112.

Blair,A. and H.J.Sutherland. 2000. Primitive acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* lack surface expression of c-kit (CD 117). *Experimental Hematology* **28**: 660-671.

Bonnet,D. and J.E.Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* **3**: 730-737.

Borrow,J. *et al.* The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nature Genetics* **12**, 159-167 (1996).

Bradley,T.R. & Metcalf,D. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **44**, 287-299 (1966).

Brannan,C.I. *et al.* Steel-Dickie Mutation Encodes A C-Kit Ligand Lacking Transmembrane and Cytoplasmic Domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 4671-4674 (1991).

Braun, J.C. *Embo J.* **18**, 1953-1965 (1999)

Broudy,V.C. *et al.* Thrombopoietin stimulates colony-forming unit megakaryocyte proliferation and megakaryocyte maturation independently of cytokines that signal through the gp130 receptor subunit. *Blood* **88**, 2026-2032 (1996).

Calvi,L.M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846 (2003).

Cantor,A.B., Katz,S.G. & Orkin,S.H. Distinct domains of the GATA-1 cofactor FOG-1 differentially influence erythroid versus megakaryocytic maturation. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 4268-4279 (2002).

Chang,C.P., Brocchieri,L., Shen,W.F., Largman,C. & Cleary,M.L. Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 1734-1745 (1996).

Chang,C.P. *et al.* Meis proteins are major *in vivo* DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5679-5687 (1997).

Chang,C.P., DeVivo,I. & Cleary,M.L. The Hox cooperativity motif of the chimeric oncoprotein E2a-Pbx1 is necessary and sufficient for oncogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 81-88 (1997).

Corcoran,A.E., Riddell,A., Krooshoop,D. & Venkitaraman,A.R. Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* **391**, 904-907 (1998).

Dahl,R. & Simon,M.C. The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Molecules and Diseases* **31**, 229-233 (2003).

Dallas,P.B., Yaciuk,P. & Moran,E. Characterization of monoclonal antibodies raised against p300: Both p300 and CBP are present in intracellular TBP complexes. *Journal of Virology* **71**, 1726-1731 (1997).

Dallas,P.B. *et al.* p300/CREB binding protein-related protein BAF250 is a component of mammalian SWI/SNF complexes. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3596-3603 (1998).

Dalton, S. *Embo J.* **11**, 1797-1804 (1992)

Debernardi,S. *et al.* Genome-wide analysis of acute myeloid leukemia with normal karyotype reveals a unique pattern of homeobox gene expression distinct from those with translocation-mediated fusion events. *Genes Chromosomes & Cancer* **37**, 149-158 (2003).

Dexter,T.M., Spooncer,E., Schofield,R., Lord,B.I. & Simmons,P. Haemopoietic stem cells and the problem of self-renewal. *Blood Cells* **10**, 315-339 (1984).

DiMartino, J.F. *et al.* The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver. *Blood* **98**, 618-626 (2001).

Eaves, C.J. *et al.* Mechanisms That Regulate the Cell-Cycle Status of Very Primitive Hematopoietic-Cells in Long-Term Human Marrow Cultures .2. Analysis of Positive and Negative Regulators Produced by Stromal Cells Within the Adherent Layer. *Blood* **78**, 110-117 (1991).

Eaves, C.J. *et al.* The Human Hematopoietic Stem-Cell Invitro and Invivo. *Blood Cells* **18**, 301-307 (1992).

Ebbe, S., Phalen, E. & Stohlman, F., Jr. Abnormalities of megakaryocytes in S1-S1d mice. *Blood* **42**, 865-871 (1973).

Ebbe, S. *et al.* Functionally abnormal stromal cells and megakaryocyte size, ploidy, and ultrastructure in S1/S1d mice. *Blood Cells* **12**, 217-232 (1986).

Eberharter, A. & Becker, P.B. ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *Journal of Cell Science* **117**, 3707-3711 (2004).

Ferrando, A.A. & Look, A.T. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology* **40**, 274-280 (2003).

Fischbach, N.A. *et al.* HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor *in vitro* and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia *in vivo*. *Blood* **105**, 1456-1466 (2005).

Flanagan,J.G., Chan,D.C. & Leder,P. Transmembrane Form of the Kit Ligand Growth-Factor Is Determined by Alternative Splicing and Is Missing in the Si(D) Mutant. *Cell* **64**, 1025-1035 (1991).

Fortunel,N. *et al.* Release from quiescence of primitive human hematopoietic stem/progenitor cells by blocking their cell-surface TGF-beta type II receptor in a short-term *in vitro* assay. *Stem Cells* **18**, 102-111 (2000).

Fujino,T. *et al.* Single-translocation and double-chimeric transcripts: detection of NUP98-HOXA9 in myeloid leukemias with HOXA11 or HOXA13 breaks of the chromosomal translocation t(7;11)(p15;p15). *Blood* **99**, 1428-1433 (2002).

Gehring,W.J. *et al.* Homeodomain-Dna Recognition. *Cell* **78**, 211-223 (1994).

Giampaolo,A. *et al.* Key Functional-Role and Lineage-Specific Expression of Selected Hoxb Genes in Purified Hematopoietic Progenitor Differentiation. *Blood* **84**, 3637-3647 (1994).

Gil J & Esteban M. *Apoptosis* **5**, 107-114 (2000)

Godin,I.E., Garciaporrero,J.A., Coutinho,A., Dieterlenlievre,F. & Marcos,M.A.R. Paraaortic Splanchnopleura from Early Mouse Embryos Contains B1A Cell Progenitors. *Nature* **364**, 67-70 (1993).

Golde,D.W. The stem cell. *Sci. Am.* **265**, 86-93 (1991).

Goldman, JM. *Blood and its disorders.* London: Blackwell Scientific Publications (1982)

Golub,T.R. *et al.* Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**, 531-537 (1999).

Gregory,C.J. Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture. *J. Cell Physiol* **89**, 289-301 (1976).

Grüter, PC. *Mol. Cell* **1**, 649-659 (1998)

Guzman,M.L., D.Upchurch, B.Grimes, D.S.Howard, D.A.Rizzieri, S.M.Luger, G.L.Phillips, and C.T.Jordan. Expression of tumor-suppressor genes interferon regulatory factor 1 and death-associated protein kinase in primitive acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **97**: 2177-2179 (2001)

Guzman,M.L., S.J.Neering, D.Upchurch, B.Grimes, D.S.Howard, D.A.Rizzieri, S.M.Luger, and C.T.Jordan. Nuclear factor-kappa B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **98**: 2301-2307 (2001)

Harrison,D.E. & Zhong,R.K. The Same Exhaustible Multilineage Precursor Produces Both Myeloid and Lymphoid-Cells As Early As 3-4 Weeks After Marrow Transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10134-10138 (1992).

Henschler,R. *et al.* Maintenance of Transplantation Potential in Ex-Vivo Expanded Cd34(+)-Selected Human Peripheral-Blood Progenitor Cells. *Blood* **84**, 2898-2903 (1994).

Hess,J.L., Yu,B.D., Li,B., Hanson,R. & Korsmeyer,S.J. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* **90**, 1799-1806 (1997).

Hisa,T. *et al.* Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *Embo Journal* **23**, 450-459 (2004).

Hogge,D., S.Fanning, K.Bockhold, A.Petzer, K.Lambie, P.Lansdorp, A.Eaves, and C.Eaves. 1997. Quantitation and characterization of human megakaryocyte colony-forming cells using a standardized serum-free agarose assay. *British Journal of Haematology* **96**: 790-800.

Huang,E.J., Nocka,K.H., Buck,J. & Besmer,P. Differential Expression and Processing of 2 Cell Associated Forms of the Kit-Ligand - K1-1 and K1-2. *Molecular Biology of the Cell* **3**, 349-362 (1992).

Hsu, SIH. *Embo J.* **20**, 2273-2285 (2001).

Iscoe,N.N., J.S.Senn, J.E.TILL, and E.A.McCULLOCH. 1971. Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture: effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood* **37**: 1-5.

Izon,D.J. *et al.* Loss of function of the homeobox gene Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* **92**, 383-393 (1998).

Jacobsen,F.W., Stokke,T. & Jacobsen,S.E.W. Transforming Growth-Factor-Beta Potently Inhibits the Viability-Promoting Activity of Stem-Cell Factor and Other Cytokines and Induces Apoptosis of Primitive Murine Hematopoietic Progenitor Cells. *Blood* **86**, 2957-2966 (1995).

- Johnson,G.R. & Metcalf,D. Pure and mixed erythroid colony formation *in vitro* stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 3879-3882 (1977).
- Jones,R.J., Celano,P., Sharkis,S.J. & Sensenbrenner,L.L. 2 Phases of Engraftment Established by Serial Bone-Marrow Transplantation in Mice. *Blood* **73**, 397-401 (1989).
- Jones,R.J., Wagner,J.E., Celano,P., Zicha,M.S. & Sharkis,S.J. Separation of Pluripotent Hematopoietic Stem-Cells from Spleen Colony-Forming Cells. *Nature* **347**, 188-189 (1990).
- Kadam,S. & Emerson,B.M. Mechanisms of chromatin assembly and transcription. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 262-268 (2002).
- Kamelreid,S. & Dick,J.E. Engraftment of Immune-Deficient Mice with Human Hematopoietic Stem-Cells. *Science* **242**, 1706-1709 (1988).
- Kasper,L.H. *et al.* CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOXA9 oncogenicity. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 764-776 (1999).
- Katahira, N. *Embo J.* **18**, 2593-2609 (1999).
- Katsani,K.R., Mahmoudi,T. & Verrijzer,C.P. Selective gene regulation by SWI/SNF-related chromatin remodeling factors. *Protein Complexes That Modify Chromatin* **274**, 113-141 (2003).

Kee,B.L. & Murre,C. Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 699-713 (1998).

Kissinger,C.R., Liu,B.S., Martinblanco,E., Kornberg,T.B. & Pabo,C.O. Crystal-Structure of An Engrailed Homeodomain-Dna Complex at 2.8-A Resolution - A Framework for Understanding Homeodomain-Dna Interactions. *Cell* **63**, 579-590 (1990).

Knoepfler,P.S., Lu,Q. & Kamps,M.P. Pbx1-Hox heterodimers bind DNA on inseparable half-sites that permit intrinsic DNA binding specificity of the Hox partner at nucleotides 3' to a TAAT motif. *Nucleic Acids Research* **24**, 2288-2294 (1996).

Kondo,M., Weissman,I.L. & Akashi,K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).

Korber,P. & Horz,W. SWRred not shaken: Mixing the histones. *Cell* **117**, 5-7 (2004).

Kumano,K. *et al.* Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity* **18**, 699-711 (2003).

Kumar,A.R. *et al.* Hoxa9 influences the phenotype but not the incidence of Mll-AF9 fusion gene leukemia. *Blood* **103**, 1823-1828 (2004).

La Starza,R. *et al.* Human homeobox gene HOXC13 is the partner of NUP98 in adult acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes & Cancer* **36**, 420-423 (2003).

Lacaud,G. *et al.* Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development *in vitro*. *Blood* **100**, 458-466 (2002).

Lala,P.K. & Johnson,G.R. Monoclonal origin of B lymphocyte colony-forming cells in spleen colonies formed by multipotential hemopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **148**, 1468-1477 (1978).

Lam, E. *Embo J.* **7**, 2705-2713 (1993).

Lapidot,T. *et al.* A Cell Initiating Human Acute Myeloid-Leukemia After Transplantation Into Scid Mice. *Nature* **367**, 645-648 (1994).

Lapidot,T., C.Sirard, J.Vormoor, B.Murdoch, T.Hoang, J.Cacerescortes, M.Minden, B.Paterson, M.A.Caligiuri, and J.E.Dick. 1994. A Cell Initiating Human Acute Myeloid-Leukemia After Transplantation Into Scid Mice. *Nature* **367**: 645-648.

Larochelle,A. *et al.* Engraftment of Immune-Deficient Mice with Primitive Hematopoietic-Cells from Beta-Thalassemia and Sickle-Cell-Anemia Patients - Implications for Evaluating Human Gene-Therapy Protocols. *Human Molecular Genetics* **4**, 163-172 (1995).

Larochelle,A. *et al.* Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: Implications for gene therapy. *Nature Medicine* **2**, 1329-1337 (1996).

Lawrence,H.J. *et al.* Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* **89**, 1922-1930 (1997).

Lawrence HJ, Rosenfeld S, Cruz C, Matsukumura K, Kwong A, Komures L, Buchberg AM, Largman C. Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia* **13(12)**, 1993-1999 (1999).

Lin,H.H. & Grosschedl,R. Failure of B-Cell Differentiation in Mice Lacking the Transcription Factor Ebf. *Nature* **376**, 263-267 (1995).

Mohrmann,L., Verrijzer, CP. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *BBA* **1681**, 59-73 (2005).

Liu,X.D. *et al.* Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10669-10674 (1997).

Lyman,S.D. *et al.* Molecular-Cloning of A Ligand for the Flt3/Flk-2 Tyrosine Kinase Receptor - A Proliferative Factor for Primitive Hematopoietic-Cells. *Cell* **75**, 1157-1167 (1993).

Manz,M.G., Miyamoto,T., Akashi,K. & Weissman,I.L. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 11872-11877 (2002).

Martin,M.E. *et al.* Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* **4**, 197-207 (2003).

Mayo,M.W. and A.S.Baldwin. 2000. The transcription factor NF-kappa B: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1470**: M55-M62.

Mayotte,N., Roy,D.C., Yao,J., Kroon,E. & Sauvageau,G. Oncogenic interaction between BCR-ABL and NUP98-HOXA9 demonstrated by the use of an *in vitro* purging culture system. *Blood* **100**, 4177-4184 (2002).

McCULLOCH,E.A. 1983. Stem-Cells in Normal and Leukemic Hematopoiesis - Stratton, Henry Lecture, 1982. *Blood* **62** : 1-13.

McDevitt,M.A., Shivdasani,R.A., Fujiwara,Y., Yang,H.D. & Orkin,S.H. A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6781-6785 (1997).

McGinnis,W. & Krumlauf,R. Homeobox Genes and Axial Patterning. *Cell* **68**, 283-302 (1992).

McNiece,I. & Briddell,R. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Experimental Hematology* **29**, 3-11 (2001).

Medvinsky,A. & Dzierzak,E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* **86**, 897-906 (1996).

Medvinsky,A.L., Samoylina,N.L., Muller,A.M. & Dzierzak,E.A. An Early Pre-Liver Intra-Embryonic Source of Cfu-S in the Developing Mouse. *Nature* **364**, 64-67 (1993).

Metcalf,D., Macdonald,H.R., Odartchenko,N. & Sordat,B. Growth of mouse megakaryocyte colonies *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **72**, 1744-1748 (1975).

Metcalf,D. Clonal analysis of proliferation and differentiation of paired daughter cells: action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on granulocyte-macrophage precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 5327-5330 (1980).

Mizuguchi,G. *et al.* ATP-Driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-348 (2004).

Moretti,P. *et al.* Identification of Homeobox Genes Expressed in Human Hematopoietic Progenitor Cells. *Gene* **144**, 213-219 (1994).

Morrison,S.J. & Weissman,I.L. The Long-Term Repopulating Subset of Hematopoietic Stem-Cells Is Deterministic and Isolatable by Phenotype. *Immunity* **1**, 661-673 (1994).

Morrison,S.J., Uchida,N. & Weissman,I.L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **11**, 35-71 (1995).

Morrison,S.J., Wandycz,A.M., Hemmati,H.D., Wright,D.E. & Weissman,I.L. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* **124**, 1929-1939 (1997).

Mulder,A.H. & Visser,J.W.M. Separation and Functional-Analysis of Bone-Marrow Cells Separated by Rhodamine-123 Fluorescence. *Experimental Hematology* **15**, 99-104 (1987).

- Nakajima,H. & Ihle,J.N. Granulocyte colony-stimulating factor regulates myeloid differentiation through CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Blood* **98**, 897-905 (2001).
- Nakamura,T., Jenkins,N.A. & Copeland,N.G. Identification of a new family of Pbx-related homeobox genes. *Oncogene* **13**, 2235-2242 (1996).
- Nakamura,T. *et al.* Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nature Genetics* **12**, 154-158 (1996).
- Narlikar,G.J., Fan,H.Y. & Kingston,R.E. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**, 475-487 (2002).
- Nerlov,C., Querfurth,E., Kulesa,H. & Graf,T. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* **95**, 2543-2551 (2000).
- Neuteboom,S.T.C., Peltenburg,L.T.C., Vandijk,M.A. & Murre,C. The Hexapeptide Lfpwmr in Hoxb-8 Is Required for Cooperative Dna-Binding with Pbx1 and Pbx2 Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 9166-9170 (1995).
- Nilsson,S.K., Johnston,H.M. & Coverdale,J.A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* **97**, 2293-2299 (2001).
- Nutt,S.L., Urbanek,P., Rolink,A. & Busslinger,M. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: Difference between fetal and adult B

lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes & Development* **11**, 476-491 (1997).

Nutt,S.L., Morrison,A.M., Dorfler,P., Rolink,A. & Busslinger,M. Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *Embo Journal* **17**, 2319-2333 (1998).

Ogris, E. *J. Virol.* **67**, 1765-1771 (1993)

Ohta,H. *et al.* Polycomb group gene rae28 is required for sustaining activity of hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 759-770 (2002).

Okamura,R.M. *et al.* Redundant regulation of T cell differentiation and TCR alpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* **8**, 11-20 (1998).

Okuda,T., vanDeursen,J., Hiebert,S.W., Grosveld,G. & Downing,J.R. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**, 321-330 (1996).

Okuda,T., vanDeursen,J., Hiebert,S.W., Grosveld,G. & Downing,J.R. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**, 321-330 (1996).

Orkin,S.H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Reviews Genetics* **1**, 57-64 (2000).

Orlic,D. & Bodine,D.M. What Defines A Pluripotent Hematopoietic Stem-Cell (Phsc) - Will the Real Phsc Please Stand Up. *Blood* **84**, 3991-3994 (1994).

Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev. Cell* **8(3)**, 377-387 (2005)

Pandolfi, P.P. *et al.* Targeted Disruption of the Gata3 Gene Causes Severe Abnormalities in the Nervous-System and in Fetal Liver Hematopoiesis. *Nature Genetics* **11**, 40-44 (1995).

Owen RD., *Science* **102**, 400 (1945)

Owens, B.M. & Hawley, R.G. Hox and non-Hox homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* **20**, 364-379 (2002)

Parrish S., *et al.* *Molecular Cell* **6**, 1077-1087 (2000)

Passner, J.M., Ryoo, H.D., Shen, L.Y., Mann, R.S. & Aggarwal, A.K. Structure of a DNA-bound Ultrabithorax-Extradenticle homeodomain complex. *Nature* **397**, 714-719 (1999).

Pearsons, B.E. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2081-2095 (1991)

Perkins, A., Kongsuwan, K., Visvader, J., Adams, J.M. & Cory, S. Homeobox Gene-Expression Plus Autocrine Growth-Factor Production Elicits Myeloid-Leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8398-8402 (1990).

Perkins, A.C. & Cory, S. Conditional Immortalization of Mouse Myelomonocytic, Megakaryocytic and Mast-Cell Progenitors by the Hox-2.4 Homeobox Gene. *Embo Journal* **12**, 3835-3846 (1993).

- Phelan,M.L., Rambaldi,I. & Featherstone,M.S. Cooperative Interactions Between Hox and Pbx Proteins Mediated by A Conserved Peptide Motif. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 3989-3997 (1995).
- Pineault,N., Helgason,C.D., Lawrence,H.J. & Humphries,R.K. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Experimental Hematology* **30**, 49-57 (2002).
- PineaultN., Buske,C., Feming-Buske,M., Abramovitch,C., Rosten,P., Hogge,DE., Aplan,DD., Humphries,RK. Induction of acute myeloid leukemia in mice by the human leukemia specific fusion gene NUP98-Hoxd13 in concert with Meis1. *Blood* **101(11)**, 4529-4538 (2003)
- Piper,D.E., Batchelor,A.H., Chang,C.P., Cleary,M.L. & Wolberger,C. Structure of a HoxB1-Pbx1 heterodimer bound to DNA: Role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* **96**, 587-597 (1999).
- Pluznik,D.H. & Sachs,L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J. Cell Physiol* **66**, 319-324 (1965).
- Radomska,H.S. *et al.* CCAAT enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 4301-4314 (1998).
- Raza-Egilmez,S.Z. *et al.* NUP98-HOXD13 gene fusion in therapy-related acute myelogenous leukemia. *Cancer Research* **58**, 4269-4273 (1998).

Rekhtman,N., Radparvar,F., Evans,T. & Skoultchi,A.I. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes & Development* **13**, 1398-1411 (1999).

Reya,T. & Grosschedl,R. Transcriptional regulation of B-cell differentiation. *Current Opinion in Immunology* **10**, 158-165 (1998).

Reya,T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414 (2003).

Riley RL, Knowles J., King AM. *Exp. Hematol.* **30(12)**, 1412-1418 (2002)

Roberts,C.W.M., Galusha,S.A., McMenamin,M.E., Fletcher,C.D.M. & Orkin,S.H. Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13796-13800 (2000).

Ross,D.D., J.E.Karp, T.T.Chen, and L.A.Doyle. 2000. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* **96**: 365-368.

Sauvageau,G. *et al.* Differential Expression of Homeobox Genes in Functionally Distinct Cd34(+) Subpopulations of Human Bone-Marrow Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12223-12227 (1994).

- Sauvageau,G. *et al.* Overexpression of Hoxb4 in Hematopoietic-Cells Causes the Selective Expansion of More Primitive Populations In-Vitro and In-Vivo. *Genes & Development* **9**, 1753-1765 (1995).
- Sauvageau,G. *et al.* Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* **6**, 13-22 (1997).
- Sevenet,N. *et al.* Constitutional mutations of the hSNF5/INI1 gene predispose to a variety of cancers. *American Journal of Human Genetics* **65**, 1342-1348 (1999).
- Shen,W.F. *et al.* Hox homeodomain proteins exhibit selective complex stabilities with Pbx and DNA. *Nucleic Acids Research* **24**, 898-906 (1996).
- Shen,W.F. *et al.* AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6448-6458 (1997).
- Shen,W.F. *et al.* HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 3051-3061 (1999).
- Shivdasani,R.A., Mayer,E.L. & Orkin,S.H. Absence of Blood Formation in Mice Lacking the T-Cell Leukemia Oncoprotein Tal-1/Scl. *Nature* **373**, 432-434 (1995).
- Shivdasani,R.A. & Orkin,S.H. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* **87** , 4025-4039 (1996).
- Shultz,L.D. *et al.* Multiple Defects in Innate and Adaptive Immunological Function in Nod/Ltsz-Scid Mice. *Journal of Immunology* **154**, 180-191 (1995).

Sigvardsson,M., ORiordan,M. & Grosschedl,R. EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity* **7**, 25-36 (1997).

Simeone,A. *et al.* Sequential Activation of Hox2 Homeobox Genes by Retinoic Acid in Human Embryonal Carcinoma-Cells. *Nature* **346**, 763-766 (1990).

Simeone,A. *et al.* Differential Regulation by Retinoic Acid of the Homeobox Genes of the 4 Hox Loci in Human Embryonal Carcinoma-Cells. *Mechanisms of Development* **33**, 215-228 (1991).

Siminovitch,L., McCulloch,E.A. & Till,J.E. The distribution of Colony-forming Cells among Spleen Colonies. *J. Cell Physiol* **62**, 327-336 (1963).

Simon,J. Locking in Stable States of Gene-Expression - Transcriptional Control During Drosophila Development. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 376-385 (1995).

Sitnicka,E., Ruscetti,F.W., Priestley,G.V., Wolf,N.S. & Bartelmez,S.H. Transforming growth factor beta(1) directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* **88**, 82-88 (1996).

Small,D. *et al.* Stk-1, the Human Homolog of Flk-2/Flt-3, Is Selectively Expressed in Cd34(+) Human Bone-Marrow Cells and Is Involved in the Proliferation of Early Progenitor Stem-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 459-463 (1994).

Spangrude,G.J. *et al.* Mouse Hematopoietic Stem-Cells. *Blood* **78**, 1395-1402 (1991).

Spangrude,G.J., Brooks,D.M. & Tumas,D.B. Long-Term Repopulation of Irradiated Mice with Limiting Numbers of Purified Hematopoietic Stem-Cells - In-Vivo Expansion of Stem-Cell Phenotype But Not Function. *Blood* **85**, 1006-1016 (1995).

Steeman,S. *et al.* Identification of a conserved family of Meis1-related homeobox gene. *Genome Research* **7**, 142-156 (1997).

Stein,S., Fritsch,R., Lemaire,L. & Kessel,M. Checklist: Vertebrate homeobox genes. *Mechanisms of Development* **55**, 91-108 (1996).

Steinbach,D., W.Sell, A.Voigt, J.Hermann, F.Zintl, and A.Sauerbrey. 2002. BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* **16**: 1443-1447.

Stephenson,J.R., Axelrad,A.A., McLeod,D.L. & Shreeve,M.M. Induction of colonies of hemoglobin-synthesizing cells by erythropoietin *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **68**, 1542-1546 (1971).

Stoffel,R. *et al.* Permissive role of thrombopoietin and granulocyte colony-stimulating factor receptors in hematopoietic cell fate decisions *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 698-702 (1999).

Struhl,G. & Adachi,A. Nuclear access and action of notch *in vivo*. *Cell* **93**, 649-660 (1998).

Sutherland,H., A.Blair, S.Vercauteren, and R.Zapf. 2001. Detection and clinical significance of human acute myeloid leukaemia progenitors capable of long-term proliferation *in vitro*. *British Journal of Haematology* **114**: 296-306.

Swift,G.H. *et al.* An endocrine-exocrine switch in the activity of the pancreatic homeodomain protein PDX1 through formation of a trimeric complex with PBX1b and MRG1 (MEIS2). *Molecular and Cellular Biology* **18**, 5109-5120 (1998).

Szilvassy,S.J., Humphries,R.K., Lansdorp,P.M., Eaves,A.C. & Eaves,C.J. Quantitative Assay for Totipotent Reconstituting Hematopoietic Stem-Cells by A Competitive Repopulation Strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8736-8740 (1990).

Szilvassy,S.J., Humphries,R.K., Lansdorp,P.M., Eaves,A.C. & Eaves,C.J. Quantitative Assay for Totipotent Reconstituting Hematopoietic Stem-Cells by A Competitive Repopulation Strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8736-8740 (1990).

Takayama,M., Taira,T., Tamai,K., Iguchi-Ariga,A.M.M. & Ariga,H. ORC1 interacts with c-Myc to inhibit E-box-dependent transcription by abrogating c-Myc-SNF5/INI1 interaction. *Genes to Cells* **5**, 481-490 (2000).

Taketani,T. *et al.* Novel NUP98-HOXC11 fusion gene resulted from a chromosomal break within exon 1 of HOXC11 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Cancer Research* **62**, 4571-4574 (2002).

Taylor, M.D. *et al.* Familial posterior fossa brain tumors of infancy secondary to germline mutation of the hSNF5 gene. *American Journal of Human Genetics* **66**, 1403-1406 (2000).

Thevenin, C., Nutt, S.L. & Busslinger, M. Early function of Pax5 (BSAP) before the pre-B cell receptor stage of B lymphopoiesis. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 735-744 (1998).

Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G. & Humphries, R.K. Enhanced *in vivo* regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood* **94**, 2605-2612 (1999).

Thorsteinsdottir, U., Jerome, L., Kroon, E. & Sauvageau, G. Evidence for a mitotic clock in HSC which impairs Hoxa9-induced leukemic transformation. *Blood* **96**, 128B (2000).

Thorsteinsdottir, U., Kroon, E., Jerome, L., Blasi, F., and Sauvageau, G., 2001. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol. Cell Biol.* **21**: 224-234.

Ting, C.N., Olson, M.C., Barton, K.P. & Leiden, J.M. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* **384**, 474-478 (1996).

Tkachuk, D.C., Kohler, S. & Cleary, M.L. Involvement of A Homolog of Drosophila-Trithorax by 11Q23 Chromosomal Translocations in Acute Leukemias. *Cell* **71**, 691-700 (1992).

Toksoz, D. *et al.* Support of Human Hematopoiesis in Long-Term Bone-Marrow Cultures by Murine Stromal Cells Selectively Expressing the Membrane-Bound

and Secreted Forms of the Human Homolog of the Steel Gene-Product, Stem-Cell Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7350-7354 (1992).

Tsai,F.Y. *et al.* An Early Hematopoietic Defect in Mice Lacking the Transcription Factor Gata-2. *Nature* **371**, 221-226 (1994).

Tsai,F.Y. & Orkin,S.H. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* **89**, 3636-3643 (1997).

Tsukiyama,T. The *in vivo* functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 422-429 (2002).

Uyttendaele,H. *et al.* Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* **122**, 2251-2259 (1996).

van Oostveen,J.W., Bijl,J.J., Raaphorst,F.M., Walboomers,J.J.M. & Meijer,C.J.L.M. The role of Homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* **13**, 1675-1690 (1999).

Vanderloo,J.C.M., Vandenbos,C., Baert,M.R.M., Wagemaker,G. & Ploemacher,R.E. Stable Multilineage Hematopoietic Chimerism in Alpha-Thalassemic Mice Induced by A Bone-Marrow Subpopulation That Excludes the Majority of Day-12 Spleen Colony-Forming-Units. *Blood* **83**, 1769-1777 (1994).

Vanderlugt,N.M.T. *et al.* Posterior Transformation, Neurological Abnormalities, and Severe Hematopoietic Defects in Mice with A Targeted Deletion of the Bmi-1 Protooncogene. *Genes & Development* **8**, 757-769 (1994).

Varnum-Finney,B. *et al.* The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* **91**, 4084-4091 (1998).

Varnum-Finney,B. *et al.* Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature Medicine* **6**, 1278-1281 (2000).

Varnum-Finney,B. *et al.* Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature Medicine* **6**, 1278-1281 (2000).

Verbeek,S. *et al.* An Hmg-Box-Containing T-Cell Factor Required for Thymocyte Differentiation. *Nature* **374**, 70-74 (1995).

Verfaillie,C.M. & Miller,J.S. A Novel Single-Cell Proliferation Assay Shows That Long-Term Culture-Initiating Cell (Ltc-Ic) Maintenance Over Time Results from the Extensive Proliferation of A Small Fraction of Ltc-Ic. *Blood* **86**, 2137-2145 (1995).

Versteeg,I. *et al.* Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* **394**, 203-206 (1998).

Versteeg,I., Medjkane,S., Rouillard,D. & Delattre,O. A key role of the hSNF5/INI1 tumour suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. *Oncogene* **21**, 6403-6412 (2002).

Visser,J.W.M. & Devries,P. Isolation of Spleen-Colony Forming Cells (Cfu-S) Using Wheat-Germ Agglutinin and Rhodamine-123 Labeling. *Blood Cells* **14**, 369-384 (1988).

Vormoor, J. *et al.* Immature Human Cord-Blood Progenitors Engraft and Proliferate to High-Levels in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Blood* **83**, 2489-2497 (1994).

Walker, L. *et al.* The Notch Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors *in vitro*. *Stem Cells* **17**, 162-171 (1999).

Wang, L.C. *et al.* The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes & Development* **12**, 2392-2402 (1998).

Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. Meis1 programs transcription of FLT-3 and cancer stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus. *Blood* **106** (1), 254-264 (2005).

Wang, Q. *et al.* Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3444-3449 (1996).

Warren, A.J. *et al.* The Oncogenic Cysteine-Rich Lim Domain Protein Rbtn2 Is Essential for Erythroid Development. *Cell* **78**, 45-57 (1994).

Washburn, T. *et al.* Notch activity influences the alpha beta versus gamma delta T cell lineage decision. *Cell* **88**, 833-843 (1997).

Weinmaster, G., Roberts, V.J. & Lemke, G. A Homolog of Drosophila Notch Expressed During Mammalian Development. *Development* **113**, 199-205 (1991).

Wolberger,C., Vershon,A.K., Liu,B.S., Johnson,A.D. & Pabo,C.O. Crystal-Structure of A Mat Alpha-2 Homeodomain-Operator Complex Suggests A General-Model for Homeodomain-Dna Interactions. *Cell* **67**, 517-528 (1991).

Worton,R.G., McCulloch,E.A. & Till,J.E. Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. *J. Cell Physiol* **74**, 171-182 (1969).

Wu,A.M., Siminovitch,L., Till,J.E. & McCulloch,E.A. Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **59**, 1209-1215 (1968).

Wu,A.M., Till,J.E., Siminovitch,L. & McCulloch,E.A. Cytological evidence for a relationship between normal hemotopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* **127**, 455-464 (1968).

Wulf,G.G., R.Y.Wang, I.Kuehne, D.Weidner, F.Marini, M.K.Brenner, M.Andreeff, and M.A.Goodell. 2001. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* **98**: 1166-1173.

Yagi,H. *et al.* Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* **92**, 108-117 (1998).

Yeoh,E.J. *et al.* Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* **1**, 133-143 (2002).

Yu,B.D., Hess,J.L., Horning,S.E., Brown,G.A.J. & Korsmeyer,S.J. Altered Hox Expression and Segmental Identity in Mll-Mutant Mice. *Nature* **378**, 505-508 (1995).

Zandstra,P.W., Conneally,E., Petzer,A.L., Piret,J.M. & Eaves,C.J. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4698-4703 (1997).

Zhang,D.E. *et al.* Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 569-574 (1997).

Zhang,H.S. *et al.* Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**, 79-89 (2000).

Zhang,J.W. *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841 (2003).

Zieminvanderpoel,S. *et al.* Identification of A Gene, Mll, That Spans the Breakpoint in 11Q23 Translocations Associated with Human Leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 10735-10739 (1991).

But du projet et les objectifs

Le but de mon projet est d'élucider les mécanismes sous-jacents la transformation leucémique induite par *Hoxa9* et *Meis1*.

Les objectifs de mon étude sont les suivants:

1. Déterminer le rôle joué par *Hoxa9* dans la régularisation de l'activité des cellules souches hématopoïétiques normales

À l'aide de modèles de transplantation murins, j'ai analysé l'effet de la surexpression de *Hoxa9* sur les potentiels d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches hématopoïétiques durant la période pré-leucémique. Ce travail a été publié dans *Blood* 2002, 99(1) : 121-129.

2. Déterminer le rôle joué par *Meis1* dans la transformation leucémique en collaboration avec *Hoxa9*

Afin de déterminer si l'accélération de la transformation leucémique par *Meis1* dépend de son domaine C-terminal renfermant une activité de transactivation, j'ai évalué le potentiel oncogénique de différents mutants de *Meis1* à l'aide de modèles murins de transplantation. Ce travail a été accepté pour publication dans *Blood*.

3. Déterminer les mécanismes moléculaires de l'activité de MEIS1 dans les cellules leucémiques

Afin d'identifier de nouvelles protéines interagissant avec MEIS1 dans le contexte leucémique, j'ai utilisé le système du double hybride et criblé une librairie d'ADN complémentaire générée dans notre laboratoire à partir des cellules leucémiques *Hoxa9* + *Meis1*. J'ai identifié plusieurs partenaires dont BAF250, un membre du

complexe de remodelage de la chromatine SNF/SWI. Ensuite, j'ai généré un allèle conditionnel et plusieurs outils tels qu'un anticorps polyclonal spécifique à BAF250 et des vecteurs shARNs afin d'étudier le rôle de BAF250 dans l'hématopoïèse normale et leucémique. Ce travail est toujours en cours.

CHAPITRE II

LA SUREXPRESSON DU GÈNE *HOXA9* ASSOCIÉ À UNE LEUCÉMIE MYÉLOÏDE INDUIT UNE EXPANSION DES CELLULES SOUCHES DE LA MOELLE OSSEUSE

Publié dans Blood 99(1): 121-129, 2002

Les gènes homéotiques *Hoxa9* et *Meis1* sont impliqués dans des transformations leucémiques chez l'Homme et la souris et collaborent génétiquement pour accélérer l'induction leucémique. Mon but est de comprendre l'implication de chacun de ces gènes dans la leucémogénèse en élucidant les mécanismes moléculaires sous-jacents leur potentiel oncogénique. Des études d'expression et de fonction suggèrent que *Hoxa9* est impliqué au niveau du compartiment des cellules primitives. Le chapitre II résume les résultats d'une étude visant à élucider le rôle de *Hoxa9* au niveau des cellules souches hématopoïétiques. Aline Mamo a analysé le compartiment hématopoïétique primitif de modèles de transplantation murins surexprimant *Hoxa9* par transfert de gène à l'aide de constructions rétrovirales ainsi que le compartiment lymphoïde de souris transgéniques surexprimant *Hoxa9* au niveau des cellules B et T. Elle est responsable des résultats présentés dans les figures 2.2 et 2.3 ainsi que 50% de ceux présentés dans la figure 2.1. Unnur Thorsteinsdottir qui a passé un stage postdoctoral dans notre laboratoire, a été impliquée à élucider spécifiquement le rôle de *Hoxa9* au niveau des cellules souches hématopoïétiques en utilisant l'essai fonction de CRU. Elle est responsable des résultats de la figure 2.4 et 50% de ceux présentés dans la figure 2.1.

Résumé

Des études cytogénétiques, génétiques et fonctionnelles ont démontré un lien direct entre la dérégularisation de l'expression de *Hoxa9* et la leucémie myéloïde aigue. La surexpression de *Hoxa9* dans des cellules de moelle osseuse murine conduit à une leucémie myéloïde aigue après une période de latence de 3 à 10 mois, suggérant l'implication d'évènements génétiques additionnels précédant la transformation leucémique. Afin d'élucider le rôle de *Hoxa9* dans le développement hématopoïétique au stade pré-leucémique, nous avons généré des modèles de transplantation murins surexprimant *Hoxa9* dans des cellules primaires de moelle osseuse par transfert de gène à l'aide de constructions rétrovirales ainsi que des souris transgéniques surexprimant *Hoxa9* dans le compartiment lymphoïde. Par comparaison aux contrôles, les souris transplantées par les cellules de moelle osseuse surexprimant *Hoxa9* présentent une augmentation de 15x du nombre des cellules souches hématopoïétiques, indiquant que cet oncogène confère un avantage de prolifération aux cellules primitives. De plus, la surexpression de *Hoxa9* au niveau des cellules matures favorise la granulopoïèse. Les souris transgéniques ont un blocage partiel au niveau de la lymphopoïèse de type B (au stade des cellules pré-B). Cependant, aucune n'a présenté des anomalies détectables au niveau des cellules T et aucune n'a développé de leucémie lymphoïde pour une période d'observation de 18 mois.

Abstract

Cytogenetic, genetic and functional studies have demonstrated a direct link between deregulated *Hoxa9* expression and acute myeloid leukemia (AML). *Hoxa9* over-expression in mouse bone marrow (BM) cells invariably leads to AML within 3 to 10 months, suggesting the requirement for additional genetic events prior to AML. In order to gain further insight into how *Hoxa9* affects hematopoietic development at the pre-leukemic stage, we have engineered its over-expression in hematopoietic stem cells (HSC) using retrovirus-mediated gene transfer and generated BM transplantation chimeras, and in lymphoid cells using transgenic mice. Compared to controls, recipients of *Hoxa9*-transduced cells had a ~15-fold increase in transplantable lympho-myeloid long-term repopulating cells indicating the capacity for this oncogene to confer a growth advantage to HSC. In addition, overexpression of *Hoxa9* in more mature cells enhanced granulopoiesis and partially blocked B lymphopoiesis at the pre-B cell stage, but had no detectable effect on T lymphoid development. Interestingly, despite specifically directing high expression of *Hoxa9* in T and B lymphoid lineages, none of the *Hoxa9* transgenic mice developed lymphoid malignancies for the observation period of > 18 months

Introduction

A growing body of evidence supports a role for members of the mammalian *Hox* homeobox gene family of transcription factors in the regulation of hematopoiesis (Thorsteinsdottir, 1997). In a subgroup of human myeloid leukemias, the *HOXA9* gene is involved in a recurrent translocation between chromosomes 7 (*NUP98*) and 11 (*HOXA9*), resulting in a fusion transcript which encodes the NUP98-HOXA9 oncoprotein (Nakamura, 1996; Borrow, 1996). Recently, the expression of *HOXA9* was also shown to be the single most highly correlating factor (out of 6817 genes tested) for poor prognosis in human acute myeloid leukemia (AML) ⁴, possibly indicating a broader role for this gene in human leukemia, beyond that caused by its chromosomal translocations.

The leukemogenic potential of *Hoxa9* was directly demonstrated by the development of AML in mouse bone marrow transplantation chimeras that received a graft of primitive hematopoietic cells engineered by retroviral gene transfer to over-express *Hoxa9* (Kroon, 1998; Thorsteinsdottir, 1999). Although the latency for the development of AML in these chimeras is much shorter than reported for other similar *Hox* gene chimeras (i.e. *Hoxa10*, *Hoxb3*, and *Hoxb8*), overexpression of *Hoxa9* alone is not sufficient to induce leukemia, and additional somatic mutation(s) are needed (Thorsteinsdottir, 1999; Perkins, 1993). In leukemic transformation, genetic interactions have been demonstrated between *Hoxa9* and molecules such as *Meis1* and *E2A-PBX1* (Kroon, 1998; Thorsteinsdottir, 1999), both of which can bind DNA cooperatively with *Hoxa9* (Shen, 1997; Lu, 1995). This suggests the presence of a leukemogenic complex, which includes *Hoxa9* and, potentially some of its DNA-binding co-factors.

In normal human CD34⁺ bone marrow cells, *HOXA9* is preferentially expressed in subfractions that are highly enriched for primitive long-term culture-initiating cells (LTC-IC) or myeloid progenitor cells, and its expression is significantly reduced in the erythroid lineage (Sauvageau, 1994; Moretti, 1994). This pattern of *Hoxa9* expression is conserved in murine hematopoietic cells, with high levels detected in the Sca-1⁺ lineage negative (Lin⁻) bone marrow subpopulation that is enriched for primitive hematopoietic cells, whereas much lower levels are present in the progenitor-depleted fraction (e.g., Sca-1⁻lin⁺) (Lawrence, 1997; Pineault, 1997). *Hoxa9* is also expressed in purified subpopulations of B and T lymphoid cells, although at levels much lower than those found in primitive bone marrow cells (Lawrence, 1997).

Analysis of the *Hoxa9* null mutant mice showed that lack of *Hoxa9* caused a significant decrease in bone marrow myeloid and pre-B-cell progenitors, and *Hoxa9*^{-/-} myeloid progenitors have a blunted response to G-CSF, a growth factor known to enhance the production and release of granulocytes from the bone marrow (Lawrence, 1997). Although adult thymocyte development was only mildly abnormal in *Hoxa9*^{-/-} mice, the fetal thymus cellularity was reduced 5-10 fold, due in part to a delay in thymocyte progression from immature single positive (T cell receptor negative) to double positive (i.e., CD4⁺CD8⁺) T-cells (Lawrence, 1997; Izon, 1998). In contrast to lymphoid and myeloid progenitor cells in the *Hoxa9*^{-/-} mice, no significant decrease was detected in more primitive cells measured as day 12 CFU-S and LTC-IC (Lawrence, 1997). However, recent studies using *in vivo* competitive assay have demonstrated profound anomalies in the ability of *Hoxa9*^{-/-} hematopoietic stem cells (HSC) to efficiently compete with

wild-type cells in bone marrow transplantation experiments (Lawrence, 1998). These mice also have a prolonged suppression of hematopoiesis following sublethal irradiation and quantitative studies have indicated a 4-12-fold reduction of HSC numbers in their bone marrow (Lawrence, 1998). These data, together with preferential expression of *Hoxa9* in primitive cells, suggest a role for *Hoxa9* in the regulation of primitive hematopoietic cells.

In this paper, we use two different mouse models (i.e. transplantation chimeras and transgenics) to study the effects of *Hoxa9* over-expression on hematopoietic cells prior to the occurrence of leukemic transformation. We demonstrate, contrary to the phenotype of the *Hoxa9*^{-/-} mice (Lawrence, 1998), that both the hematopoietic stem cell and myeloid progenitor cell pools are significantly increased in the *Hoxa9* transplantation chimeras. In both models, we also show that pre-B cell progenitors are severely reduced by the over-expression of *Hoxa9*. In addition, evidence presented here suggests that in contrast to myeloid cells, lymphoid cells may be refractory to transformation induced by *Hoxa9*.

Materials and Methods

Mice

Recipients of bone marrow cells were 7-12 weeks old (C57Bl/6J x C3H/HeJ)F₁ ((B6C3)F₁) mice and donors were (C57Bl/6Ly-Pep3b x C3H/HeJ)F₁ ((PepC3)F₁) mice. All mice were bred from parental strain breeders originally obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME), maintained in microisolator cages and provided with sterilized food and acidified water at the animal facility of the Institut de recherches cliniques de Montréal. (B6C3)F₁ and (PepC3)F₁ mice are phenotypically distinguishable by their cell surface expression of different allelic forms of the Ly5 locus: (B6C3)F₁ mice are homozygous for the Ly5.2 allotype, and (PepC3)F₁ mice are heterozygous for the Ly5.1/Ly5.2 allotypes. For bone marrow transplantation procedures, lethally irradiated (900 cGy, 176cGy/min, ¹³⁷Cs gamma-rays, J.L. Sheperd, CA) (B6C3)F₁(Ly5.2) mice were injected intravenously with 2 x 10⁵ bone marrow cells from (PepC3)F₁(Ly5.1) immediately after their cocultivation with *Hoxa9* or *neo/EGFP* viral producer cells as described previously (Sauvageau, 1995).

Generation of transgenic mice

The backbone pLIT3 vector has been previously described (Hough, 1994). Briefly, a 1.4 Kb fragment from the *Hoxa9* cDNA encompassing the complete reading frame was placed under the transcriptional control of the TCR V β promoter and Ig enhancer. Sequences upstream of the *lck* gene proximal promoter were also included. The human growth hormone (*hGH*) gene with a frame shift mutation in the coding region was inserted 3' of the *Hoxa9* cDNA to provide introns that appear to enhance the transgene expression. The transgene

was injected into pronuclei of (C57Bl/6J x C3H)F₂ hybrid zygotes. Pups resulting from transplantation of injected zygotes into pseudopregnant females were analyzed for the presence of the transgene by Southern blot analysis of tail DNA hybridized with the full-length *Hoxa9* cDNA. All experiments were performed on transgenic mice backcrossed into C57Bl/6J background for at least five generations.

Retroviral generation and infection of primary bone marrow cells

The generation of the *MSCV-Hoxa9-pgk-neo* retroviral vector has been described before⁵, and the *MSCV-Hoxa9-pgk-EGFP* vector was generated by subcloning the full-length *Hoxa9* cDNA at the EcoRI site upstream of a *pgk-EGFP* cassette into the MSCV retroviral vector. High titer helper-free recombinant *MSCV-Hoxa9-pgk-neo*, *MSCV-Hoxa9-pgk-EGFP*, *MSCV-pgk-neo* and *MSCV-pgk-EGFP* retroviruses were generated and tested as previously described (Kroon, 1998). Bone marrow cells obtained from (PepC3)F₁ mice injected 4 days earlier with 150 mg per kilogram of body weight of 5-fluorouracil, were prestimulated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 15% fetal calf serum (FCS), 6 ng of murine interleukin-3 (mIL-3) per ml, 100 ng of murine Steel factor (mSF) per ml and 10 ng of human IL-6 per ml for 48 hours, and then co-cultivated on irradiated viral producer cells in the same medium with the addition of 6 µg of polybrene per ml. Loosely adherent and nonadherent cells were recovered and injected intravenously (2×10^5 cells per mouse) into (B6C3)F₁ mice or directly cultivated *in vitro* as described below. Donor derived repopulation in recipients was assessed by the proportion of leukocytes in peripheral blood, bone marrow, thymus and spleen which expressed the Ly5.1

allelic form of the Ly5 locus, using the fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-Ly5.1 antibody and flow cytometry.

Methylcellulose cultures and CRU assays

For myeloid clonogenic progenitor assays, cells were plated on 35 mm petri dishes (Corning, Fisher) in a 1.1 ml culture mixture containing 0.8% methylcellulose in alpha medium supplemented with 10% FCS (Gibco BRL), 5.7% bovine serum albumin, 10^{-5} M β -mercaptoethanol (β -ME), 1 U of human urinary erythropoietin (Epo) per ml, 10% WEHI-conditioned medium (containing 50 ng of IL-3 per ml) or 2% of spleen cell-conditioned medium (SCCM), 2 mM glutamine, 200 mg of transferrin per ml, in the presence or the absence of 1.3 mg of G-418 per ml. Bone marrow and spleen cells from the transplantation chimeras or the transgenic mice were plated at a concentration of 3×10^4 cells/ml (dish) and 2×10^6 cells/ml (dish), respectively. Colonies were scored on day 12-14 of incubation as derived from CFU-M, CFU-G, CFU-GM or CFU-GEMM according to standard criteria (Humphries, 1981). For pre-B clonogenic progenitor assays, cells were plated at a concentration of 2×10^5 cells/ml, in 0.8% methylcellulose in alpha medium supplemented with 30% FCS, 10^{-4} M β -ME and 0.2 ng of IL-7 per ml with or without 1.3 mg of G418 per ml. Pre-B colonies were scored on day 7 of incubation. Evaluation of frequency of cells with long-term repopulating potential was done using the CRU assay (Szilvassy, 1990). Technical modifications of the procedure that were applied in this study have been reported previously (Thorsteinsdottir, 1999). Briefly, bone marrow cells from primary *Hoxa9-EGFP* or *EGFP* (Ly5.1⁺) mice, sacrificed at 4 weeks post transplantation, were injected into lethally irradiated B6C3 (Ly5.1⁻) mice at

varying dilutions (3×10^3 - 5×10^6 bone marrow cells) along with 1×10^5 helper bone marrow cells from normal B6C3 (Ly5.1⁻) mice. The level of lymphoid and myeloid repopulation with Ly5.1⁺ donor-derived cells in these secondary recipients was evaluated at 16 weeks after transplantation by FACS analysis of their peripheral blood. Recipients with greater than 2% donor-derived peripheral blood lymphoid and myeloid leukocytes were considered to be repopulated by at least one CRU.

***In vitro* long-term culture assays for B-cells**

The frequency of primitive lymphoid B-cells was determined with a limiting dilution analysis in the Whitlock-Witte *in vitro* culture system as described (Whitlock, 1982). Briefly, total bone marrow cells from control or *Hoxa9* transgenic mice were cultured for three weeks on S17 stromal cells in RPMI medium containing 5% pre-selected FCS, 5×10^{-5} M β -ME and 50 μ g of gentamicin per ml, and at concentrations ranging from 500 to 20000 bone marrow cells/well. After three weeks each well was scored for the presence of non-adherent cells of B-cell origin. To confirm the B-cell origin of each culture, cells from multiple wells were stained with B220 and Mac-1 and analyzed by FACS. The frequency of the WW-IC was then calculated by applying Poisson statistics to the proportion of negative wells at different dilutions.

Southern and Northern blot analysis

High-molecular weight DNA isolated from bone marrow, spleen and thymus of the transplantation chimeras was digested with *KpnI* which cuts in the long terminal repeats (LTR) to release the proviral genome or with *EcoRI* or *NcoI* to

cut the provirus once to release DNA fragments specific to the proviral integration site(s). The genotyping of the *Hoxa9* transgenic mice was done by digesting genomic tail DNA with *Bgl*II. Total cellular RNA was isolated with the TRIzol reagent (Gibco, BRL) and northern blot analysis performed as described (Kroon, 1998). The probes used were a *Xho*I/*Sal*I fragment of pMC1neo, the EGFP cDNA or the full-length 1.4 Kb *Hoxa9* cDNA which had been labeled with ³²P by random primer extension. To assess the relative amounts of total RNA loaded, membranes were probed for 18S RNA using end-labeled oligonucleotide 5'- ACG GTA TCT GAT CGT CCT CGA ACC -3'.

Protein analysis

Preparation of cellular extracts of spleen (S) and thymus (T) derived from transgenics *Hoxa9* or control mice and western analyses were performed as described (Thorsteinsdottir, 1999). Briefly, 80µg of proteins were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to Immobilon P membranes (Millipore, Bedford, MA) and then probed with polyclonal rabbit N-terminal *Hoxa9* antibody (128-162 a.a.), kindly provided by Dr. Takuro Nakamura, or with the monoclonal antibody PTP1D (Transduction Laboratories, Mississauga, ON). Bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Sigma, St-Louis, MO) followed by enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham, Buckinghamshire, UK).

Results

Generation of bone marrow transplantation chimeras engineered to over-express *Hoxa9* in hematopoietic stem cells

In two separate experiments, bone marrow transplantation chimeras were generated with donor cells derived from congenic mice (Ly5.1⁺), and engineered by retroviral gene transfer to over-express *Hoxa9* (or a control "empty" vector) in primitive bone marrow cells. In both experiments, Murine Stem Cell Virus (MSCV) vectors were preferred over other Moloney-based retroviral vectors because the MSCV long-terminal repeats (LTR) are modified to ensure high and persistent expression levels of the transgene in stem cells as well as in myeloid and lymphoid cells. In fact, one crucial aspect of the experimental selection of MSCV was the observation that the LTR of the parental virus (PCMV) in contrast to that of Mo-MuLV is functional in ES cells due to sequences found in the the 5' untranslated region of the LTR that makes them independent of the chromosomal site of integration (Grez, 1990; Pawliuk, 1994). The MSCV vectors used in these experiments contained two different selectable markers, i.e. the *neo^r* or the Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) (Fig. 2.1A). The two experiments also differed in the dose of cells transplanted, with mice in the second experiment receiving a 10-fold higher number of *Hoxa9*-transduced cells than those in experiment 1 (Table I).

Table I. Absolute numbers of untransduced and transduced myeloid colony forming cells (CFC)* transplanted per mouse.

Mouse group (n)	Number of myeloid CFC injected/mouse (x10 ²) [‡]	
	Untransduced	G418 ^r or EGFP ⁺
<i>Experiment 1</i>		
Neo (4)	80	50
Hoxa9 (4)	65	45
<i>Experiment 2</i>		
EGFP (4)	180	360
Hoxa9-EGFP (4)	200	470

**The number of transduced HSC injected per mouse can be estimated based on our previous results which determined the frequency of LTRC at 1 per 100 CFC¹⁸, and estimation of gene transfer to LTRC equal to that of CFC²²*

‡The number of transduced CFC injected per mouse was determined as follows: (number of bone marrow cells injected per mouse) X (CFC frequency in the injected bone marrow inoculum) X (% of CFC resistant to G418 or EGFP⁺).

As previously reported, over-expression of *Hoxa9* eventually leads to AML in the transplantation chimeras (Kroon, 1998; Thorsteinsdottir, 1999), and recent studies indicated that the time to leukemia onset is directly related to the dose of *Hoxa9*-transduced cells in the initial transplantation inoculum (U.T. and G.S., manuscript in preparation). To ensure that the effects of *Hoxa9* over-expression on hematopoietic regeneration would be assessed prior to the occurrence of leukemic transformation, bone marrow transplantation chimeras from experiments 1 and 2 were analyzed at 8 and 4 weeks post-transplantation, respectively. High levels of donor-derived repopulation (>85% Ly5.1⁺ cells) were detected in the peripheral blood, bone marrow, thymus and spleen in both groups

of chimeras, and Southern blot analysis of DNA isolated from these same tissues demonstrated significant contribution to this regeneration by transduced cells (Fig. 2.1B, upper panel). Clonal analysis performed with the same DNA, but digested with a restriction enzyme which cuts once in the integrated proviral DNA, indicated that numerous transduced clones contributed to both lymphoid (thymus and/or spleen) and myeloid (bone marrow) reconstitution in the *Hoxa9* and control mice (Fig. 2.1B, left side of lower left panel). Furthermore, the level of polyclonality was clearly related to the dose of transduced cells transplanted in each group of chimera, with the *Hoxa9-EGFP* mice receiving the higher dose and being repopulated by a higher number of clones (Fig. 2.1B, left side of lower right panel). Northern blot analysis of RNA extracted from these same organs demonstrated the high expression levels of the LTR-derived messenger RNA (Fig. 2.1C).

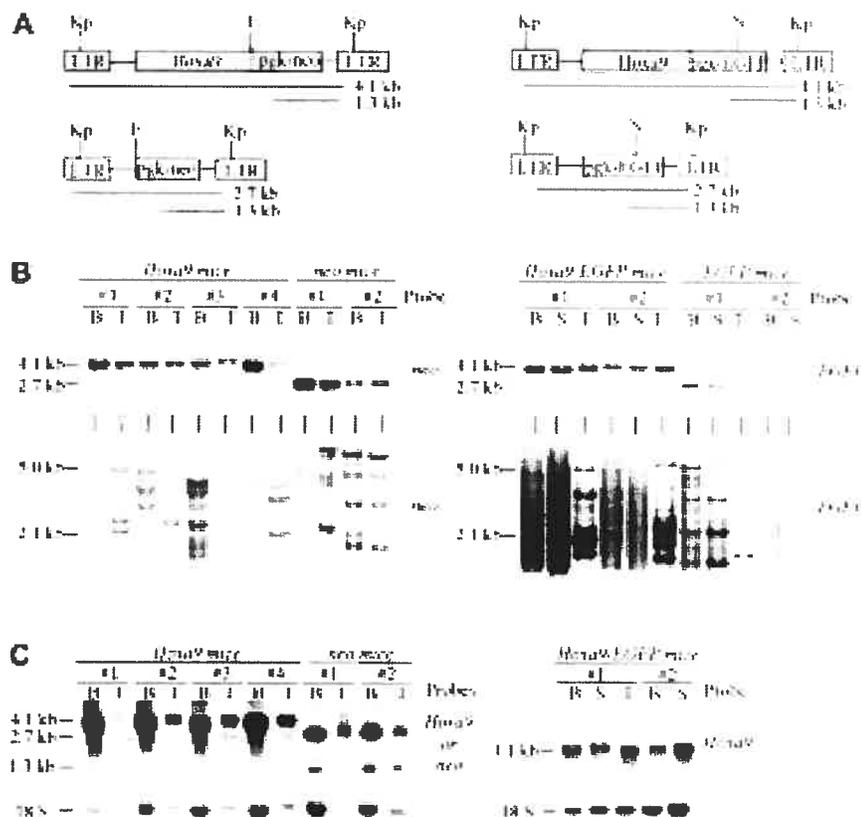


Figure 2.1. Demonstration of high level regeneration of transplantation chimeras by retrovirally transduced cells. (A) Diagrammatic representation of the integrated *Hoxa9* and control proviruses used in this study. The expected sizes of the full-length LTR and *pgk* driven viral transcripts are shown. Restriction sites indicated are *KpnI* (Kp), *EcoRI* (E) and *NcoI* (N). (B) Southern blot analyses of genomic DNA isolated from the bone marrow, spleen and thymus of *Hoxa9* and control chimeras. DNA was digested with *KpnI* to release the integrated *Hoxa9-neo* (4.1 kb), *Hoxa9-EGFP* (4.1 kb) *neo* (2.7 kb) and *EGFP* (2.7 kb) control viruses (upper panel). The DNA was also digested with either *EcoRI* or *NcoI*, that cuts the integrated *Hoxa9* and *neo* or the *Hoxa9-EGFP* and *EGFP* proviruses once, respectively, thus generating a unique fragment for each proviral integration site (lower panel). The membranes were hybridized with a *neo* probe to detect the *Hoxa9-neo* and *neo* proviruses and an *EGFP* probe to detect *Hoxa9-EGFP* and *EGFP* proviruses. (C) Northern blot analysis of total RNA (10 μ g) isolated from bone marrow, thymus and/or spleen of some of the mice described in B. The *Hoxa9* probe detects the expected viral LTR driven *Hoxa9* messages and the *neo* probe both the LTR and *pgk* driven viral messages, as depicted in (A). Abbrev: B, bone marrow; S, spleen; T, thymus.

Enhanced myelopoiesis and suppression of B lymphopoiesis by overexpression of *Hoxa9*

For all of the *Hoxa9* mice analyzed at 4 or 8 weeks post-transplantation (Table I), their bone marrow and thymic cellularity were within the normal range, whereas their spleens were mildly enlarged ($0.15 \pm 0.03\text{g}$ for *Hoxa9* vs. $0.09 \pm 0.01\text{g}$ for controls). FACS analysis indicated that the relative and absolute numbers of mature myeloid cells (Mac1^+) were slightly increased in the peripheral blood, bone marrow and spleen of all *Hoxa9* chimeras (Fig. 2.2A and data not shown). Morphological evaluation of cell preparations from these organs indicated an increase in cells of the granulocyte lineage (data not shown). This effect of *Hoxa9* on the myeloid lineage is further evidenced by detection of much higher proportion of EGFP-expressing Mac1^+ cells (mostly granulocytes by morphology) in the *Hoxa9-EGFP* chimeras than in the control *EGFP* mice (Fig. 2.2A). Importantly, this “enhancing” effect of *Hoxa9* appeared specific to the granulocytic lineage. This was evident by similar (or lower) proportions of EGFP expressing cells in lymphoid lineages of *Hoxa9* chimeras when compared to those detected in the control mice (see Fig. 2.2A for B-cells [B220^+] and data not shown for T cells [both CD4^+ and CD8^+]).

Consistent with the increase in mature myeloid cells, total myeloid progenitor numbers were increased both in the bone marrow and even more in the spleen of the *Hoxa9* chimeras (Fig. 2.2B). Most importantly, this elevation was largely caused by an increase in the absolute numbers of CFU-GM and –GEMM, most of which were either resistant to G418 (Fig. 2.2B and 2.2C) or expressed EGFP (data not shown). Together, these results suggest that the elevation in the

number of mature granulocytes in the *Hoxa9* chimeras is due to a significant increase in their progenitor cell numbers.

IL-7 responsive pre-B-cell progenitors (lymphoid pre-B) were also evaluated in the bone marrow of *Hoxa9* mice. In contrast to the increase in *Hoxa9*-transduced myeloid progenitors, the total number of pre-B lymphoid progenitors was slightly reduced in *Hoxa9* mice and virtually none were derived from *Hoxa9*-transduced cells (G418 resistant or EGFP⁺) (Fig. 2.2B and data not shown). In addition, the few *Hoxa9*-transduced pre-B colonies detected were also smaller in size than either untransduced or neo-transduced pre-B colonies (data not shown). This suggests that while enhancing myelopoiesis, *Hoxa9* may selectively inhibit proliferation of pre-B progenitors. Since transplantation chimeras contain both *Hoxa9*-transduced and untransduced hematopoietic cells that can contribute to B lymphopoiesis, further analysis of this *Hoxa9*-induced B-cell defect was carried out in transgenic mice engineered to specifically express *Hoxa9* in B and T lymphoid cells.

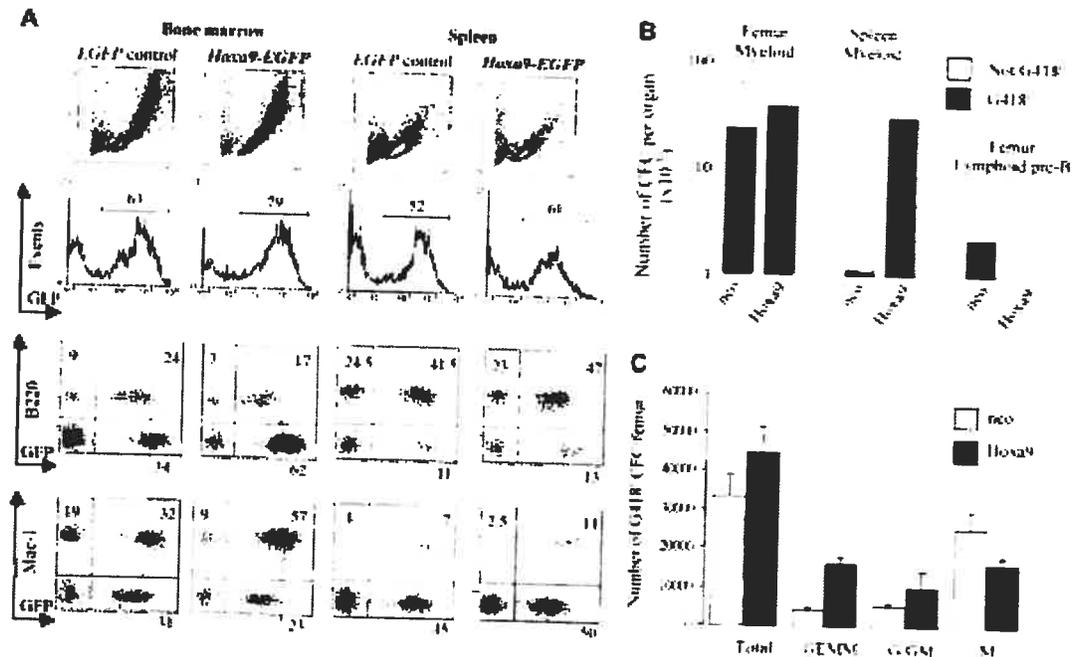


Figure 2.2. Overexpression of Hoxa9 in the transplantation chimeras enhances myelopoiesis and suppresses B-lymphopoiesis. (A) Flow cytometric analysis of hematopoietic cells from bone marrow and spleen of representative EGFP control and Hoxa9-EGFP mice four weeks after transplantation. For all dot-plot analysed, EGFP expression is shown on the X-axis and that of Mac1 or B220 on the Y-axis. Hoxa9 over-expression led to a significant increase in mature GFP⁺/Mac1⁺ myeloid cells ($p = 0.02$) in the bone marrow (Mac1⁺ myeloid cells ranged between 53%-56% as compared to 32%-38% for control GFP mice, $n = 3$ per group, $p = 0.02$) and a decrease in GFP⁺/B220⁺ (range 13%-25%) for Hoxa9 mice as compared to GFP controls (range 24%-38%, $p = 0.05$). (B) Results shown are the means \pm standard deviation (SD) of the numbers of transduced (G418^R) and untransduced in vitro myeloid colony forming cells (CFC) in bone marrow and spleen, and of bone marrow pre-B CFC in $n=4$ neo and $n=4$ Hoxa9 chimeras. (C) Analysis of the types of transduced (G418^R) myeloid CFC present in the bone marrow of Hoxa9 and neo chimeras. Well-isolated day 12 G418^R colonies were randomly picked and examined after Wright-Giemsa staining. Results are expressed as the means \pm SD of the colony types generated from bone marrow of $n=4$ Hoxa9 and $n=4$ neo chimeras (20 colonies analyzed for each mouse). The granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte (GEMM) and granulocyte and granulocyte-macrophage (G/GM) colonies were significantly increased and the macrophage (M) significantly decreased, in the Hoxa9 mice compared to the neo control mice.

Regulated expression of *Hoxa9* is required for normal B lymphopoiesis

Two different lines of *Hoxa9* transgenic mice (*Hoxa9-12* and *Hoxa9-15*) were produced using the pLIT3 vector, which was engineered to contain a number of lymphoid-specific regulatory elements (Hough, 1994; Hough, 1996) (Fig. 2.3A). Previous expression studies have demonstrated that this vector directs high expression of the transgene in early and late B (pro-B to mature peripheral B cells) and T cell populations (double negative [CD8⁻CD4⁻] to single positive [CD8⁺ or CD4⁺]) (Hough, 1994; Hough, 1996). In agreement with these studies, RNA levels of the *Hoxa9* transgene were detected in the spleen (highest levels), thymus and bone marrow of the two *Hoxa9* transgenic lines (Fig. 2.3B). *Hoxa9* protein levels were higher in the spleen of these transgenics than in controls (Fig. 2.3C). In thymus, HOXA9 protein levels were not detected. One possibility could be related to our experimental conditions, the other one could suggest possible post-transcriptional modifications that need to be tested further.

The effect of *Hoxa9* on B lymphopoiesis was analyzed in 3-4 month old transgenic mice and their littermate controls. In accordance with the *Hoxa9* transplantation chimeras, the numbers of IL-7 responsive bone marrow pre-B progenitor cells were severely affected in both *Hoxa9* transgenic lines (Fig. 2.3D). Furthermore, these transgenic pre-B progenitor cells also gave rise to much smaller colonies *in vitro*, demonstrating their reduced proliferative potential (data not shown). To determine whether more primitive cells of the B lineage were also affected in these mice, limiting dilution analysis was used to evaluate the number of bone marrow cells capable of initiating long-term B-cell cultures (Whitlock-Witte-initiating cells or WW-IC (Whitlock, 1982)). The results failed to identify a

decline in the number of WW-IC in the bone marrow of both *Hoxa9* lines (Fig. 2.3D). Since the experimental conditions necessary to purify WW-IC are still undefined, it cannot be excluded that absent or low transgene expression in WW-IC is (in part) responsible for these results. The mature B-cell output per single WW-IC was also evaluated both quantitatively and qualitatively by FACS analysis. Each WW-IC from the *Hoxa9* transgenics generated similar numbers of cells, most of which were B220⁺IgM⁺, demonstrating that the *in vitro* proliferation and differentiation potential of their WW-IC was not different from that of their control littermates (Fig. 2.3E). These results indicate that high levels of *Hoxa9* are selectively non permissive to a subset of B-cell progenitor(s) that are detected by *in vitro* culture conditions, containing high levels of IL-7. This incomplete block in B-cell development at the stage of pre-B progenitors did not translate into reduced levels of mature B-cells in the bone marrow or spleen of *Hoxa9* transgenics (Fig. 2.3F).

In contrast to the *Hoxa9* transplantation chimeras, there was no increase in bone marrow or spleen myeloid CFU-GM or CFU-GEMM (Fig. 2.3D), or in the numbers of mature granulocytes in these *Hoxa9* transgenic mice (Fig. 2.3F). This is consistent with the selective expression of the transgene in the lymphoid compartment. Importantly, these results also excluded enhanced granulopoiesis as a contributing factor for the development of the above-described B-cell phenotype (either in *Hoxa9* transgenic mice or transplantation chimeras).

Both lines of *Hoxa9* transgenic mice have now been monitored for >18 months (n=9 mice) and none of these mice have spontaneously developed any hematological malignancies.

Together these results and those presented above for the transplantation chimeras clearly indicate that inappropriately high levels of *Hoxa9* expression perturb normal regulation of myeloid and pre-B lymphoid progenitor cells.

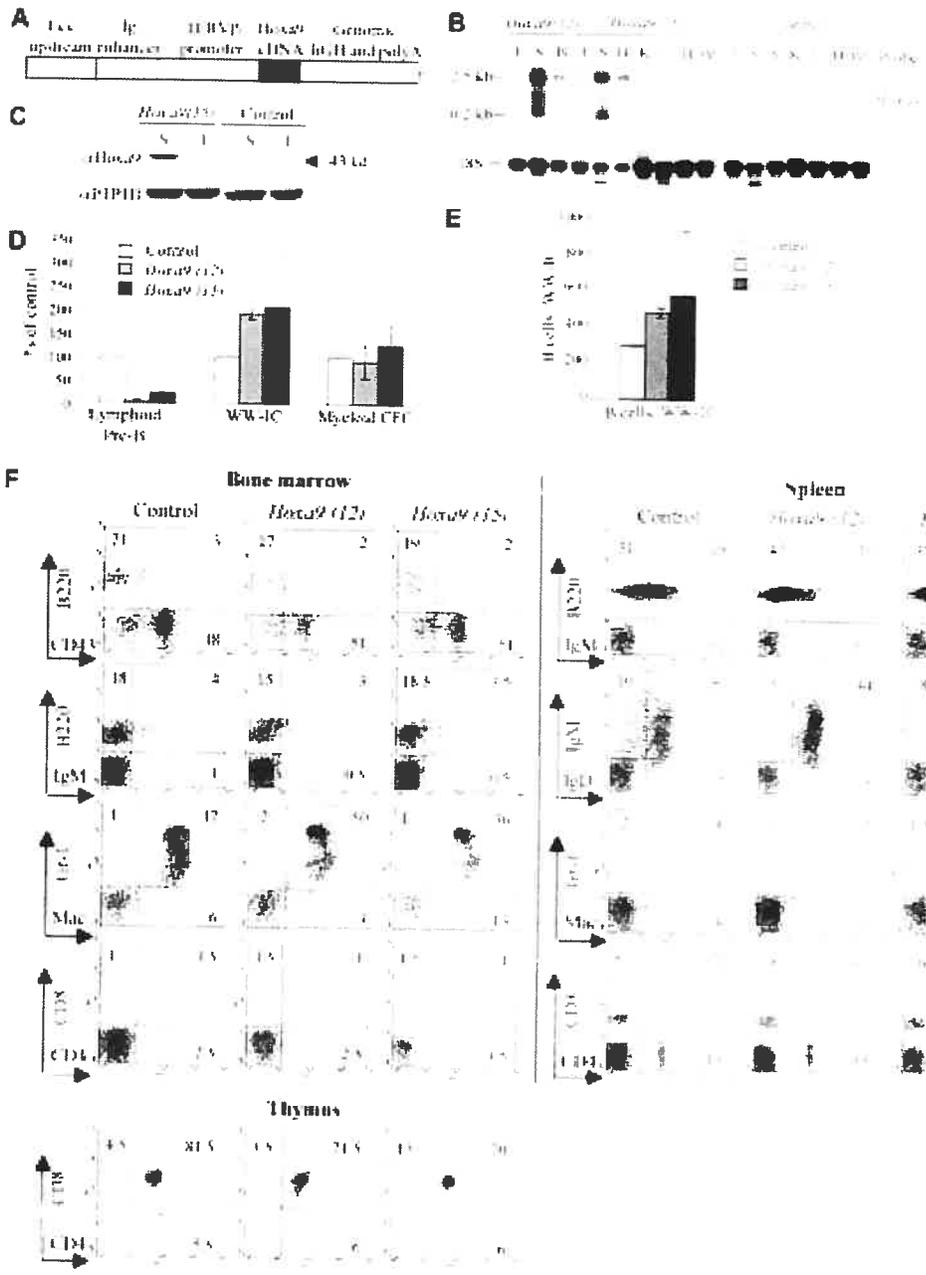


Figure 2.3. The numbers of lymphoid pre-B CFC are severely reduced in Hoxa9 transgenic mice. (A) Diagrammatic representation of the integrated Hoxa9 containing pLIT3 vector. This vector contains the full-length Hoxa9 cDNA, whose transcription is driven by the TCRV β gene, coupled to the μ IgH chain enhancer and a fragment of the lck gene proximal promoter¹⁹. Sequences from the hGH gene, including splice sites and polyadenylation signal, are downstream of the Hoxa9 cDNA, and are included in the primary transcript. (B) Total cellular RNA (10 μ g) from the indicated tissues of homozygous mice from the two Hoxa9 transgenic lines (12 and 15) and control littermates were analyzed by northern blot for the expression of the Hoxa9 transgene using the full-length Hoxa9 cDNA as a probe. The expected 2.5 kb transgene transcript is mainly detected in bone marrow (B), spleen (S) and thymus (T), with low expression in lung (L), but is non-detectable in the kidney (K), heart (H) and brain (Br) tissues. A smaller transcript of 0.2 kb was detected in the spleen of both transgenic Hoxa9 lines. (C) Western blot analyses of total cell extracts from spleen (S) and thymus (T) obtained from transgenic Hoxa9 and control mice. Hoxa9 (upper panel) and PTP1D (loading control, bottom panel) levels are shown. (D) Evaluation of the numbers of lymphoid pre-B CFC, WW-IC and myeloid CFC in bone marrow of homozygous Hoxa9 transgenic mice. Results (mean \pm SD) indicate percentages compared to controls (set at 100%), for n=3 Hoxa9-12 and n=3 Hoxa9-15 transgenic mice. (E) WW-IC derived B220⁺ cells (at limiting dilution) were counted at day 21 of culture are not statistically different ($P < 0.13$, one-tailed Student's t-test with unequal variance, n=4 mice in each group) between transgenics and controls. (F) Flow cytometric analysis of bone marrow, spleen and thymic cells from the homozygous Hoxa9 transgenic mice.

Enhanced CRU pool size in recipients of *Hoxa9*-transduced cells

Based on the preferential expression of *Hoxa9* in primitive hematopoietic cells and the finding that HSC numbers in *Hoxa9* homozygous mutant mice are severely reduced (Lawrence, 1998), we sought to test the hypothesis that over-expression of *Hoxa9* in primitive bone marrow cells might lead to expansion of their pool size.

The HSC numbers in recipients of control and *Hoxa9*-transduced bone marrow cells were determined using the Competitive Repopulation Unit (CRU) assay previously validated to detect HSC based on their functional definition i.e., being capable of both lymphoid and myeloid differentiation as well as long-term repopulation in transplanted mice (here secondary mice, see Materials and Methods). At 4 weeks post transplantation, the CRU frequency in bone marrow of *Hoxa9* chimeras was increased ~15-fold over that measured for control chimeras sacrificed at the same time and generated with equivalent numbers of EGFP-transduced CRU (Fig. 2.4A). *Hoxa9*-induced expansion of CRU was confirmed at numerous time points following bone marrow transplantation in several independent experiments (U.T. and L.J., unpublished observations).

The expression of *EGFP* that was detected in hematopoietic cells of secondary *Hoxa9-EGFP* chimeras, positive for long-term donor-derived repopulation (Ly5.1⁺) in the CRU assay (Fig. 3.4B, percentages shown below blots and data not shown), demonstrates that the enhanced CRU regeneration in the *Hoxa9-EGFP* mice was indeed caused by transduced cells. A more definitive proof of this was obtained by Southern blot analysis of proviral integration sites in DNA isolated from hematopoietic tissues of secondary recipients from a

representative primary *Hoxa9-EGFP* (Fig. 2.4B). This analysis detected numerous *Hoxa9*-transduced clones, some of which had both lymphoid (thymus) and myeloid (bone marrow) repopulating potential (i.e., totipotent, Fig. 2.4B mice 1.A3, 1.A4, 1.A7 and 1.A8). In contrast to the *Hoxa9-EGFP* mice, similar analysis of the secondary recipients of the control *EGFP* mice (i.e., *EGFP* expression and clonality by proviral integration) only detected *EGFP*-transduced clones in the secondary recipients receiving the highest number (5×10^6 bone marrow cells) of donor cells (Fig. 2.4C and data not shown). Furthermore, as might be expected from previous studies (Jordan, 1990), only few totipotent *EGFP*-transduced clones could be detected in the secondary recipients of one of the control mice (Fig. 2.4C). Thus *Hoxa9* over-expression greatly enhances the regenerative potential of CRU (HSC) following bone marrow transplantation.

Self-renewal divisions of *Hoxa9*-over-expressing HSC (same totipotent clone detected in two or more secondary mice) could not be demonstrated in these mice likely because the transplantation dose was too high. However, self-renewal could be shown using another cohort of primary mice where each mouse was initially injected with only ~ 6 *Hoxa9*-transduced cells (Fig. 2.4D). Analysis of proviral integration sites by Southern blot analysis of DNA isolated from secondary recipients of one of these primary *Hoxa9-EGFP* mice detected four totipotent *Hoxa9*-transduced clones (Fig. 2.4D, "a", "b", "c" and "d"). Each of these four clones could be detected in two or more secondary recipients, thus demonstrating their self-renewal in the primary *Hoxa9-EGFP* mouse (Fig. 2.4D). For example, the totipotent clone "a" is detected in six secondary mice (i.e. mice 2.A1, 2.A2, 2.A3, 2.A4, 2.A6 and 2.A8), clone "b" in three (2.A1, 2.A2 and 2.A3) and clone "c" and "d" in two (2.A4 and 2.A5).

At limiting dilution (e.g., where only one transduced CRU is actively contributing to repopulation in a secondary recipient), it is possible to estimate the proliferative potential of individual CRU, whether transduced or not by *Hoxa9*. This is done by measuring the level of donor-derived repopulation for lymphoid and myeloid cells in these selected mice. Donor-derived repopulation (i.e., %Ly5.1-positive cells) was similar between secondary recipients of one *Hoxa9* or *EGFP*-transduced-CRU (from 2-5%). This indicates that overexpression of *Hoxa9* enhances CRU regeneration *in vivo* but does not enhance the mature end cell output of individual CRU.



% EGFP⁺ PHL cells

4 8 6 11 2 D % EGFP⁺ PHL cells 31 11 18 8 12 5 1 3

Figure 2.4. Overexpression of Hoxa9 enhances self-renewal divisions of HSC.

(A) Evaluation of HSC numbers in bone marrow of Hoxa9-EGFP and EGFP chimeras using the CRU assay. Results are expressed as the mean \pm SD of the CRU numbers in one femur of Hoxa9-EGFP ($n=2$) and EGFP chimeras ($n=2$) described in Table I. (B), (C) and (D) show Southern blot analyses of proviral integration patterns in DNA isolated from bone marrow and thymus of the secondary recipients of: (B) primary Hoxa9-EGFP (mouse Hoxa9-EGFP#1, Fig. 1B); (C) primary EGFP mouse (mouse EGFP#1, Fig. 1B) and (D) from a primary Hoxa9-EGFP recipient receiving a lower dose on transduced cells (clonal analysis of this primary is not available). Secondary recipients were used to quantitate the CRU numbers and were all sacrificed at 16 weeks post transplantation. The DNA was digested with NcoI, which cuts once in the integrated provirus, generating a DNA fragment specific for each proviral integration site. The membranes were hybridized with an EGFP-specific probe to detect proviral fragments. Each secondary mouse is identified with a number. The number of bone marrow cells, as well as the estimated number of CRU cells received by each secondary recipient is indicated above the blots. The percentages of EGFP expressing peripheral white blood cells in each of the secondary mice at 16 weeks after transplantation is indicated below each blot. The level of donor-derived (i.e. Ly5.1⁺) peripheral blood leukocyte repopulation in these secondary mice shown were as follows: In (B) 1.A1 (72%), 1.A2 (66%), 1.A3 (42%), 1.A4 (57%), 1.A5 (20%), 1.A6 (44%), 1.A7 (30%), 1.A8 (11%), 1.A9 (12%), 1.A10 (8%), in (C) 1.E1 (11%), 1.E2 (14%), 1.E3 (10%), 1.E4 (15%), 1.E5 (5%), 1.E6 (0.5%) and in (D) 2.A1 (55%), 2.A2 (25%), 2.A3 (47%), 2.A4 (12%), 2.A5 (15%), 2.A6 (11%), 2.A7 (5%), 2.A8 (8%). The criteria used to define each stem cell clone are as follow: i) same pattern of proviral integration in thymus (T cells) and bone marrow (myeloid and B cells); ii) for clones containing more than one integrated provirus (e.g. clone "a"), each band must be of the same intensity and always be transmitted together (e.g. clone "a" in mouse 2.A3, 2.A1, 2.A8 and 2.A2 has 4 integrated provirus; clone "b" also present in bone marrow of mouse 2.A2 is different because it does not always transmit with clone "a", see thymus in mouse 2.A1 or mouse 2.A8 for examples). Abbrev: B, bone marrow; T, thymus; PBL, peripheral blood leukocytes.

Discussion

In the studies presented here, we demonstrate that over-expression of *Hoxa9* greatly enhances HSC regeneration in transplantation chimeras. Increased *Hoxa9* levels also lead to the expansion of myeloid colony-forming cells resulting in a net increase of mature granulocytes present in these chimeras. In contrast to myeloid cells, over-expression of *Hoxa9* was also shown to induce a partial block in B lymphopoiesis at the pre-B progenitor stage. These data, together with preferential expression of *Hoxa9* in primitive hematopoietic cells (Sauvageau, 1994) and the reduction in stem cell numbers in *Hoxa9* homozygous mutant mice (Lawrence, 1998) suggest that this gene might qualify as a regulator of primitive hematopoietic cells.

A variety of transcription factors such as SCL and AML-1 initially identified by their involvement in human leukemia-associated chromosomal rearrangements (Begley, 1999; Miyoshi, 1991), were later demonstrated by gene targeting to be key regulators of HSC proliferation and differentiation (Okuda, 1996). The involvement of such transcription factors in leukemic transformation highlights the link between HSC (their properties and specific genes they express) and leukemic transformation. One could thus hypothesize that factors which regulate HSC function might have targets in common with those involved in leukemic transformation. The evidence that *Hoxa9* is involved in chromosomal translocations in human leukemias and that its levels regulate stem cell numbers suggest that *Hoxa9* may perform critical roles in primitive bone marrow cells.

Intriguingly, over-expression of *Hoxb4* in a similar transplantation model has also been observed to lead to marked enhancement in the regenerative potential of HSC (Sauvageau, 1995). However, in sharp contrast, over-expression

of *Hoxb4* did not perturb differentiation of myeloid or lymphoid progenitors *in vivo* and did not change the proportion of mature cells in the various hemopoietic organs ((Sauvageau, 1995; Thorsteinsdottir, 1999) and J. Antonchuk et al., manuscript submitted). Like *Hoxb4* and two Hedgehog proteins recently reported (Bhardwaj, 2001), *Hoxa9* can now be considered as one of the rare molecules with an intrinsic ability to expand stem cells. The mechanisms involved in this expansion could include enhancement in self-renewal of the stem cell population or enhanced survival of the stem cell pool.

Another significant outcome of *Hoxa9* over-expression described here is its negative effect on early B cell development, as evidenced by a decrease in the numbers of pre-B clonogenic progenitor cells both in the *Hoxa9* transplantation chimeras and transgenic mice with targeted expression of *Hoxa9* to the lymphoid compartment. This reduction of pre-B CFC seems to be cell-autonomous since untransduced pre-B progenitors were normal in numbers and in their proliferative potential in these transplantation chimeras (see Fig. 2B, and data not shown). With respect to the significant reduction of pre-B cell progenitors in both of our mouse models, it is intriguing to observe that mature B cells are either slightly reduced (chimeras) or normal (transgenics). Although this discrepancy between progenitor and mature cell numbers is currently unknown, it may in part be explained by compensatory mechanisms known to regulate mature peripheral B-cell numbers (Pillai, 1999). We could also postulate the existence of a yet unidentified B progenitor located between the pre-B and the mature B cell that has to proliferate at a much higher rate in order to maintain the output of mature B cells as shown by FACS analysis (Fig. 2.3F). In contrast to the reduction of pre-B CFC, the numbers of the earliest committed B lymphoid progenitors, detectable

as WW-IC, were within the normal range in the transgenic mice. This indicated that *Hoxa9* over-expression does not alter B lymphocyte commitment (from HSC to WW-IC). In the *Hoxa9*^{-/-} mice, pre-B progenitors are also reduced in numbers, and have reduced proliferative potential (Lawrence, 1997), suggesting that *Hoxa9* levels need to be tightly regulated for normal B cell development.

Despite high levels of *Hoxa9* expression in lymphoid compartments of transgenic mice, these did not develop leukemia even after 18 months. This is in contrast with transduced chimeras, suggesting that in order for leukemic transformation to occur, the transduction should hit a primitive progenitor (in transplantation chimeras, HSCs and CFU-GEMM are perturbed in contrast to transgenics where only the pre-B lymphoid compartment as demonstrated in our experimental conditions). Moreover, in order for one of the transgenic mice to develop leukemia, a rearrangement or a retroviral insertion should activate *Hoxa9* in a more primitive progenitor.

Collectively, our results show that *Hoxa9* has the potential to expand HSC when over-expressed in a bone marrow transplantation model. Its involvement in chromosomal translocation in human leukemia together with the evidence that mouse HSC lacking *Hoxa9* compete poorly in a bone marrow transplantation model may suggest that this gene is a bona fide regulator of stem cell function. Our studies demonstrating *Hoxa9*-induced expansion of myeloid precursors may provide some initial clues on the apparently restricted ability of this oncogene to transform cells with myeloid differentiation capacities. The lack of lymphoid leukemia induced by *Hoxa9* even in the context where it provides a marked selective advantage to lympho-myeloid long-term repopulating cells is most

intriguing. This contrast with other genes involved in human leukemias (Tomasson, 1999).

Reference List

1. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. [Review]. *Hematology - Oncology Clinics of North America*. 1997;11:1221-1237.
2. Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, et al. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15; p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet*. 1996;12:154-158.
3. Borrow J, Shearman AM, Stanton VP, et al. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet*. 1996;12:159-167.
4. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286:531-537.
5. Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J*. 1998;17:3714-3725.
6. Thorsteinsdottir U, Kros J, Kroon E, Hamann A, Hoang T, Sauvageau G. The oncogene *E2A-Pbx1a* collaborates with *Hoxa9* to acutely transform primary bone marrow cells. *Mol Cell Biol*. 1999;19:6355-6366.
7. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, Lawrence HJ, Largman C, Humphries RK. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells

- perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol.* 1997;17:495-505.
8. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Hough MR, et al. Over-expression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity.* 1997;6:13-22.
 9. Perkins AC, Cory S. Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *EMBO J.* 1993;12:3835-3846.
 10. Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, et al. The AbdB-Like proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol.* 1997;17:6448-6458.
 11. Lu Q, Knoepfler PS, Scheele J, Wright DD, Kamps MP. Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. *Mol Cell Biol.* 1995;15:3786-3795.
 12. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:12223-12227.
 13. Moretti P, Simmons P, Thomas P, et al. Identification of homeobox genes expressed in human haemopoietic progenitor cells. *Gene.* 1994;144:213-219.

14. Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, et al. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood*. 1997;89:1922-1930.
15. Pineault N, Helgason CD, Sauvageau G, Lawrence JJ, Humphries RK. Analysis of Hox gene expression in primitive hematopoietic subpopulations of murine fetal liver and adult bone marrow. *Exp Hematol*. 1997;25:224a.
16. Izon DJ, Rozenfeld S, Fong ST, Komuves L, Largman C, Lawrence HJ. Loss of function of the homeobox gene Hoxa-9 perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood*. 1998;92:383-393.
17. Lawrence HJ, Fong ST, Hsiang YH, Sauvageau G, Humphries RK. Evidence for a stem cell defect in mice with targeted interruption of the Hoxa9 homeobox gene. *Blood*. 1998;92 (S1):55a.
18. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations *in vitro* and *in vivo*. *Genes Dev*. 1995;9:1753-1765.
19. Hough MR, Takei F, Humphries RK, Kay R. Defective development of thymocytes overexpressing the costimulatory molecule, heat-stable antigen. *J Exp Med*. 1994;179:177-184.
20. Humphries RK, Eaves AC, Eaves CJ. Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;76:3629-3633.

21. Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulations strategy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:8736-8740.
22. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. Enhanced *in vivo* regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood*. 1999;94:2606-2612.
23. Whitlock CA, Witte ON. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79:3608-3612.
24. Grez M, Akgun E, Hilberg F, Ostertag W. Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:9202-9206.
25. Pawliuk R, Kay R, Lansdorp P, Humphries RK. Selection of retrovirally transduced hematopoietic cells using CD24 as a marker of gene transfer. *Blood*. 1994;84:2868-2877.
26. Hough MR, Chappel MS, Sauvageau G, Takei F, Kay R, Humphries RK. Reduction of early B lymphocyte precursors in transgenic mice overexpressing the murine heat-stable antigen. *J Immunol*. 1996;156:479-488.
27. Jordan RJ, Lemischka IR. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev*. 1990;4:220-232.
28. Begley G, Green AR. The SCL gene: From case report to critical hematopoietic regulator. *Blood*. 1999;93:2760-2770.

29. Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:10431-10434.
30. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996;84:321-330.
31. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*. 2001;2:172-180.
32. Pillai S. The chosen few? Positive selection and the generation of naive B lymphocytes. *Immunity*. 1999;10:493-502.
33. Tomasson MH, Williams IR, Hasserjian R, et al. TEL/PDGFBetaR induces hematologic malignancies in mice that respond to a specific tyrosine kinase inhibitor. *Blood*. 1999;93:1707-1714.

CHAPITRE III

**LA DISSECTION MOLÉCULAIRE DE MEIS1 RÉVÈLE DEUX
DOMAINES IMPLIQUÉS DANS L'INDUCTION
LEUCÉMIQUE ET UN RÔLE CLÉ POUR L'ACTIVATION
DES GÈNES DU LOCUS *HOXA***

Article accepté pour publication dans Blood 2006

Le chapitre II a démontré que la surexpression de *Hoxa9* confère un avantage prolifératif aux cellules souches hématopoïétiques. Des études de notre laboratoire ont démontré que non seulement *Hoxa9* mais aussi *Hoxb4* et *Hoxb3* collaborent génétiquement avec *Meis1* pour accélérer l'induction de leucémie dans des modèles de transplantation murins. De plus, des résultats récents ont suggéré que la partie C-terminale de MEIS1 renferme un domaine de transactivation. J'ai voulu savoir si ce domaine ainsi que d'autres étaient impliqués dans le potentiel oncogénique de MEIS1. Le chapitre III résume les résultats d'une étude de structure-fonction visant à étudier le rôle de *Meis1* dans la leucémie induite par *Hoxa9*. Ainsi, plusieurs mutants de MEIS1 ont été générés et leur potentiel oncogénique a été testé en présence ou en absence de HOXA9 dans des modèles de transplantation murins. Evert Kroon qui a fait son stage postdoctoral dans le laboratoire a démontré que le domaine PIM situé dans la partie N-terminale de MEIS1 et liant PBX, est requis pour l'activité oncogénique de MEIS1. Il est responsable des résultats présentés dans la figure 3.1. Aline Mamo a démontré que le domaine C-terminal de MEIS1 connu pour renfermer une activité de transactivation est requis pour son potentiel oncogénique. La délétion de ce domaine peut être complétée par l'addition d'un domaine exogène de transactivation tel que VP16. Aline Mamo est responsable des résultats présentés dans les Figures 3.2 et 3.3. Or, les expériences des Figures 3.2 et 3.3 et 3.4 ont été répétées une deuxième fois impliquant aussi Jana Krosl, une agente de recherche dans notre laboratoire. Aline Mamo a démontré qu'à l'opposé de MEIS1, le produit de fusion VP16-MEIS1 est oncogénique. Janet Bijl, une agente de recherche et Alexander Thompson, un stagiaire postdoctoral, ont démontré à l'aide de la technique de Q-PCR que toutes

les leucémies surexprimant *VP16-Meis1* renferment une activation des gènes endogènes *Hoxa9* et/ou *Hoxa7*. Ils sont responsables des résultats présentés dans la Figure 3.5. Nadine Mayotte, une technicienne dans le laboratoire, a contribué par son expertise technique au niveau des Figures 3.1, 3.2, et 3.3.

Résumé

Les gènes *Hoxa9* et *Meis1* sont des collaborateurs oncogéniques activés dans une proportion significative de leucémies humaines caractérisées par des altérations génétiques au niveau du gène *MLL*. Dans cette étude, nous démontrons que la capacité oncogénique de MEIS1 est modulée par 3 domaines conservés dont le motif d'interaction avec PBX (PIM), l'homéodomaine et la région C-terminale renfermant des propriétés de transactivation. Les mutants MEIS1 et PBX1 dont les domaines d'interaction situés en N-terminal sont interchangés ne sont pas fonctionnels séparément, mais l'activité oncogénique de MEIS1 est récapitulée une fois que les cellules surexprimant *Hoxa9* sont co-infectées par les 2 mutants, impliquant ainsi le domaine PIM dans l'accélération de transformation leucémique par *Meis1*. De plus, nous démontrons que le domaine de transactivation de VP16 peut restorer le potentiel oncogénique du mutant MEIS1 dont les 49 derniers acides aminés de sa région C-terminale sont délétés. À l'opposé de *Meis1*, *VP16-Meis1* est oncogénique et toutes les leucémies présentent une activation des gènes endogènes *Hoxa9* et *Hoxa7*, suggérant que l'activation des gènes *Hoxa* représente un événement requis pour l'activité oncogénique de *VP16-Meis1*.

Introduction

To date, numerous studies have implicated *Hox* genes in human and murine leukemias. These include i) development of leukemias in mice transplanted with bone marrow cells engineered to overexpress retrovirus-transduced *HOXB6* (Fischbach et al. 2005), *HOXB8* (Perkins et al. 1993), *HOXB3* (Thorsteinsdottir et al. 2001), *HOXA10* (Thorsteinsdottir et al. 1997), or *HOXA9* (Kroon et al. 1998); ii) the rearrangements between the *NUP98* gene (on chromosome 11p15) and several members of the *Hox* gene family, including *HOXA9* (Borrow et al. 1996; Nakamura et al. 1996), *HOXD13* (Raza-Egilmez et al. 1998) *HOXA13* and *HOXA11* (Fujino et al. 2002), *HOXC11* and *HOXC13* (Taketani et al. 2002), which generate fusion genes (e.g., *NUP98-HOXA9*) that characterize myeloid leukemias in human and mice; iii) the overexpression of *HOXA7* and *HOXA9* in several MLL-induced human leukemias (Armstrong et al. 2002; Ayton et al. 2003); iv) the distinctly high correlation between high levels of *HOXA9* expression and poor prognosis in human acute myeloid leukemia (Golub et al. 1999), and v) co-expression of *BCR-ABL* and *NUP98-HOXA9* in a significant number of human leukemic specimens (Dash et al. 2002), and a recent proof of their genetic interaction (Mayotte et al. 2002). Together, these studies establish a direct and indirect role for multiple *Hox* genes in human leukemias, and highlight the importance of revealing the molecular bases of *HOX*-induced transformation. Some insight into the molecular mechanisms of *HOX*-induced transformation may be gained from the impressive accumulation of information about the so-called *HOX* co-factors, referred to as members of the TALE (for three-amino-acid loop extension) family of homeodomain proteins. Interestingly, founders of two

subgroups within this family, namely *PBX1* (Kamps et al. 1991) and *Meis 1* (Moskow et al. 1995) were identified based on their participation in human and mouse leukemia, respectively.

HOX, PBX and Meis participate in a multi-protein interaction network. The cooperative interaction between PBX and HOX proteins enhances the DNA binding affinity and specificity of HOX proteins (Mann1995) and is essential for at least some of the HOX-dependent developmental programs (Azpiazu et al. 1998; Popperl et al. 1995). In contrast, a functional role for a dimeric HOX-Meis complex has so far not been established (Ryoo et al. 1999). Members of the Meis family can, however, form a cooperative complex with PBX in both DNA-dependent and independent manners (Jacobs et al. 1999; Shanmugam et al. 1999; Shen et al. 1999), and interaction with Meis induces nuclear localization of PBX proteins by preventing its nuclear export (Abu-Shaar et al. 1999; Berthelsen et al. 1998). Indirect interaction between HOX and Meis proteins was established by the identification of HOX-PBX-Meis heterotrimeric complexes (Shen et al. 1999).

PBX1 is involved, as part of the fusion E2a-PBX1 oncoprotein, in a high proportion of human pre-B leukemias (Kamps et al. 1991). We recently generated a mouse model of E2a-PBX1-induced pre-B cell leukemia, and showed that a small region of approximately 19 Kb within the *Hoxa* locus was frequently targeted by MMLV in the majority of the leukemias analyzed (Bijl et al. 2005). Interestingly, all these leukemias were characterized by aberrant expression of numerous *Hoxa* genes, and all expressed high levels of *Hoxa7*, thus pointing to a

genetic interaction between E2a-PBX1 and numerous *Hoxa* genes. In support of these findings, we have previously reported a strong genetic interaction between *Hoxa9* and *E2a-PBX1* using a mouse model for AML (Thorsteinsdottir et al. 1999).

Meis1 is frequently activated by insertion of endogenous provirus in BXH2 mouse model of acute myeloid leukemia (AML) (Moskow et al. 1995) and it also appears to represent a key target gene to some MLL fusion proteins involved in human leukemia (Armstrong et al. 2002; Imamura et al. 2002; Look 1997). In AML, *Meis1* also genetically interacts with multiple *HOX* genes, including *HOXB3* (Thorsteinsdottir et al. 2001), *HOXA7* and *HOXA9* (Afonja et al. 2000; Drabkin et al. 2002; Kroon et al. 1998; Moskow et al. 1995; Nakamura et al. 1996) and *HOXB4* (N.M. and G.S., unpublished observations). In contrast to *Meis1*, the highly related *Meis* family member *PREP1* fails to accelerate the *HOXA9*-induced leukemia (Thorsteinsdottir et al. 2001). *PREP1* and *Meis1* share similarities in their domains required for interaction with PBX (the PBX-Interacting Motif or "PIM") and have similar homeodomains (HD), but their sequence has diverged considerably between the PIM and their respective homeodomains. A recent report indicated that this divergent region is dispensable for the oncogenic function of *Meis1* (Wang et al. 2005), and that the C-terminal domain of *Meis1*, not conserved in *PREP1*, is critical for transformation ((Wang et al. 2005) and this paper)). Interestingly, the study reported by Huang et al (2005) also revealed a transcriptional activity for this *Meis1* C-terminal domain.

Results of experiments performed with *Drosophila* support the model predicting a transactivating role for Meis1. In these studies, fly gene *HTH* (*Meis1* ortholog) was fused to the repression domain of Engrailed and phenocopied the loss of HTH phenotypes, such as the appearance of ectopic eyes in the ventral head region, antenna-to-leg transformation, fusion of proximal leg segments and deformations in proximal wing structures (Inbal et al. 2001). Conversely, fusion of the transactivating domain of VP16 to HTH generated gain of function phenotypes, e.g. loss of eyes, loss of arista, and abnormal distal leg development (Inbal et al. 2001). Together, these studies highlighted a possible inherent transactivating function of Meis1 which, at least in part, maps to the C-terminal region of the protein (Huang et al. 2005).

Using a strategy similar to that described for the *Drosophila* HTH protein, and *in vivo*-based leukemia assays, we now provide genetic evidence linking the oncogenic activity of Meis1 to its C-terminal transactivating domain, and show that this function could be complemented in cis by the addition of VP16. We also exploit the generation of dysfunctional Meis1-PBX1 swapping mutants to document the nucleating function of PIM in Meis1 oncogenic activity. Finally, we demonstrate that in contrast to Meis1, the fusion VP16-Meis1 is spontaneously oncogenic, and all leukemia harbour genetic activation of endogenous *Hoxa9* and/or *Hoxa7* thus revealing a key function of *Hoxa* gene activation for the oncogenic activity of VP16-Meis1.

Material and methods

cDNA constructs and retroviral vectors.

cDNAs used in this study encoded *Meis1a* lacking amino acids (aa) 2-63 (*Meis1* Δ N, Fig. 1), aa 70-97 (*Meis1* Δ HR1, Fig. 4.1A), aa 107-187 (*Meis1* Δ HR2, Fig. 4.1A), aa 65-193 (*Meis1* Δ PIM, Fig. 4.1A), aa 295-334 (*Meis1* Δ HD, Fig. 4.1A), or aa 270-336 (*Meis1* Δ NLS-HD, Fig. 4.1A) were generated by PCR amplifications, and the fidelity of their ORFs was verified by sequencing. To exchange PIM (aa 65-193 of *Meis1a*, Fig 4.1C) and MIM (aa 40-140 of *PBX1a*, Fig. 4.1C) domains, BamH I restriction sites were introduced in *Meis1a* at codons 64-65 (silent mutation), or in *PBX1a* at codons 38-39 (GR>GS), and 140-141 (silent mutation). The *PBX1*(N51S, Fig 4.1C) and *PBX1*(GKFQ>HA, Fig. 4.1C) mutations were introduced into the *PBX1*(MIM>PIM) backbone by exchanging all sequences 3' of the Stu I site within the *PBX1a* ORF with the corresponding sequences of the mutated *PBX1a* cDNAs (kindly provided by Dr.M.Featherstone, McGill University, Montreal). A detailed description of subcloning, amplifications and the sequences of primers used are available upon request. cDNAs encoding *Meis1a* lacking the N-terminal 56 aa (*Meis1* Δ 334, Fig. 4.2A), and chimeric cDNAs encoding *VP16-Meis1a* or *VP16-Meis* Δ 334 (Fig. 4.2A) were previously described (Green et al. 1998; Shanmugam et al. 1999). The wild-type and the mutant *Meis1a* cDNAs were introduced into the MSCV-pgk-EGFP retroviral vector, and all *PBX1* mutants into MSCV-pgk-DSRed. NUP98-HOXA9(W>G) mutants were subcloned into MSCV-pgk-EGFP or MSCV-pgk-EYFP. MSCV-HOXA9-pgk-DSRed, MSCV-HOXA9-pgk-Neo, and MSCV-

NUP98-HOXA9-pgk-EGFP were previously described (Kroon et al. 1998; Kroon et al. 2001).

Animals.

Ly5.1⁺ bone marrow donors were (C57BL/6Ly-Pep3b x C3H/HeJ)F₁ or (C57Bl6/Pep3b), and recipients were Ly5.2⁺(C57BL/6J x C3H/HeJ)F₁ or (C57Bl/6J) mice. Fetal liver cells were derived from (C57BL/6Ly-Pep3b x C3H/HeJ)F₁ pregnancies at 14.5 dpc. Animals were housed and handled in accordance with the guidelines of the Animal care and use committee at the Clinical Research Institute of Montreal, which also approved the experiments performed.

Retroviral infection and transplantation of primary hemopoietic cells.

Generation of recombinant ecotropic retrovirus-producing GP+E86 cells, and infections of primary hemopoietic cells were performed as described (Kroon et al. 2001; Lessard et al. 2003). For co-infections, 1 day before infection equal proportions of GP+E86 cells producing the retroviruses of interest were plated together to generate a mixed culture producing 2 or 3 different retroviruses. After recovery from co-culture with retroviral producers, the proportions of transduced (EGFP⁺, or EYFP⁺, or dsRED⁺, or EGFP⁺/EYFP⁺) cells were determined by flow cytometry using MoFlo (Cytomation, Fort Collins, CO). 12-16 week-old recipient mice were irradiated (850 cGy, 160 cGy/min, ¹³⁷Cs γ source (J.L. Shepherd, CA) and transplanted with 2×10^5 bone marrow cells, or 1×10^6 fetal liver cells, together with 1×10^5 freshly isolated bone marrow cells.

Clonogenic progenitor assays

The frequencies of myeloid clonogenic progenitors in freshly infected populations of bone marrow or fetal liver cells were determined as described (Thorsteinsdottir et al. 2002). Efficiency of *HOXA9* transduction was determined from the proportions of CFCs proliferating in the presence of G-418 (1.8 mg/mL, Invitrogen, Burlington, ON), and epifluorescence was used to determine the numbers of EGFP⁺, EYFP⁺, dsRED⁺ or GFP⁺/dsRED⁺ CFCs. Double and triple transduction efficiencies were estimated from the proportions of G-418^r CFCs that also expressed EGFP, EYFP, or EGFP and dsRED.

Immunoprecipitation and western blot analyses.

Transfected 293 cells were lysed in 250 mM NaCl, 50 mM HEPES (pH 7.0), 5 mM EDTA, 0.1 % NP-40, containing 2mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, and 2 µg/ml Leupeptin. For immunoprecipitation, lysates were mixed with monoclonal anti-HA antibody. Protein complexes were bound to protein G-plus agarose (Santa Cruz Biotech. Inc), washed 5x with lysis buffer, and released by boiling beads in 1 x Laemli buffer (60 mM TRIS-Cl pH 6.8, 1.7% SDS, 5% glycerol, 200 mM β-mercaptoethanol). Preparation of total cell lysates and western blot analyses were performed as described (Krosli et al. 2000). Primary antibodies used were anti-HA (Boehringer Mannheim, Roche Molecular Biochemicals), anti-FLAG (Stratagene), anti Meis1a(NT)(Shanmugam et al. 1999) and anti VP16 (BD Bioscience, Pharmingen). Secondary antibodies were horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit and anti mouse (both from Santa Cruz Biotech. Inc.).

DNA and RNA analyses.

High molecular weight DNA from the BM and spleens, and where indicated from lymph nodes, or thymus, or myeloid clonal populations was digested as described in figure legends. The total RNA from these tissues was isolated using TRIZOL. Southern and northern blot analyses were performed as described (Kroon et al. 1998). The probes used were a 0.90 kb *Neo^R* cDNA, the 0.7 kb *EGFP* cDNA, and 1.2 kb *dsRed* cDNA.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated by Trizol™, DNase-I-treated and cDNA was prepared (MMLV-RT, random primers) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Paisley U.K.). Q-PCR was carried out using TaqMan® probe based chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA). Oligonucleotides for all 39 murine *Hox* genes and 8 members of the TALE homeodomain gene family were designed against nucleotide sequences deposited in murine genome databases (GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/, RefSeq www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/ and EMBL www.ebi.ac.uk/embl/ using Primer Express™ (Applied Biosystems). Reactions, analysis and validation of the amplicons were carried out as previously described (Thompson et al. 2003).

Flow cytometry and classification of leukemias.

For phenotypic analyses of leukemias, bone marrow and/or spleen cells were stained for two-color analysis using Mac1-PE and GR1-APC, or Mac1-PE and CD19-APC, or CD4-PE and CD8-APC, or Sca1-PE and c-Kit-APC (all from BD

Bioscience, Pharmingen). Data were acquired using LSR II and Diva software, and analyzed with FCS2Express software. To examine morphological features of leukemic cell populations, cytopsin or touch preparations of bone marrow, spleen, liver, lung and kidney of diseased mice were stained with Wright stain. The types and the proportions of distinct cell populations present were determined by examination of slides under 100-fold magnification. The first grouping of leukemias was based on the proportions of non-differentiated blasts: Group I, >80% non-differentiated myeloid blasts; Group II, < 80% non-differentiated blasts. Each group was then subdivided into sub-groups with distinct morphological characteristics. Group I: A, two distinct blast populations; B: myeloblasts with pale granules; C: myeloblasts with coarse granules. Group II: A, >20% monocytes and differentiated myeloid cells; B, >20% differentiated myeloid cells.

Results

A modular oncogenic role for the PBX-Interacting Motif of Meis1. To identify domains of Meis1 that are required for its leukemogenic potential, we created several deletion mutants spanning the conserved motifs (Fig. 3.1A), and analyzed their capacity to accelerate *Hoxa9*-induced leukemia in transplantation assays. In the first series of experiments, between 1100 and 1600 *Hoxa9* + *Meis1* transduced fetal liver-derived myeloid progenitors were transplanted per mouse. Results from these studies suggested a critical function for the homeodomain and the C-terminal region of Meis1 (Fig. 3.1A), and indicated that the Pbx-Interacting Motif (PIM) of Meis1 contributes significantly to its oncogenic function. Although our observations largely confirmed findings reported by Wang et al. (Wang et al. 2005), they also suggested that the *Meis1* Δ PIM mutant retained some oncogenic activity as determined in two separate experiments (Fig. 3.1B and 3.1A).

The Meis1-PBX interaction is mediated through the PIM domain of Meis1 and the MIM (for Meis1-Interaction-Motif) region of PBX proteins (see Fig. 3.1C). To examine further PIM's role in the oncogenic activity of Meis1, several PIM and MIM domain swapping mutants of Meis1a and PBX1A were generated (Fig. 3.1C). Immunoprecipitation experiments (Fig. 3.1D) showed that while these mutants have lost the capacity to interact with their usual partner, i.e. Meis1(PIM>MIM) does not interact with PBX1 and PBX1(MIM>PIM) does not interact with Meis1, the co-immunoprecipitation of Meis1(PIM>MIM) with PBX1(MIM>PIM) demonstrated that the swapped PIM and MIM domains still mediate interaction between the newly generated mutants (see lane 12 Fig. 3.1D).

In a first series of experiments, fetal liver cells were transduced with *Hoxa9* alone, or in combination with *Meis1(PIM>MIM)*, with or without *PBX1(MIM>PIM)*, or with a combination of the last two genes (Table 1). Fetal liver cells engineered to overexpress *Meis1(PIM>MIM)* and *PBX1(MIM>PIM)* did not induce leukemia in the absence of *Hoxa9* (Fig. 3.1E). The results of the *in vivo* analyses also showed that neither *Meis1(PIM>MIM)* nor *PBX1(MIM>PIM)* could accelerate the onset of *Hoxa9*-induced AML, as all mice from these two groups survived beyond the time at which recipients of *Hoxa9*-transduced cells started to die of acute myeloid leukemia (AML) (Fig. 3.1E). Importantly, co-overexpression of both *Meis1(PIM>MIM)* and *PBX1(MIM>PIM)* swapping mutants together with *Hoxa9* resulted in rapid onset of typical AML in all transplanted mice (Fig. 3.1E). Southern blot analyses of genomic DNA extracted from multiple tissues of several leukemic animals showed that all three recombinant proviruses were present and intact in the leukemic samples, and confirmed our microscopic observations (data not shown) that leukemic cells were not only present in the hematopoietic organs (bone marrow (B) and spleen (S)), but had also infiltrated non-hematopoietic tissues such as the kidneys (K) and liver (L) (Fig. 3.1F). The strength of the genetic interaction between the three genes was revealed by the persistent detection of all three proviruses in the leukemic cell population (Fig. 3.1F), although the initial gene transfer was evaluated at much below 1% (Table II). In agreement with this low triple gene transfer efficiency, clonal analysis showed that the leukemia in most mice consisted of few or a single clone (Fig. 3.1G). For example, clonal cell lines

derived from either the BM or the spleen from leukemic mouse #1 accounted for nearly all the proviral fragments detected in the BM sample itself.

This triple transduction/transplantation model now enabled additional analyses of structural requirements for PBX1 in *Meis1*/*HOXA9* leukemic collaboration. First we examined whether in this context the DNA binding capacity of PBX1 is required for reconstitution of the transforming capacity of *Meis1*(*PIM*>*MIM*). Specifically, the N51S homeodomain (HD) mutation affects a critical residue that directly contacts DNA (LaRonde-LeBlanc et al. 2003; Shanmugam et al. 1999) while in the GKFQ>HA mutant, a 13 aa stretch (# 296-308) at the C-terminal end of the PBX1 HD is replaced with the hemmagglutinin tag (Green et al. 1998). The transplantation parameters for this set of experiments are shown in Table III. As shown in Fig. 3.1H, none of the two DNA-binding mutations markedly affected the capacity of *PBX1*(*MIM*>*PIM*) to rescue the transforming potential of *Meis1*(*PIM*>*MIM*) (Fig. 3.1H and Table III). DNA and RNA analyses of leukemic cells confirmed the presence of all expected proviruses and messenger RNAs, respectively (data not shown). These results thus show that the DNA-binding activity of *PBX1*(*MIM*>*PIM*) mutants does not contribute to leukemia induction, but establish the critical function of *PIM* as a nucleating domain in leukemia induction.

Table II. *Meis1/PBX1* swapping mutants: transplantation doses of the transduced fetal liver-derived CFCs.

Virus			Number of transduced CFC injected per mouse			# of mice
Hoxa9 (neo')	Meis1 (P>M)* (EGFP)	PBX1 (M>P)** (dsRED)	Total			
			G418 ^r			
				EGFP ⁺ or dsRED ⁺	EGFP ⁺ and dsRED ⁺	
+			1,600	1,000		4
+	+		1,800	1,600	480	5
+		+	1,400	1,400	56	5
+	+	+	2,200	1,800	400	11
	+	+	2,000		520	5

*- Meis1(PIM>MIM)

** - PBX1(MIM>PIM)

Table III. *PBX1* DNA-binding mutants: transplantation doses of the transduced bone marrow derived CFCs.

Virus		Number of transduced CFC injected per mouse			# of mice	
Hoxa9(neo') plus		G418 ^r				
Meis1(P>M)	PBX1(M>P)*	Total	EGFP ⁺	EGFP ⁺ and dsRED ⁺		
*	*					
+	+	21,000	16,400	6,800	200	5
+	N51S	27,800	18,500	10,100	100	5
Flag	+	23,600	13,100	11,200	200	5
Flag	GKFQ>HA	24,500	19,000	15,000	100	5

*-Meis1(PIM>MIM)

** -PBX1(MIM>PIM)

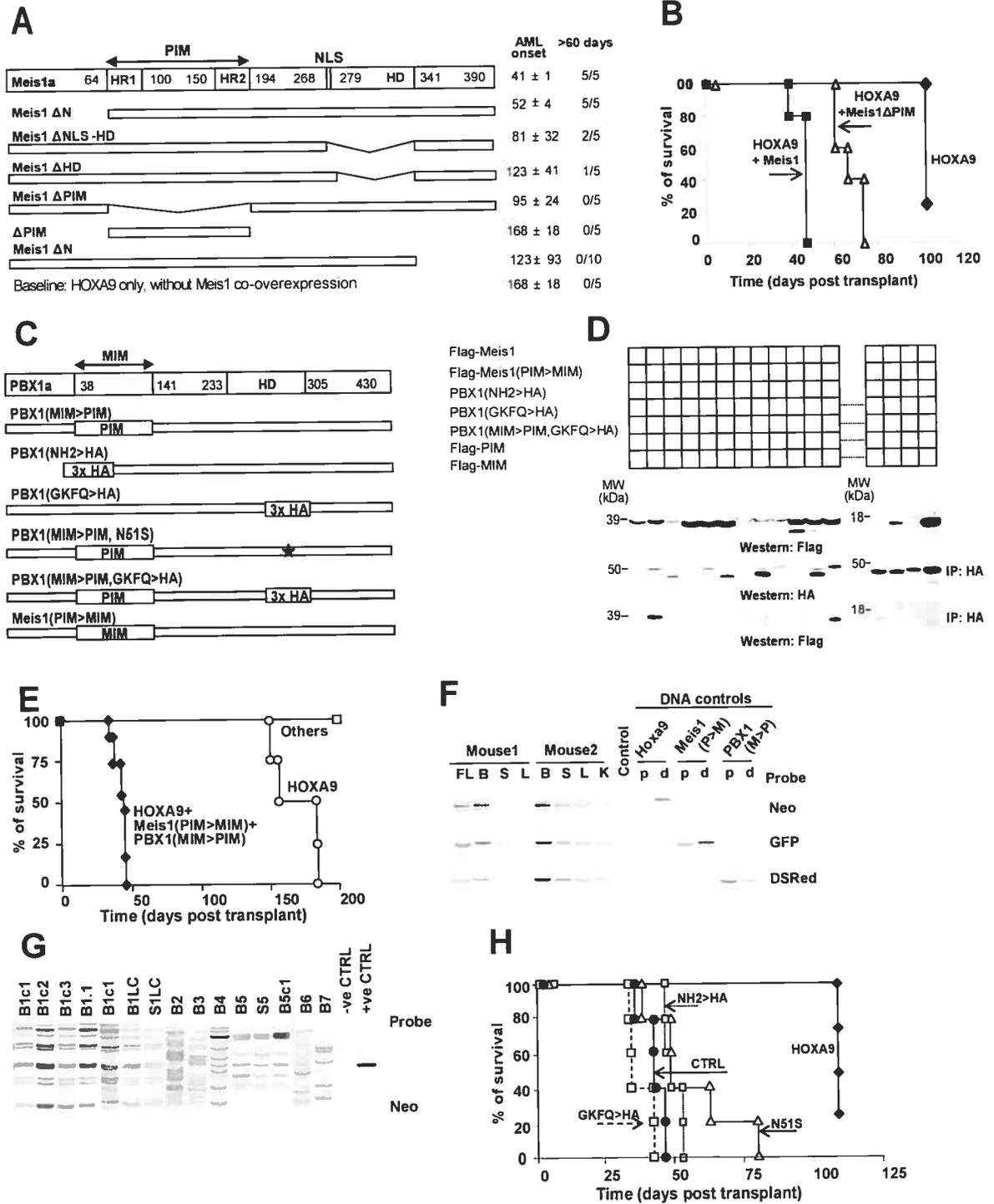


Figure 1.

Figure 3.1. Identification of Meis1 domains implicated in acceleration of HOXA9-induced leukemia. (A) Schematic representation of Meis1 mutants (left panel), and average onset of AML in recipients of bone marrow cells transduced with the indicated mutants and HOXA9 (right panel). (B) Survival curves of mice transplanted with HOXA9-, or HOXA9 plus Meis1-, or HOXA9 plus Meis1 Δ PIM-transduced bone marrow cells. (C) Schematic representation of Meis1a and PBX1 domain swapping mutants. (D) In vitro analysis of interactions between the domain swapping mutants. Top panels: western blot analysis of FLAG-tagged Meis1 and Meis1(PIM>MIM) expression in lysates of COS cells transfected with vectors expressing the indicated Meis1 and PBX1 mutants. Lysates of cells transfected with vectors indicated above were subjected to immunoprecipitation with anti HA antibodies. The amount of HA-tagged PBX1 mutants in immune complexes was determined by western blot analysis with HA antibody (central panels), and interaction of these proteins with Meis1 was determined using anti-FLAG antibody (bottom panels). (E) Survival curves of mice transplanted with HOXA9, or with HOXA9 plus Meis(PIM>MIM) plus PBX1(MIM>PIM) cells. Mice that received cells expressing HOXA9 plus individual swapping mutant (others) survived past the time when majority of HOXA9 recipients succumbed to AML. (F) Southern blot analysis of proviral integrations in DNA isolated from the tissues of leukemic mice (solid line in Fig. 1E). FL, "triple"-transduced fetal liver cells; B, bone marrow; S, spleen; L, liver; K, kidney. DNA was digested with Kpn I, which cuts within LTRs and thus releases the integrated proviruses. DNA controls are DNA isolated from retrovirus producing GP+E cells (p), or original retroviral vector plasmids (d). Probes used are listed to the right. (G) Southern blot analysis of proviral integrations in DNA isolated from leukemic cell populations. DNA was digested with EcoRI, which cuts in each provirus once such that each autoradiographic band represents a unique integration event. B1 through B7, bone marrow of primary leukemic mice; S5, spleen of primary leukemic mouse; B1.1, bone marrow of mouse transplanted with B1 leukemic cells; B1c1, B1c2, B1c3, B1LC and S1LC, in vitro expanded colonies derived from B1 leukemia. (H) Survival curves of mice transplanted with "triple"-transduced bone marrow cells. HOXA9 plus Meis1(PIM>MIM) plus PBX1(MIM>PIM, GKFQ>HA), white squares; HOXA9 plus Meis1(PIM>MIM) plus PBX1(MIM>PIM) black circle; HOXA9 plus FLAG-Meis1(PIM>MIM) plus PBX1(MIM>PIM), grey squares; HOXA plus Meis1(PIM>MIM) plus PBX1(MIM>PIM, N51S), open triangles.

VP16 rescues the oncogenic potential of Meis1 Δ 334. The C-terminal domain of Meis1, necessary for the acceleration of *Hoxa9*-induced leukemia (Fig. 3.1A), is also critical for its transcriptional activation function (Huang et al. 2005). To verify correlation between the transforming and transactivating functions of Meis1, we next examined the leukemogenic potential of chimeric proteins comprising wild-type Meis1, or Meis1 lacking the C-terminal domain (Meis1 Δ 334), fused to the heterologous Herpes simplex-derived VP16 transactivating domain (Fig. 3.2A). Cells transduced with each construct produced proteins of appropriate size well in excess of the endogenous protein (Fig. 3.2B).

We first investigated the capacity of these Meis1 chimeras to accelerate *Hoxa9*-induced leukemia. Table 3 shows the efficiency of double gene transfer (i.e., *Hoxa9*+ *Meis1* or mutants) for each condition (see rows 1-11 for expt.1A and 12-14 for expt. 1B). Initial experiments showed that the source (i.e., bone marrow vs fetal liver) of primary cells did not affect the onset or the phenotype of the myeloid leukemias that developed in these mice, therefore only leukemias occurring in recipients of transduced bone marrow cells were further analyzed.

In agreement with our previously reported studies (Kroon et al. 1998; Thorsteinsdottir et al. 2001), recipients of *Hoxa9*+ *Meis1*-transduced cells developed AML within a very short period of time (four to five weeks post transplantation, Fig. 3.2C). Recipients of *Hoxa9*+VP16-*Meis1*-transduced cells

also developed leukemia with a very short latency (i.e., 4 wks, Fig. 3.2C). We next examined the ability of the C-terminal domain mutant (*Meis1* Δ 334) to collaborate with *Hoxa9* in leukemia acceleration and found that leukemia onset in this group was noticeably delayed compared to recipients of similar doses of *Hoxa9*+*Meis1*-transduced cells (Fig. 3.2C and Table 3). Moreover, the time frame of leukemia development in these mice was in the range of that seen in mice transplanted with cells transduced only with *Hoxa9* (Fig. 3.2C). These results were reproduced in three separate experiments in which different cell doses were evaluated (see Table IV for details of each experiment). We next tested whether exogenous, VP16-derived transactivating domain could rescue the oncogenic function of *Meis1* Δ 334. In two independent experiments, we found that recipients of *Hoxa9*+VP16-*Meis1* Δ 334-transduced cells died of leukemia with latency comparable to that of *Hoxa9*+VP16-*Meis1* or *Hoxa9*+ *Meis1* mice (dotted line and arrow in Fig. 3.2C).

For several of the leukemias that developed in recipients from the five groups of mice shown in Fig. 3.2C, DNA analysis was conducted to verify the presence and integrity of the provirus as well as to provide an estimate of the clonal composition of these leukemias. Fig. 3.2D (upper two panels) shows that the majority of leukemias were oligoclonal, with some possible clonal disease (e.g., lane 21-22). As also indicated in Fig. 3.2D (lower two panels), the *Hoxa9* (*Neo* probe) and various *Meis1* proviruses (*GFP* probe) were easily detectable in each leukemia analyzed, and the majority of the integrated proviruses were not

rearranged. Expression of both retrovirally derived mRNAs by leukemic cells was confirmed by northern blot analysis (Fig. 3.2D).

Taken together, these data confirm the important role of the C-terminal domain of Meis1 in accelerating *Hoxa9*-induced AML, and demonstrate that the heterologous VP16 transactivation domain could restore the oncogenic function of Meis1 Δ 334.

Table IV. *Meis 1* mutants: transplantation doses of the transduced CFCs.

Exp	Cells	Virus	# of mice	Number of transduced CFC injected per mouse		
				G-418 ^r	GFP ⁺	G-418 ^r +GFP ⁺
1A	FL ^a	Neo	3	6,100		
		GFP	3	-	2,200	-
		<i>Hoxa9</i>	4	3,300	-	-
		Meis 1	3	-	4,700	-
		VP16-Meis 1	8	-	2,800	-
		VP16-Meis Δ 334	3	-	3,200	-
		Meis Δ 334	4	-	600	-
		<i>Hoxa9</i> +Meis 1	4	ND	ND	3,000
		<i>Hoxa9</i> +VP16-Meis 1	8	ND	ND	1,600
		<i>Hoxa9</i> +VP19-Meis Δ 334	3	ND	ND	2,700
1B	BM ^b	<i>Hoxa9</i>	5	5,000	-	-
		<i>Hoxa9</i> +Meis 1	5	ND	ND	4,300
		<i>Hoxa9</i> + Meis Δ 334	5	ND	ND	6,900
2	BM ^b	GFP	2		5,200	
		<i>Hoxa9</i>	5	1,334		
		Meis 1	3		1,530	
		VP16-Meis 1	9		267	
		VP16-Meis 1 Δ 334	5		800	
		Meis 1 Δ 334	5		534	
		<i>Hoxa9</i> +Meis 1	5			934
		<i>Hoxa9</i> +VP16-Meis 1	9			200
		<i>Hoxa9</i> +VP16-Meis	10			400
<i>Hoxa9</i> +Meis 1 Δ 334	8			500		

^a- fetal liver derived cells

^b-adult bone marrow derived cells

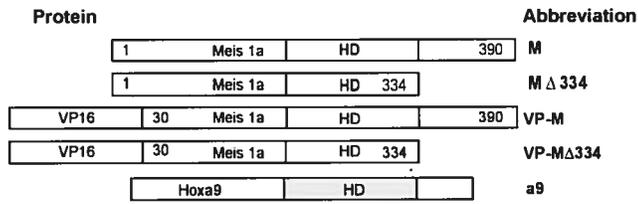
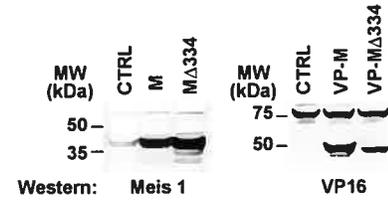
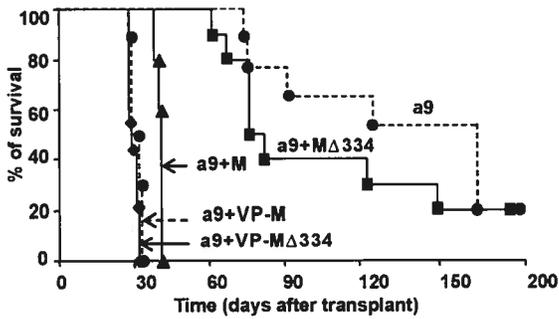
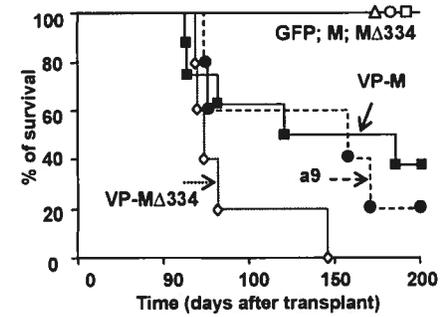
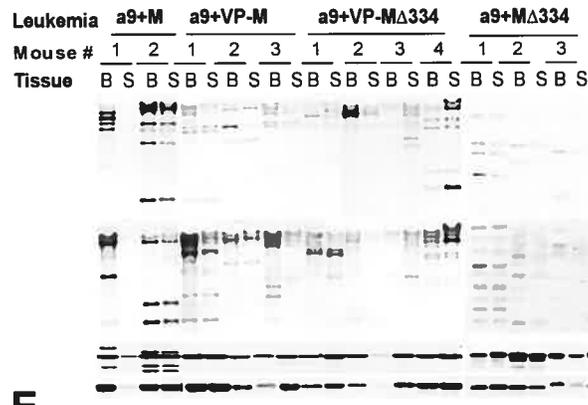
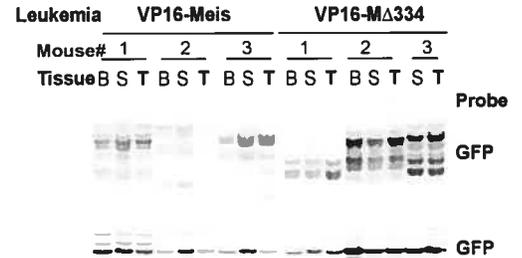
A**B****C****F****D****E****G****H****Figure 2.**

Figure 3.2. VP16-Meis is independently oncogenic. (A) Schematic representation of *Meis1* mutants. (B) Western blot analysis of *MEIS1* and VP16-*MEIS1* levels in the transduced GP+E cells. *MEIS1* antibody recognizes N-terminal 30 amino acids of *MEIS1* (left panel) deleted in VP16 fusions, which can be detected using anti-VP16 antibody (right panel). Nonspecific bands at ~70 kDa and ~75 kDa on the left and the panel, respectively, serve as loading controls. (C) Survival curves of mice transplanted with *HOXA9*, or *HOXA9* plus *Meis1*, or *HOXA9* plus *Meis1* Δ 334, or *HOXA9* plus VP16-*Meis1*, or *HOXA9* plus VP16-*Meis1* Δ 334 cells. (D) Top two panels: Clonal analysis of proviral integrations in DNA isolated from hematopoietic tissues of leukemic mice. Southern blot analysis was performed as described for Fig 1.G. Genotype of leukemia and mouse ID# are listed at the top. B, bone marrow; S, spleen. Probes used are listed to the right. The similar number of clones identified with either a Neo (*Hoxa9* provirus) or a GFP (*Meis1* proviruses) probe suggests that most if not all of the leukemic clones contained both the *Hoxa9* and *Meis1* (or mutants) proviruses. Bottom two panels: Southern blot analysis of proviral integrity in samples as described in top two panels. DNA was digested with *Kpn I* as described for Fig. 1F. (E) Northern blot analysis of proviral expression in tissues described for Fig. 1D. Transcripts from the *Hoxa9* provirus are detected by a probe specific for the Neo gene, and for *Meis1* (and mutants) by GFP. (F) Survival curves of mice transplanted with *Hoxa9*, or VP16-*Meis1*, or VP16-*Meis1* Δ 334 cells. Note that control *Hoxa9* mice are the same in Fig. 1C and 1F. (G) Top panel: clonal analysis of proviral integrations in VP16-*Meis1* and VP16-*Meis1* Δ 334 leukemias. Southern blot analysis of proviral integrations was performed as described for Fig. 1G. Bottom panel: Southern blot analysis of proviral integrations in samples introduced in the top panel. DNA was digested with *Kpn I* as described for Fig. 1F. (H) Northern blot analysis of proviral expression in tissues introduced in Fig. 2G. GFP probe detects transcripts derived from the different *Meis1* and VP16-*Meis1* proviruses.

VP16-Meis1 is independently oncogenic. Although *Meis1* accelerates the *Hox*-induced leukemia, its over-expression alone fails to induce leukemia (Kroon et al. 1998; Thorsteinsdottir et al. 2001). A series of experiments was conducted to determine whether the new VP16-Meis1 fusion proteins gained the capacity to induce leukemia. The same leukemia model as described above was exploited using both fetal liver and bone marrow cells (see Exp 1A and 2 in Table IV for details). Interestingly, in recipients of *VP16-Meis1* or *VP16-Meis1 Δ 334*-transduced cells, AML development was observed within the same time frame as in recipients of *Hoxa9*-transduced cells, i.e. within 4 to 6 months after transplantation, (Fig. 3.2F). Variation in cell doses probably explains the apparent shorter leukemia latency in favour of *VP16-Meis1 Δ 334* recipients (see shaded rows in Table IV), since no such differences were found in exp 1A where similar numbers of transduced cells were transplanted per mouse (see row 5-6 in Table IV, exp 1A, and data not shown).

The leukemia developing in these mice were clonal or oligoclonal (Fig. 3.2G, upper panel) and the different proviruses were mostly intact (Fig. 3.2G, bottom panel). Northern blot analysis confirmed the expression of the expected two retroviral transcripts (from *LTR* and *Pgk* promoters) although, as frequently seen with the MSCV provirus, spliced forms were also detectable in some leukemias (see lane 1 to 4 and 9-10 in Fig. 3.2H).

Taken together, these data demonstrate that the heterologous VP16 transactivation domain dramatically enhanced the "oncogenic potency" of *Meis1*, which became

as efficient as *Hoxa9* in leukemia induction, and rescued the ability of the C-terminal *Meis1* Δ 334 mutant to accelerate *Hoxa9*-induced leukemia. These results raised two important questions: 1. Is the phenotype of these myeloid leukemias affected by any of the newly generated oncogenes? 2. Does VP16-Meis1 still require *Hox* gene activation for its leukemogenicity?

Variations in leukemia phenotypes are not determined by *Meis1* mutants. We previously reported that *Meis1* accelerates the occurrence of *Hox*-induced myeloid leukemia, and that leukemia phenotype mainly depended on the *Hox* gene which initiated disease. For example, *Hoxa9*-induced leukemias were characterized by much higher blast content than leukemias caused by *Hoxb3* overexpression (Thorsteinsdottir et al. 2001). We first tested the hypothesis that the newly generated *VP16-Meis* mutants might affect the phenotype of the leukemia they induce, independently or in collaboration with *Hoxa9*. First, cell surface markers were analyzed on a large proportion of the leukemias generated in these experiments ($n \geq 30$), and representative results shown in Fig. 3.3. Except for one specimen, a high proportion of leukemic cells expressed moderate to high levels of Mac1⁺ (mean \pm SD: 82% \pm 25), and wide range of c-Kit levels (from 4 to 92%, Fig. 3 and data not shown), while none expressed the granulocyte marker Gr1, or noticeable levels ($\geq 10\%$) of the B cell marker CD19, or the stem cell marker Scf.

A complementary assessment of these leukemias was performed by morphological evaluation of bone marrow preparations, which was then used to categorize leukemias into five subgroups based on blast content (≥ 80 vs $< 80\%$ for group 1 vs 2) and evidence for differentiation (granules, evidence for granulocytic

or monocytic differentiation, etc. for subgroups A, B and C: Fig. 3.4A). Additional details summarizing tissue infiltration for each leukemia subgroups is provided in Table V.

Table V. Detailed characterization of leukemias

Group	AML onset (days)	Spleen (mg)	Bone marrow (% blasts)	Tissue infiltration (% blasts)			
				Blood	Liver	Lung	Kidney
Hoxa9	103±48	300±30	62±12	62±12	75	75	50
Hoxa9 + Meis	40 ± 1	400 ± 10	62 ± 12	62 ± 12	62 ± 12	62 ± 12	50
Hoxa9 + MeisΔ334	123 ± 93	470 ± 190	62 ± 12	50	50	50	50
Hoxa9 + VP16-Meis	30 ± 2	980 ± 130	62 ± 12	50	75	75	75
Hoxa9 +VP16-MeisΔ*	31 ± 2	320 ± 60	75	25	75	50	25
VP16-Meis	83 ± 27	350 ± 30	62 ± 12	50	75	50	25
VP16-MeisΔ*	88 ± 33	280 ± 130	62 ± 12	50	75	62 ± 12	50

*- VP16-MeisΔ334

Correlation analysis failed to reveal any strong link between the oncogenes which caused the disease (e.g., *VP16-Meis1*, etc.), and such grouping of different leukemias, except for the clustering of *Hoxa9 + VP16-Meis1* leukemias in group 1A (see column 4-5 in Fig. 3.4B). Leukemias generated by *VP16-Meis1* or *VP16-Meis1Δ334* (column 6-7 in Fig. 3.4B) were scattered through all 5 groups, indicating that the *VP16-Meis* fusions had no deterministic role in the phenotype of the myeloid leukemias generated in this *in vivo* model.

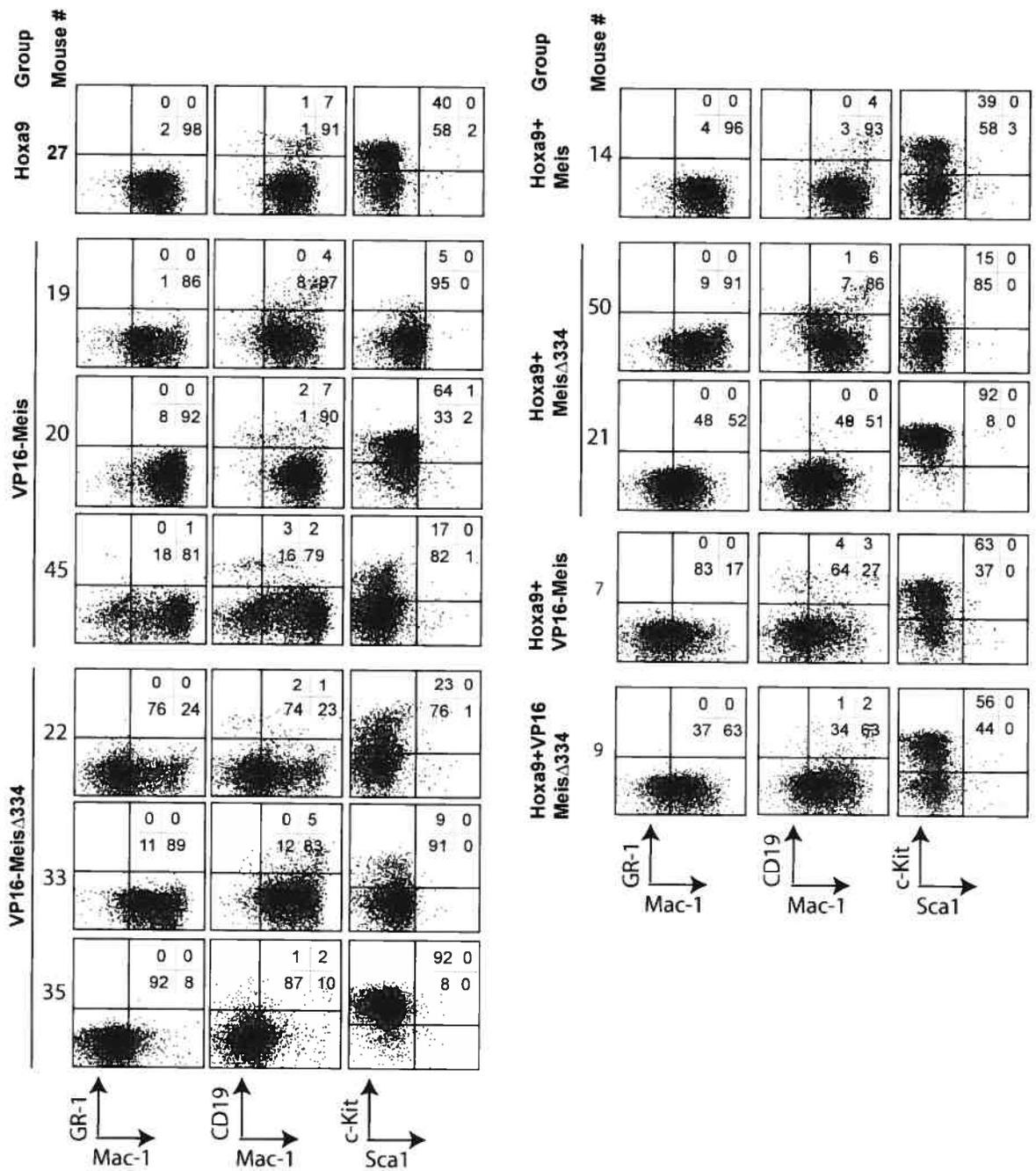
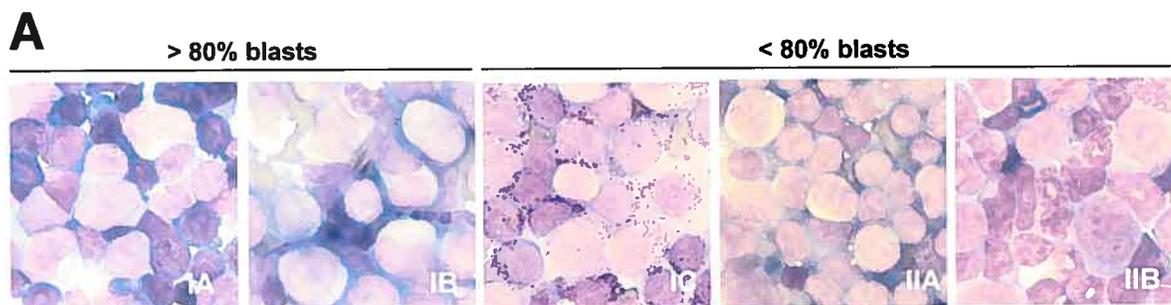


Fig. 3

Figure 3.3. Phenotypical analysis of leukemic cells. Bone marrow cells were co-stained with antibodies recognizing Mac-1 and Gr-1 (myeloid cells), or Mac-1 and CD19 (B cells), or Sca-1 and c-Kit (markers of primitive cells). Left panel: Representative bone marrow samples from mice transplanted with “doubly” transduced cells. Right panel: Representative bone marrow samples from mice transplanted with *Hoxa9* or VP16-Meis1, or VP16-Meis1 Δ 334 cells. Leukemia genotype (i.e., integrated provirus) and mouse ID# are indicated to the left of each panel.

Figure 3.4. Morphological characterization of leukemias. Top panel: Representative samples of Wright stained bone marrow preparations. 100-fold magnification. Group I, >80% blasts. IA, two distinct blast populations; IB, myeloblasts with pale granules; IC, myeloblasts with coarse granules. Group II, <80% blasts. IIA, >20% monocytes and differentiated myeloid cells; IIB, >20% differentiated myeloid cells. Bottom panel: Distribution of leukemias within 5 subgroups defined by characteristics shown for index cases presented in Fig. 4A. Genotypes of leukemias are listed at the top. Subgroup number, and major characteristics defining the subgroup are listed to the left. Different intensities of shading within the subgroups illustrate proportions of mice with the particular characteristics. White, 0%; Black, 100%. Subgroup classification and evaluation of each leukemia was performed by (G.S. and J.K.) and verified independently by a trained morphologist and cytogeneticist (Dr.J. Hébert).



B

Group	Hoxa9 n	Hoxa9+ Meis n	Hoxa9+ Meis Δ 334 n	Hoxa9+ VP16-Meis n	Hoxa9+ VP16-Meis Δ 334 n	VP16-Meis n	VP16- Meis Δ 334 n	Total
IA Undifferentiated with two distinct populations	0	0	0	6	7	0	1	14
IB Myeloblasts with pale granules	2	1	2	1	2	0	2	10
IC Myeloblasts with coarse granules	0	0	0	0	0	0	1	1
IIA >20% monocytes and differentiated myeloid cells	0	0	2	0	0	1	0	3
IIB >20% differentiated myeloid cells	1	4	3	0	0	2	1	11
Total	3	5	7	7	9	3	5	39

Figure 4

VP16-Meis leukemias contain *Hoxa* gene activation. We surveyed the expression of all *Hox* and TALE genes in 26 leukemias spanning all genotypes and different morphological groups listed in Fig. 3.4B (see row no1). The results of this comprehensive analysis are listed in Fig. 3.5, together with a summary comprising the genotype, morphological classification, and expression of surface markers (Mac1 and Kit) for each of these 26 leukemias.

In this analysis, the magnitude of *Hoxa9* overexpression driven by the MSCV retrovirus established a range of upper limit values to which levels of *Hox* expression in leukemias with other genotypes could be compared to. Levels of *Hoxa9* were between $2 \times 10^{6-7}$ copies per cell (mean \pm SD: $6\pm 4 \times 10^6$) in all leukemias which originated from cells engineered to overexpress this gene (column no. 1-19), whereas levels as low as 224 or 312 copies were observed in leukemias that developed in the absence of engineered *Hoxa9* overexpression (leukemia id no. 33 and 36, also no. 19 and 45 in Fig. 3.5). Interestingly, we observed that 3 leukemias (no. 20, 22 and 35) with the *VP16-Meis1* or *VP16-Meis1 Δ 334* genotype also expressed very high levels of *Hoxa9*. For example, leukemia no. 22 with 1B phenotype expressed 3×10^4 copies of *Hoxa9* per cell, whereas another 1B leukemia with the same genotype (no. 36) barely expressed this gene. Four (no. 19, 45, 33 and 36) out of seven *VP16-Meis1* or *VP16-Meis1 Δ 334* leukemias expressed very high levels of *Hoxa7* (on average 3×10^4 copies per cell). All other leukemias, in contrast, expressed only low levels of this gene. Moreover, within the cohort of *VP16-Meis1* or *VP16-Meis1 Δ 334* leukemias (last 7 columns of Fig. 3.5) there is a clear tendency for mutually exclusive

aberrant activation of either *Hoxa7*, or *Hoxa9*. These results suggest that *VP16-Meis1* and *VP16-Meis1 Δ 334* require activation of selected *Hoxa* genes, such as *Hoxa7* or *Hoxa9*, for leukemia development.

Analysis of *Hox* co-factor gene expression is presented in the bottom eight rows of Fig. 3.5. Most leukemias engineered to overexpress *Meis1* expectedly expressed high levels of this gene (all columns, except the first 3 showing values for *Hoxa9* leukemias). Interestingly, *Hoxa9* leukemia no. 23 (column 1) expressed very low levels of *Meis1* and did not show upregulation of other *Meis* family members, indicating that transformation induced by *Hoxa9* does not always require activation of *Meis1*. Levels of *Meis2* or 3 were either low, or undetectable in all leukemias. The *Meis*-like gene *Prep1* was highly expressed in all samples, while *Prep2* levels clustered at or below the threshold of detection. The *Meis* co-factors *Pbx1* was also expressed at very low levels, but majority of leukemias analyzed expressed high to very high levels of *Pbx2* and *Pbx3*.

Expression levels of *Hoxb* and *Hoxc* cluster genes varied between the different leukemias, but remained generally low to very low, except in leukemias no. 27 (*Hoxa9*) and 45 (*VP16-Meis*). *Hoxd* cluster genes, with the exception of *Hoxd11* and 12 (Fig. 3.5), were not expressed in our leukemias.

Collectively, our results provide a molecular dissection of the complex oncogenic activities of *Meis1*, and its unique link to *Hoxa* gene activation for leukemia development. They also provide a unique analysis of the relationship between *Hox* and *Meis* gene activation in leukemia.

Figure 3.5. Hox and TALE gene expression in leukemia specimens. *Expression of all 39 Hox and 8 TALE genes in BM cells from 26 mice with myeloid leukemia induced by overexpression of different sets of oncogenes, evaluated by absolute quantitative RT-PCR. Mice are grouped according to the inducing oncogene. Morphology classification (see Fig. 4) of individual leukemias together with determination of Mac and c-kit expression levels on leukemic cells are provided for each mouse. CT-values from all genes were converted into copy numbers (cn) based on the formula $cn=2^{(38-ct)}$. Visualisation of expression levels was enhanced by color coding; ie dark blue 0-20 copies, royal blue 20-50 copies, turquoise 50-100 copies, lime green 100-300 copies, yellow 300-1000 copies, pale orange 1,000-3,000 copies, orange 3,000-10,000 copies and expression of more than 10,000 copies was coded red. Note that the level of Hoxa9 expression in Hoxa9 induced leukemias (with or without overexpression of Meis1) is 1,000-10,000 fold higher than in leukemias that are not induced by retroviral*

Discussion

In these studies, we have used mutational analysis and fusion constructs to identify two important nucleating domains essential for the transforming activity of Meis1. One of these domains is located in the carboxy-terminal region of Meis1 and could be functionally substituted by VP16 in the VP16-Meis Δ 334 mutants, thereby conferring a new attribute to *Meis1*: oncogenic independency. Interestingly, and not unlike what has been suggested for Meis1, the oncogenic role of these fusion proteins appeared limited to myeloid cells and to involve obligatory activation of in *Hoxa* cluster genes, with prominent up-regulation of *Hoxa7* and *Hoxa9*. Proof for the genetic activation of *Hoxa9* as a collaborating event in VP16-Meis1 leukemia was determined within the setup of our studies (Fig. 3.2), thus reinforcing the functional validity of the results obtained by the quantitative RT-PCR assessment of *Hox* and *TALE* gene expression shown in Fig. 3.5.

Fusion of the exogenous transactivation domain of VP16 renders Meis1 independent of *Hoxa9*. The molecular explanation of how VP16 accomplishes this could be translated by a higher expression of target genes or a new set of genes implicated in leukemogenesis. One possible target of Meis1 in leukemia induction might be *Flt3* as levels of this gene correlate with the presence of overexpressed Meis1 (Wang et al. 2005).

The mechanism leading to the activation of *Hoxa7* or *a9* (and other *Hoxa* genes) in our VP16-Meis1 leukemias remains obscure, but the lack of consistency in *Hoxa* gene activation in the different leukemias (i.e., the last four groups in Fig. 3.5) strongly argues against direct transcriptional activation. In agreement with this, our initial analysis of chromatin immuno-precipitation using FLAG-Meis1

failed to reveal any sequences derived from the *Hoxa* gene loci (N.B. and G.S., unpublished observations). However, because of the activation of several *Hoxa* genes in the VP16-Meis1 leukemia (Fig 3.5), this could be due to activation by proviral insertion into regulatory regions shared by the *Hoxa* locus. In fact, preliminary results of inverse PCR revealed proviral integration in *Hoxa* locus in one mouse. Therefore, this could explain the apparent independence from *Hoxa9* in the transduction step but not in the full elaboration of the leukemia.

The unidirectional interaction between VP16-Meis \rightarrow *Hoxa* gene activation suggests that VP16-Meis1 uses similar transformation pathways as those used by Meis1. The restrictive collaboration between these two sets of genes was first suggested by the studies presented by Copeland and collaborators (Nakamura et al. 1996) showing that insertional activations of *Meis1* in BXH2 model of mouse AML were mostly detected together with those in the *Hox* gene clusters, whereas the converse situation was not necessarily true. In fact, it has been shown that *Hoxa9* and *Hoxa7* always collaborate with Meis1 for leukemogenic transformation. Moreover, this is not seen with *Hoxb9*, *Hoxb7* or *Hoxd9* despite the fact that work from the group of Capecchi demonstrated that there is functional difference between HOX genes from the same paralog group. This would suggest that in transduced cells, the simultaneous induction of *Hoxa9* and *Hoxa7* expression requires activation by retroviral insertion in regulatory regions shared by *Hoxa9* and *Hoxa7* ('open chromatin'). At least 2 integration events are necessary in the *Hoxa* and *Meis1* locuses to accelerate the induction of leukemia in these transplantation models. From this perspective, our findings reinforce an emerging model in cancer genetics predicting that oncogenic activation follows a given order of events that is at least in part dictated by the complementation group

to which the oncogene belongs. In this scenario, and from a genetic perspective, the promiscuity of possible oncogenic partners and the availability of a locus for oncogenic events would determine the probability leading to a sequential acquisition of genetic alterations leading to cancer.

The second nucleating domain of Meis1, critical for its oncogenic potency, was the PIM (or PBX1-interacting motif) which, in one experiment, was swapped with its known interacting motif in PBX1 (also known as MIM or Meis1-interaction motif). Within these studies, it was possible to create two dysfunctional proteins, each of them incapable of genetic interaction with HOXA9 for acceleration of leukemia onset *in vivo*. These two dysfunctional proteins were also incapable of spontaneously generating leukemia, even during long-term observation (data not shown), thus indicating that the inability of Meis1 to spontaneously induce leukemic transformation is not due to the limiting amounts of PBX proteins. Results of our TALE gene expression survey (Fig. 3.5) reinforce this argument, showing that although *PBX1* levels in our leukemias were low, the *PBX2* and *3* levels were high in most of our specimens. The combined introduction of the two dysfunctional mutants, PBX1(MIM>PIM) and Meis(PIM>MIM), together with HOXA9 resulted in leukemias that were very aggressive *in vivo*, considering that most were clonal or oligoclonal, and were highly proliferative *in vitro* (not shown). This highly aggressive nature suggested that our PBX1(MIM>PIM) mutant encompassed elements in addition to PIM that are limiting in wild-type MEIS1. One of these limitations could be MIM itself (now in Meis1 (PIM>MIM)), but not the DNA-binding elements in the homeodomain of PBX1, since both our PBX1(MIM>PIM) mutant lacking the

DNA-binding activity (Shanmugam et al. 1999) complemented the oncogenic potential of Meis1(PIM>MIM) as efficiently as the "wild-type" PBX1(MIM>PIM) (Fig. 3.1E). Now, it is well known that PBX1 recruits repressors complexes through its N-terminal domain. In fact, we could hypothesize that in our leukemic context, the DNA binding domain of PBX1 is not required, thus impeding conformational changes that could allow the N-terminal of Pbx to interact with repressors complexes. Thus, this favours the recruitment of activator complexes by Hox and Meis proteins, leading to the activation of genes implicated in leukemogenesis. Based on this reasoning, the second important domain remaining in PBX1 is its PIM. Providing that it is associated with Meis1, PIM retains its critical function even upon transfer into a heterologous protein, suggesting a context-independent nucleating activity for this domain. Whether PBX1, or more likely PBX2 or 3 (see Fig. 3.5) normally contributes to the assembly of such protein complexes or not remains to be determined, but our current observations support this possibility. This hypothesis can now be further tested with different leukemias described in this paper, and may represent a critical strategy for eradication of *Meis1*-induced leukemias.

Another interesting finding from our studies is the preferential activation of the *Hoxa* locus in the context of VP16-Meis1-induced leukemias. We and others have shown experimentally that *Hoxb* cluster genes (Fischbach et al. 2005; Thorsteinsdottir et al. 2001), N.M and G.S, unpublished observations) and likely all *Hox* genes in general (Maulbecker et al. 1993) have an inherent capacity to induce cellular transformation, and likely to collaborate with Meis1. Preferential activation of *Hoxa* cluster genes in mouse and human leukemias may thus reflect a greater availability of this locus, since our studies (this report, and (Bijl et al.

2005; Sauvageau et al. 1994)) have consistently shown the dominant expression of *Hoxa* cluster genes in the primitive hematopoietic cells.

Acknowledgements

Special thanks are owed to Dr. Josée Hébert, head of the Leukemia Cell Bank of Québec, for help with morphological analysis and to Melanie Frechette for assistance with the animal care and transplantation experiments. We also wish to thank Danièle Gagné from the flow cytometry service of IRIC for sorting and assistance in FACS analysis, and Christian Charbonneau of the imaging service for the capture and editing of images. Sylvie Provost and Claude Belisle with Q-PCR is also acknowledged. This work was supported by a grant from the National Cancer Institute of Canada to G.S. and from Génome Canada. A.M. was the recipient of a Canadian Institute of Health Research studentship and A.T. was supported by the fellowship from the American Cancer Society for Beginning Investigators (ACSBI) under the administration of Union Internationale Contre le Cancer (UICC). G.S. is a scholar of the Leukemia and Lymphoma Society of America and a recipient of a Canadian Research Chair in Molecular Genetics of Normal and Cancer Stem Cells.

References

- Abu-Shaar, M., Ryoo, H. D., and Mann, R. S., 1999. Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev.* **13**: 935-945.
- Afonja, O., Smith, J. E., Jr., Cheng, D. M., Goldenberg, A. S., Amorosi, E., Shimamoto, T., Nakamura, S., Ohyashiki, K., Ohyashiki, J., Toyama, K., and Takeshita, K., 2000. MEIS1 and HOXA7 genes in human acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **24**: 849-855.
- Armstrong, S.A., Staunton, J. E., Silverman, L. B., Pieters, R., den Boer, M. L., Minden, M. D., Sallan, S. E., Lander, E. S., Golub, T. R., and Korsmeyer, S. J., 2002. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat. Genet.* **30**: 41-47.
- Ayton, P.M. and Cleary, M. L., 2003. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev.* **17**: 2298-2307.
- Azpiazu, N. and Morata, G., 1998. Functional and regulatory interactions between Hox and extradenticle genes. *Genes Dev.* **12**: 261-273.
- Berthelsen, J., Zappavigna, V., Ferretti, E., Mavilio, F., and Blasi, F., 1998. The novel homeoprotein Prepl modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO J.* **17**: 1434-1445.

Bijl, J., Sauvageau, M., Thompson, A., and Sauvageau, G., 2005. High incidence of proviral integrations in the *Hoxa* locus in a new model of E2a-PBX1-induced B-cell leukemia. *Genes Dev.* **19**: 224-233.

Borrow, J., Shearman, A. M., Stanton, V. P., Jr., Becher, R., Collins, T., Williams, A. J., Dube, I., Katz, F., Kwong, Y. L., Morris, C., Ohyashiki, K., Toyama, K., Rowley, J., and Housman, D. E., 1996. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat.Genet.* **12**: 159-167.

Dash, A.B., Williams, I. R., Kutok, J. L., Tomasson, M. H., Anastasiadou, E., Lindahl, K., Li, S., Van Etten, R. A., Borrow, J., Housman, D., Druker, B., and Gilliland, D. G., 2002. A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**: 7622-7627.

Drabkin, H.A., Parsy, C., Ferguson, K., Guilhot, F., Lacotte, L., Roy, L., Zeng, C., Baron, A., Hunger, S. P., Varella-Garcia, M., Gemmill, R., Brizard, F., Brizard, A., and Roche, J., 2002. Quantitative HOX expression in chromosomally defined subsets of acute myelogenous leukemia. *Leukemia.* **16**: 186-195.

Fischbach, N.A., Rozenfeld, S., Shen, W., Fong, S., Chrobak, D., Ginzinger, D., Kogan, S. C., Radhakrishnan, A., Le Beau, M. M., Largman, C., and Lawrence, H. J., 2005. HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor *in vitro* and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia *in vivo*. *Blood.* **105**: 1456-1466.

Fujino, T., Suzuki, A., Ito, Y., Ohyashiki, K., Hatano, Y., Miura, I., and Nakamura, T., 2002. Single-translocation and double-chimeric transcripts: detection of NUP98-HOXA9 in myeloid leukemias with HOXA11 or HOXA13 breaks of the chromosomal translocation t(7;11)(p15;p15). *Blood*. **99**: 1428-1433.

Golub, T.R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., and Lander, E. S., 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. **286**: 531-537.

Green, N.C., Rambaldi, I., Teakles, J., and Featherstone, M. S., 1998. A conserved C-terminal domain in PBX increases DNA binding by the PBX homeodomain and is not a primary site of contact for the YPWM motif of HOXA1. *J.Biol.Chem.* **273**: 13273-13279.

Huang, H., Rastegar, M., Bodner, C., Goh, S. L., Rambaldi, I., and Featherstone, M., 2005. MEIS C termini harbor transcriptional activation domains that respond to cell signaling. *J.Biol.Chem.* **280**: 10119-10127.

Imamura, T., Morimoto, A., Takanashi, M., Hibi, S., Sugimoto, T., Ishii, E., and Imashuku, S., 2002. Frequent co-expression of HoxA9 and Meis1 genes in infant acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangement. *Br.J.Haematol.* **119**: 119-121.

Inbal, A., Halachmi, N., Dibner, C., Frank, D., and Salzberg, A., 2001. Genetic evidence for the transcriptional-activating function of Homothorax during adult fly development. *Development*. **128**: 3405-3413.

Look, A.T., 1997. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. **278**: 1059-1064.

Mann, R.S., 1995. The specificity of homeotic gene function. *Bioessays*. **17**: 855-863.

Maulbecker, C.C. and Gruss, P., 1993. The oncogenic potential of deregulated homeobox genes

1. *Cell Growth Differ*. **4**: 431-441.

Mayotte, N., Roy, D. C., Yao, J., Kroon, E., and Sauvageau, G., 2002. Oncogenic interaction between BCR-ABL and NUP98-HOXA9 demonstrated by the use of an *in vitro* purging culture system. *Blood*. **100**: 4177-4184.

Moskow, J.J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I. O., and Buchberg, A. M., 1995. Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol. Cell Biol*. **15**: 5434-5443.

Nakamura, T., Largaespada, D. A., Lee, M. P., Johnson, L. A., Ohyashiki, K., Toyama, K., Chen, S. J., Willman, C. L., Chen, I. M., Feinberg, A. P., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Shaughnessy, J. D., Jr., 1996. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat. Genet*. **12**: 154-158.

Perkins, A.C. and Cory, S., 1993. Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *EMBO J*. **12**: 3835-3846.

Popperl, H., Bienz, M., Studer, M., Chan, S. K., Aparicio, S., Brenner, S., Mann, R. S., and Krumlauf, R., 1995. Segmental expression of Hoxb-1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon exd/pbx. *Cell*. **81**: 1031-1042.

Raza-Egilmez, S.Z., Jani-Sait, S. N., Grossi, M., Higgins, M. J., Shows, T. B., and Aplan, P. D., 1998. NUP98-HOXD13 gene fusion in therapy-related acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*. **58**: 4269-4273.

Ryoo, H.D., Marty, T., Casares, F., Affolter, M., and Mann, R. S., 1999. Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development*. **126**: 5137-5148.

Sauvageau, G., Lansdorp, P. M., Eaves, C. J., Hogge, D. E., Dragowska, W. H., Reid, D. S., Largman, C., Lawrence, H. J., and Humphries, R. K., 1994. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**: 12223-12227.

Shanmugam, K., Green, N. C., Rambaldi, I., Saragovi, H. U., and Featherstone, M. S., 1999. PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Mol.Cell Biol.* **19**: 7577-7588.

Shen, W.F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Kom ves, L. G., Lawrence, H. J., and Largman, C., 1999. HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol.Cell Biol.* **19**: 3051-3061.

Taketani, T., Taki, T., Shibuya, N., Kikuchi, A., Hanada, R., and Hayashi, Y., 2002. Novel NUP98-HOXC11 fusion gene resulted from a chromosomal break within exon 1 of HOXC11 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Cancer Res.* **62**: 4571-4574.

Thompson, A., Quinn, M. F., Grimwade, D., O'Neill, C. M., Ahmed, M. R., Grimes, S., McMullin, M. F., Cotter, F., and Lappin, T. R., 2003. Global down-regulation of HOX gene expression in PML-RARalpha + acute promyelocytic leukemia identified by small-array real-time PCR. *Blood.* **101**: 1558-1565.

Thorsteinsdottir, U., Kroon, E., Jerome, L., Blasi, F., and Sauvageau, G., 2001. Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol. Cell Biol.* **21**: 224-234.

Thorsteinsdottir, U., Krosi, J., Kroon, E., Haman, A., Hoang, T., and Sauvageau, G., 1999. The oncoprotein E2A-Pbx1a collaborates with Hoxa9 to acutely transform primary bone marrow cells. *Mol. Cell Biol.* **19**: 6355-6366.

Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H. J., Humphries, K., and Sauvageau, G., 2002. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood.* **99**: 121-129.

Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., Hough, M. R., Dragowska, W., Lansdorp, P. M., Lawrence, H. J., Largman, C., and Humphries, R. K., 1997. Overexpression

CHAPITRE IV

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE
MODULATEURS DE LA FONCTION DE MEIS1 DANS LES
CELLULES LEUCÉMIQUES**

HOXA9 + MEIS1

1. Introduction

Les études du chapitre III ont démontré que le domaine C-terminal (à partir des acides aminés 334) de MEIS1 renfermant une activité de transactivation est essentiel pour son potentiel oncogénique dans le contexte de la leucémie induite par *Hoxa9*. Ces résultats ont suggéré que MEIS1 pourrait faire partie d'un complexe de transactivation impliqué dans la leucémie *Hoxa9 + Meis1*. Pour identifier les protéines collaboratrices de MEIS1 dans l'activation des voies de transformation, j'ai adopté le système du double hybride en utilisant la séquence codante complète de *Meis1* comme appât pour cribler une librairie d'ADN complémentaire générée à partir des cellules leucémiques *Hoxa9 + Meis1*. (Figure 4.1).

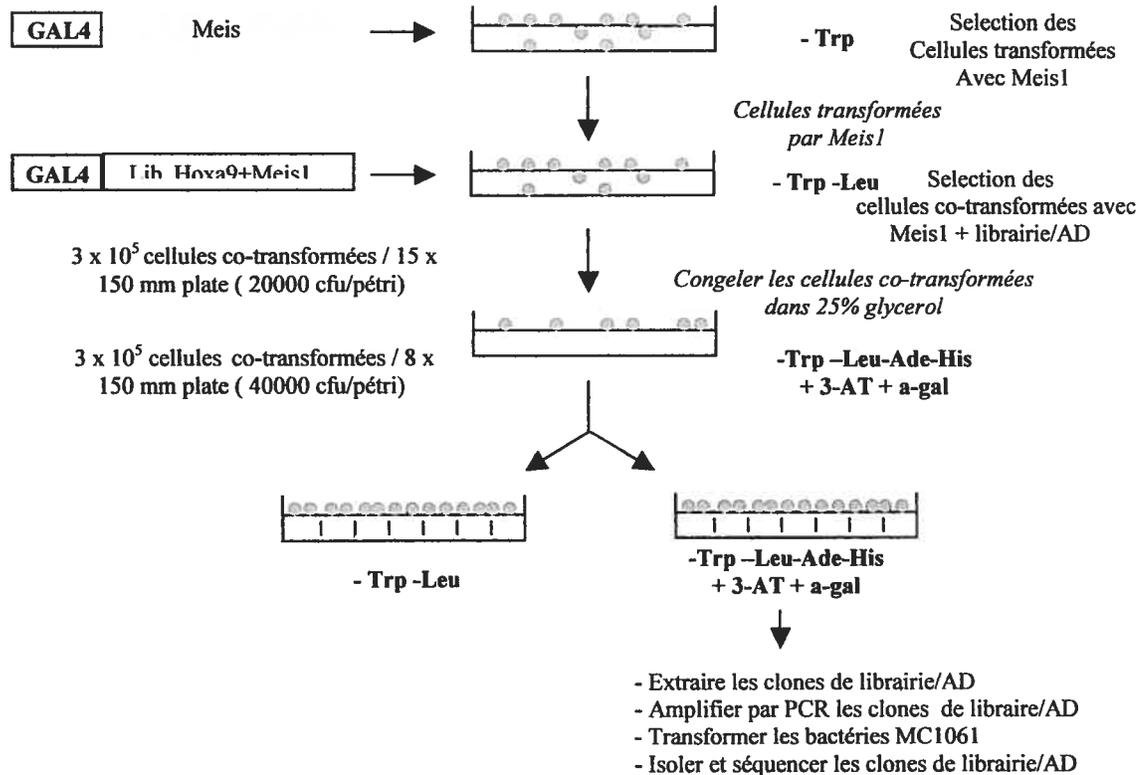


Figure 4.1: Transforamtion et criblage des levures. *Abbrév. Trp: tryptophane; Leu: leucine; Ade; adenine; His: histidine; AT: 3-amino-1,2,4 triazole, un inhibiteur competitive de la proteine His3; AD: domaine d'activation; Lib: librairie.*

2. Matériel et méthodes

2.1. Génération et amplification de l'ADN complémentaire

La génération d'une librairie d'ADN recombinant à partir de l'ADN génomique ou de l'ADN complémentaire consiste à produire une grande population de clones afin que chaque séquence d'intérêt soit représentée au moins une fois. En général, l'ADN génomique ou l'ADN complémentaire sont manipulés afin d'être insérés dans le vecteur choisi. Le vecteur et l'ADN sont ensuite ligués ensemble et introduits dans les bactéries *E. coli* soit par transformation directe ou par

infection à l'aide de phage. J'ai utilisé une librairie d'ADN génomique de phage et une librairie d'ADN complémentaire.

2.1.1. Représentation et 'randomness'

2.1.1.1. La librairie d'ADN complémentaire

La taille d'une librairie d'ADN complémentaire (ADNc) nécessaire pour inclure le clone d'intérêt dépend directement de l'abondance relative de l'ARN messager d'intérêt. En général, cette abondance n'est pas déterminée avec précision. De plus, la représentation de certaines séquences dans la librairie d'ADNc, particulièrement les bouts en 5' de larges messagers, ne correspond pas à leur abondance en ARN messager. Donc, il est préférable de construire une librairie qui contient au moins 3-5 x fois plus de recombinants par rapport au nombre total indiqué par la plus faible abondance estimée.

2.1.2. Criblage de bibliothèques d'ADN recombinant

Le criblage de bibliothèques implique le développement d'un essai rapide pour déterminer si un clone particulier contient la séquence d'acides nucléiques désirée. Cet essai est utilisé en premier pour identifier le clone d'ADN recombinant d'intérêt présent dans la librairie et ensuite de le purifier. Cette méthode de criblage est effectuée sur des colonies de bactéries contenant des plasmides (connues sous 'colony-forming unit (cfu)') ou des phages de bactériophages (connues sous 'plaque-forming unit (pfu)'). Pour déterminer le nombre de cfu pour la librairie d'ADNc générée dans notre laboratoire, j'ai suivi le protocole suivant : 5 µL d'aliquot de la librairie ont été rajoutés à 5 µL de

milieu LB. Ceci est une dilution 1 :1. 1 μL de cette solution a été transféré à 1 mL de milieu LB. C'est la dilution A ($1 : 2 \times 10^3$). 1 μL de la solution A a été rajouté à 1 ml de milieu LB. C'est la dilution B ($1 \times 2 \times 10^6$). 1 μL de la solution A a été ajouté à 50 μL de LB et étalé entièrement sur un pétri de 100 mm de LB/Ampicilline (100 mg/mL). De même, des aliquots de 50 et 100 mL de la solution B ont été étalés sur des pétris de 100 mm de LB/Ampicilline. Ces pétris ont été incubés à 30°C pendant 24-36 heures et les colonies ont été comptés pour déterminer le titre. Dilution A : nombre de colonies $\times 2 \times 10^3 \times 10^3 = \text{cfu/mL}$; dilution B; nombre de colonies $\times 2 \times 10^3 \times 10^3 \times 10^3 = \text{cfu/mL}$.

Avant d'initier le criblage d'une librairie, un des paramètres critique est de déterminer le nombre de clones à cribler dans la librairie afin d'identifier le clone d'intérêt. Ce qui signifie, quelle est la fréquence du clone d'intérêt dans la librairie? La prédiction de la fréquence est différente pour les librairies d'ADN génomique ou d'ADNc comme ceci est discuté plus bas.

2.1.2.1. Criblage d'une librairie d'ADNc

La librairie d'ADNc optimale est générée à partir de tissus ou de cellules exprimant la séquence d'ARN messager (ARNm) d'intérêt à des niveaux élevés. Dans les cellules différenciées, la fréquence d'un ARNm donné peut être estimé à 1/20 molécules d'ARNm poly (A)⁺, alors que d'autres ARNm sont soit absents soit présents à une fréquence de 1/10⁵ molécules d'ARNm poly (A)⁺. Le nombre de clones à cribler est déterminé par l'abondance de l'ARNm dans la cellule.

La première a été obtenue du laboratoire du Dr. Sylvain Meloche (Université de Montréal) et générée en sous-clonant l'ADN génomique extrait des cellules embryonnaires SV129 dans le vecteur lambda λ GEM12. La seconde a été générée dans notre laboratoire à partir des cellules leucémiques *Hoxa9* + *Meis1* comme ceci est décrit ci-dessous (Figure 4.2).

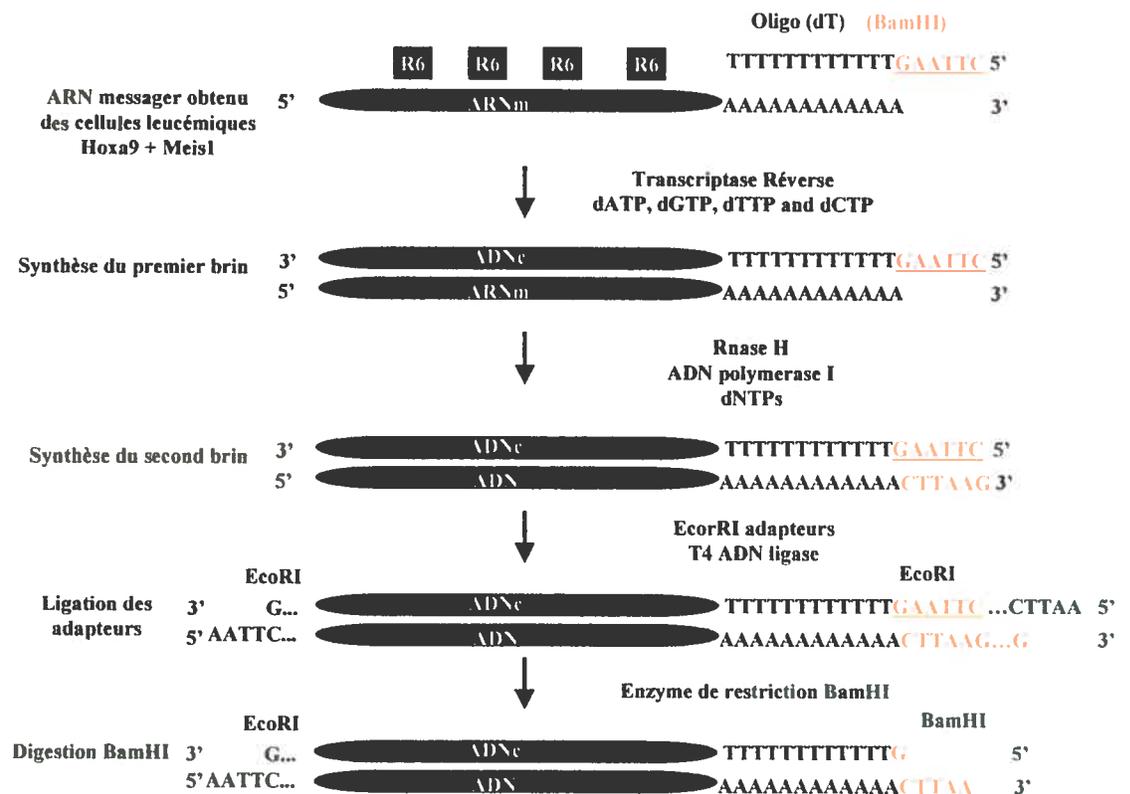


Figure 4.2: Génération d'une librairie d'ADN complémentaire à partir des cellules leucémiques *Hoxa9* + *Meis1*

Cette technique a été précédemment décrite et consiste en une amplification représentative de la totalité d'ADN complémentaire à partir d'un petit nombre de cellules hématopoïétiques en utilisant une amorce d'oligo dT et une queue de poly A. Cette technique a été modifiée afin de tenir compte de l'amplification d'ADN

complémentaire de rares transcrits et d'obtenir des séquences de plus de 2 kb en amont du site de polyadénylation. Brièvement, 1,500 à 10,000 cellules sont centrifugées et lysées dans une solution de Trizol et l'ARN est extrait suivant les indications du manufacturier (GIBCO/BRL). 0,1 µg d'ARN est précipité en ajoutant 1/10 du volume d'acétate d'ammonium 7,5 mol/L, 20 µg de glycogène jouant le rôle de transporteur et 2 volumes d'éthanol. Les culots des cellules centrifugées sont rincés avec de l'éthanol 70%, séchés à température de la pièce et resuspendus dans 9,5 µL d'une solution contenant 6,1 µL d'eau traitée à la diéthylpyrocarbonate, 2 µL du tampon de la Transcriptase Réverse (TR) (GIBCO, BRL), 1 µL de dithiothreitol (0,1 mol/L), 0,2 µL de dNTPs à 25 mmol/L (GIBCO, BRL), 0,2 µL de l'amorce de 60 nucléotides dT (oligo dT) [1 µg/µL; 5'-CAT-GTC-GTC-CAG-GCC-GCT-CTG-GAC-AAA-ATA-TGA-ATT-CT (24)-3'] et 100U de l'enzyme 'Moloney murine leukemia virus (MMLV) Super Script II reverse transcriptase' (GIBCO, BRL). Les échantillons ont été incubés à 40°C pendant 1 heure, dénaturés à 75°C pendant 10 minutes et précipités à l'éthanol additionné d'acétate d'ammonium et du transporteur de polyacrylamide. Le culot a été lavé une fois avec l'éthanol 70%, suspendu dans 5 µL d'une solution contenant 1 µL du tampon de la 'terminal deoxynucleotidyl transferase' (TdT) (GIBCO, BRL), 0,5 µL de dATP à 100 mmol/L (GIBCO, BRL), 3,5 µL d'eau et 0,5 µL de l'enzyme TdT (15 U/µL), (GIBCO, BRL) et incubé à 37°C pendant 15 minutes. Après l'inactivation par la chaleur à 75°C pendant 10 minutes, cette solution a été directement rajoutée à une solution pour une amplification par PCR, contenant 25 µL du tampon de PCR (20 mmol/L de Tris pH 8,8, 100 mmol/L de KCl et 9 mmol/L de MgCl₂), 4 µL de l'amorce de 60 nucléotides (identique à

celle décrite précédemment), 0,5 µL de l'albumine de sérum bovin exempt de nucléases (10 mg/mL) (Sigma), 5,25 mL d'eau et 2 µL des déoxycléotides triphosphorylés dGCT à 25 mmol/L. 5U de la polymérase Taq ont été ajoutés à chacun des tubes et l'ADN complémentaire total a été amplifié en utilisant les paramètres suivants : 1^{er} cycle : 94°C pour 1 minute, 37°C pour 2 minutes et 72°C pour 10 minutes et 44 cycles : 94°C pour 1 minute, 55°C pour 2 minutes et 72°C pour 10 minutes, dans un 'Ericomp thermal cycler' (Ericomp, San Diego, CA).

2.2. Production d'anticorps polyclonaux BAF250

Deux protéines de fusion ont été générées dans des vecteurs d'expression bactériens. La première est la MBP-BAF250 (pour 'maltose-binding protein BAF250') et la deuxième est la GST-BAF250 (pour 'glutathione-S-transferase BAF250'). La MBP-BAF250 a été utilisée pour immuniser des lapins. L'anti-sérum spécifique à BAF250 a été purifié sur une colonne d'affinité GST préparée avec la protéine recombinante GST-BAF250. La description détaillée de cette production a été comme suit :

2.2.1. Constructions

Pour générer la protéine de fusion GST-BAF250, le fragment BAF250 obtenu du double hybride a été sous-cloné dans les sites EcoRI/XhoI du vecteur pGEX, 'in frame' et en C-terminal par rapport à GST. Pour générer la protéine de fusion MBP-BAF250, BAF250 a été sous-clonée dans le vecteur pMALC, 'in frame' et en C-terminal par rapport à MBP en adoptant la stratégie suivante : le vecteur et

l'insert (BAF250 dans pGEX) ont été coupés en premier avec XhoI, traités à la polymérase T4 pour créer un bout 'blunt' et ensuite les fragments ont été digérés avec EcoRI.

2.2.2. Production de protéines de fusion

2.2.2.1 MBP-BAF250

Un litre de milieu riche (10 g de tryptone, 5 g d'extraits de levure, 5 g de NaCl, 2 g de glucose) + Ampicilline (100 µg/mL) a été inoculé avec 10 mL de culture de bactéries compétentes BL21pLysS transformées avec le vecteur d'expression pMALC-BAF250. Cette culture a été incubée à 37°C jusqu'à une O.D. de 0,5. l'IPTG a été ajouté à une concentration finale de 0,3 mM et les cellules ont été réincubées à 37°C pendant 2 heures. Les cellules ont été centrifugées à 4,000 rpm pendant 10 minutes et resuspendues dans 50 ml d'un tampon A contenant 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 200 mM de NaCl et 1 mM EDTA. Les échantillons ont été lysés par congélation et redécongélation. Ils ont été soniqués (temps total de sonication est de 2 minutes) et la protéine libérée a été détectée en utilisant un essai de Bradford. 10 µL du sonicat a été ajouté à 1,5 mL du réactif de Bradford et le contenu protéique a été déterminé à une O.D. de 562 nm. Les échantillons ont été centrifugés à 9,000 rpm pendant 30 minutes et chacun des surnageants a été dilué à 1:5 avec le tampon A. Une Econocolonne jetable (BiorRad) contenant de la résine d'amylose a été utilisée et lavée avec 8 volumes de tampon A. Le surnageant dilué a été déposé sur la colonne à une vitesse d'écoulement de 1mL/minute approximativement. La colonne a été lavée avec 8 volumes de tampon A et la protéine de fusion a été éluée avec le tampon A additionné de 10

mM de maltose. Un total de 10 à 20 fractions de 3 ml a été collecté et la protéine éluée a été détectée dans les 5 premières fractions. Les fractions contenant la MBP-BAF250 ont été additionnées et concentrées à 1 mg/mL à l'aide des colonnes 'Amicon Centricon'. La protéine de fusion MBP-BAF250 a été utilisée pour immuniser 2 lapins.

2.2.2.2. *GST-BAF250*

Un litre de milieu LB + Ampicilline a été inoculé avec 50 mL de culture de bactéries BL21pLysS compétentes transformées avec le vecteur d'expression pGEX-BAF250. Les bactéries ont été incubées à 37°C jusqu'à une O.D. de 0,5-0,7. Ces cellules ont été induites par l'addition de 1 mM d'IPTG et incubées à 25°C pendant 16 heures. Après l'induction, les cellules ont été centrifugées à 4,000 rpm à 4°C pendant 20 minutes et resuspendues dans 25 mL de tampon de lyse froid (50 mM de NaCl, 50 mM de Tris-base, 5 mM EDTA, 1 µg/mL de leupeptine, 0,15 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF)). La suspension a été soniquée pendant plusieurs pulses de 15 secondes jusqu'à ce qu'elle devienne claire. Le lysat a été centrifugé à 10,000 rpm, à 4°C pendant 20 minutes. Le surnageant qui contient la protéine de fusion soluble a été transféré dans des tubes de 50 mL.

La colonne de glutathione a été préparée avec 2 mL de 'glutathione-Sepharose 4B'. Elle a été lavée avec 5 volumes de PBS afin d'éliminer l'éthanol provenant de la solution de storage. Le surnageant a été ajouté à la colonne pré-équilibrée et lavée avec 5 volumes de PBS/EDTA/PMSF (1X PBS, 5 mM EDTA, 0,15 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 7,4). La protéine de fusion a été éluée en rajoutant 5 volumes de tampon de glutathione (50 mM Tris pH 8, 10 mM

glutathione réduite). La protéine éluée a été analysée par SDS-PAGE. La protéine de fusion GST-BAF250 a été utilisée pour la purification du sérum (5 mg).

2.2.2.3. *Protocole d'immunisation des lapins*

Les stimulateurs non-spécifiques de la réponse immune sont connus sous le nom d'adjuvants. L'adjuvant le plus utilisé est l'adjuvant de Freund. Ce dernier est une émulsion d'eau dans l'huile, préparée à partir des huiles non-métabolisables. Si le mélange contient la bactérie *M.tuberculosis* inactivée, l'adjuvant est connu sous le nom de Freund complet (CFA pour 'complete Freund's adjuvant'). Sans cette bactérie, il est appelé adjuvant de Freund incomplet (IFA pour 'incomplete Freund's adjuvant'). L'adjuvant de Freund est considéré comme l'un des meilleurs adjuvants car il provoque une réponse forte et prolongée. Pour éviter les complications secondaires, la première injection doit être administrée avec l'adjuvant complet, alors que tous les 'boosts' sont faits avec l'adjuvant incomplet. Une solution saline renfermant l'antigène est mélangée à un volume égal d'adjuvant contenu dans de l'huile, pour former une émulsion. Pour obtenir cette émulsion, j'ai utilisé des seringues en verre contenant soit l'adjuvant ou l'antigène, et connectées entre elles par une valve. Deux lapins ont été utilisés pour des injections sous-cutanées. Pour la première injection, 500 µg de la protéine de fusion MBP-BAF250 ont été mélangés avec le CFA. Trois semaines plus tard, les lapins ont été immunisés avec 500 µg de MBP-BAF250 mélangée à de l'IFA. Deux semaines après la seconde injections, des échantillons de sérum ont été recueillis pour vérifier la production d'anti-BAF250 spécifique. Six semaines après la deuxième injection, les lapins ont été une dernière dose de 500

μg de MBP-BAF250 mélangée avec de l'IFA. Deux semaines après la dernière injection, les lapins ont été sacrifiés et 100 mL de sang a été collecté de chaque lapin. Le sang a été maintenu à 37°C pendant 60 minutes. Le sérum a été séparé du 'coagulat' et le matériel insoluble a été écarté par centrifugation à 10,000 rpm, à 4°C pendant 10 minutes. Des aliquots de 4 mL de sérum additionné de 0,02% de NaN₃ ont été préparés et congelés à -80°C.

2.2.2.4. Purification d'anti-sérum sur une colonne d'affinité

GST-BAF250

La protéine de fusion GST-BAF250 a été dialysée contre 4 L de PBS pendant 15 heures à 4°C. 5 mg de la protéine a été utilisée pour la colonne d'affinité. 1 g de 'CNBr-activated Sepharose 4B' a été resuspendu dans 200 ml d'une solution de HCl 1 mM. Le gel a été lavé une fois avec le tampon B (1X : 0,1 M de NaHCO₃, 0,5 M de NaCl, pH 8,3). La protéine de fusion a été diluée 1:2 dans le tampon B (2X) et mélangée avec le gel à température de la pièce pendant 1 heure. Le gel a été centrifugé et lavé une fois avec le tampon B (1X) pour écartier le ligand en excès. 5 volumes de 0,2 M glycine pH 8 ont été rajoutés au gel et incubés à température de la pièce pendant 2 heures. Le gel a été ensuite transféré dans une Éconocolonne (BioRad) et lavée successivement avec 5 volumes de tampon B (1X), 5 volumes de 0,1 M Tris pH 8/ 0,5 M NaCl et 5 volumes de 0,1 M de glycine pH 2,5. Pour l'étape de neutralisation, 5 volumes de TBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris-base pH 8) ont été ajoutés, suivis successivement de 5 volumes de 0,1 M triéthylamine pH 11,5 et de 5 volumes de TBS.

Un aliquot de sérum a été dilué 1:2 et déposé sur la colonne précédente. Après le dépôt de l'échantillon, la colonne a été lavée avec 10 mL de TBS suivis de 10 mL

de 10 mM Tris pH 7,5/ 0,5 M NaCl. L'anticorps a été élué en ajoutant 12 mL de 0,1 M glycine pH 2,5 sur la colonne. Le sérum élué a été collecté dans des tubes de 1 ml contenant 75 µl de 1 M Tris pH 8. La dernière étape consistait à élué l'anticorps à un pH basique soit en ajoutant sur la colonne 12 mL de 0,1 M triéthylamine pH 11,5. L'anticorps élué a été élué dans des tubes de 1 mL contenant 75 µL de 1 M Tris pH 8. Les échantillons contenant les protéines ont été dialysés contre 4 L de PBS et concentrés à 1 mg/ml en utilisant les colonnes 'Amicon Centricon'.

2.3. Immunoprécipitation et Immunobuvardage

Les cellules adhérentes 293T ont été trypsinisées et lavées 2 fois avec du PBS. Les cellules en suspension Hoxa9 + Meis1 ont été centrifugées et le culot a été lavé avec du PBS. Les culots de cellules ont été resuspendus dans du tampon de lyse cellulaire NP-40 (150 mM NaCl, 1% NP-40 et 50 mM Tris pH 8) et incubées sur glace pendant 30 minutes. Les lysats ont été centrifugés à 40,000 rpm, 4°C pendant 20 minutes. Pour l'immunoprécipitation, 500 µg de protéines ont été incubés avec des billes de protéine A (pour l'anticorps développé chez le lapin) ou de protéine G (pour l'anticorps développé chez la souris) pendant 2 heures à 4°C. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 12,000 rpm à 4°C, pendant 3 minutes et resuspendues dans 250 µl de tampon NP-40. Suivant le cas, 2,5 µg d'anticorps anti-FLAG ou 5 µg d'anti-BAF250 ont été ajoutés aux échantillons et incubés sous rotation à 4°C pendant 16 heures. Les échantillons immunoprécipités ont été centrifugés, lavés 5 fois avec le même tampon NP-40 et resuspendus dans 30 µl de tampon de Laemmli (1X) (2% SDS, 10% glycérol, 100

mM DTT, 60 mM Tris (pH 6,8) et 0,001% bleu de bromophénol). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur des membranes d'Immobilon P (Millipore). Les membranes ont été incubées dans une solution de lait 5% pendant 1 heure à température de la pièce. L'hybridation avec l'anticorps monoclonal GFP (dilué à 1:100) ou l'anti-Meis1 polyclonal (dilué à 1:500) a duré 2 heures à 25°C. Les membranes ont été lavées avec une solution de TBST (2 x 7 minutes) et les anticorps secondaires (anti-lapin (dilué à 1:50,000) ou anti-souris (dilué à 1: 10,000) conjugués à la peroxydase de raifort) ont été rajoutés dans une solution de lait de 5% et l'incubation sous rotation a duré 30 minutes à température de la pièce. Les membranes ont été lavées avec du TBST (4 x 7 minutes). La révélation par 'chemiluminescence' a été suivant les instructions du fabricant (ECL, Amersham).

2.4. Le système du double hybride

Chez la levure, les gènes requis pour le métabolisme du galactose sont contrôlés par 2 protéines régulatrices, GAL4 et GAL80 et par le carbone provenant du milieu environnant. En présence de galactose, la protéine GAL4 lie des éléments de réponse retrouvés dans la région régulatrice 'UAS' (pour 'upstream activating sequence') située en amont de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du galactose. Cette liaison induit une activation de la transcription des gènes. En présence de glucose, la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du galactose est immédiatement réprimée. La régulation étroite de l'UAS de GAL par GAL4 rend ce système, un outil de grande valeur pour manipuler l'expression des gènes rapporteurs du double hybride dépendant du domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (DNA-BD pour 'DNA-binding domain'). Pour le système du

double hybride, les gènes *gal4* et *gal80* des levures sont délétés afin de prévenir toute interférence avec les protéines endogènes GAL4 et GAL80. Dans ces conditions, le glucose ne peut réprimer la transcription des gènes et l'activation transcriptionnelle est notée après l'interaction entre 2 partenaires protéiques.

La souche de levure utilisée est AH109, qui contient 4 gènes rapporteurs – ADE2, HIS3, LacZ et MEL1 – qui sont intégrés dans le génome de l'hôte à différentes places et ont des régions de TATA et de UAS qui sont distinctes. Ces éléments de promoteur distincts éliminent automatiquement trois catégories majeures de faux positifs : 1) l'interaction des protéines en amont du gène rapporteur; 2) l'interaction directe à des séquences voisines du site de liaison de GAL4; 3) l'interaction avec des facteurs de transcription liant les séquences d'ADN TATA.

La souche de levure AH109 exprime les enzymes α -galactosidase et β -galactosidase. Les interactions positives sont identifiées par un simple criblage de colonies bleues/blanches en rajoutant le substrat de l' α -galactosidase directement dans le pétri de sélection ou en adoptant l'essai standard de β -galactosidase.

Pour faciliter la confirmation des interactions protéiques dans le système du double hybride utilisé, les vecteurs pGBKT7 (domaine de liaison à l'ADN (BD)) et pGADT7 (domaine d'activation transcriptionnelle (AD)) possèdent 3 caractéristiques majeures :

- pGBKT7 et pGADT7 codent pour les épitopes de c-Myc et HA respectivement. Ceci élimine la nécessité de générer des anticorps spécifiques aux nouvelles protéines et les protéines de fusion sont identifiées facilement grâce aux anticorps commerciaux anti-c-Myc et anti-HA disponibles commercialement.

- Les vecteurs ont le promoteur T7 qui permet la transcription et la traduction *in vitro* et est utilisé comme une amorce pour le séquençage d'ADN. Les séquences du promoteur T7 sont localisées en amont des épitopes et en aval de GAL4 afin d'éviter toute interférence avec le domaine de GAL4 durant les essais de co-immunoprécipitation *in vitro*.
- PGBKT7 et pGADT7 codent pour différents marqueurs de sélection permettant des les purifier de E. coli indépendamment. Ainsi, pGBKT7 code pour le gène de la résistance à la kanamycine alors que pGADT7 code pour le gène de résistance à l'ampicilline. La quantité et la qualité des plasmides isolés à partir de E. coli sont satisfaisantes pour le séquençage afin d'identifier rapidement les partenaires protéiques.

2.4.1. Transformation de levure

L'ADN complémentaire de Meis1 a été sous-cloné dans pGBKT7. La librairie d'ADNc des cellules leucémiques Hoxa9 + Meis1 a été sous-clonée dans pGADT7. Les levures compétentes transformées avec Meis1 et la librairie d'ADNc sont obtenues en 2 étapes :

- La première étape consiste à sélectionner les levures AH109 transformées avec pGBKT7-Meis1
- La deuxième étape consiste à transformer AH109 contenant Meis1 avec pGADT7-librairie d'ADNc (Hoxa9 + Meis1) et sélectionner pour les levures doublement transformées.

*2.4.1.1. Transformation des levures AH109 avec pGBKT7-**Meis1*

Pour la transformation des levures, j'ai suivi le protocole de la méthode d'acétate de lithium (LiAc). Des cultures de levures dans du milieu YPD (20 g/L de peptone Difco, 10 g/L d'extrait de levure) additionné de 0,003% d'adénine hémisulfate (YPDA) ont été incubées à 30°C, sous rotation jusqu'à une O.D. de 0,5. Les cellules ont été centrifugées à 1,500 rpm, pendant 5 minutes et resuspendues dans 15 mL d'eau stérile. Après une deuxième centrifugation, le culot a été resuspendu dans 750 mL d'une solution stérile de TE (1 M Tris, 0,5 EDTA pH 8)/0,1 M LiAc. 0,5 µg de pGBKT7 et 50 µg d'ADN de sperme de saumon ont été mélangés à 50 µL de levures AH109 auxquels 300 µL d'une solution stérile de 40% PEG 4000/TE/0,1 M LiAc (pH 7,5) ont été additionnés. Le tout a été incubé à 30°C sous rotation pendant 30 minutes. 10% DMSO a été rajouté au mélange précédent et les levures ont été soumises à un choc thermique à 42°C pendant 10 minutes puis déposées sur glace. Pour sélectionner les levures AH109 transformées avec pGBKT7-Meis1, les cellules ont été étalées sur des pétris contenant le milieu de sélection SD dépourvu de l'acide aminé leucine (Selection Dropout : 6,7 g/L de 'yeast nitrogen base without amino acids' + une solution (1X) renfermant les acides aminés suivants : L-isoleucine, L-valine, L-Adénine hémisulfate, L-arginine-HCl, L-lysine-HCl, L-histidine, L-méthionine, L-tryptophane, L-uracil, L-phénylalanine, L-thréonine, L-tyrosine).

2.4.1.2. Transformation des levures AH109 contenant pGBKT7-Meis1 avec pGADT7-librairie d'ADNc de Hoxa9 + Meis1

Des cultures de levures dans du milieu SD dépourvu de l'acide aminé leucine ont été incubées à 30°C, sous rotation jusqu'à une O.D. de 0,5. Les cellules ont été centrifugées à 1,500 rpm, pendant 5 minutes et resuspendues dans 15 mL d'eau stérile. Après une deuxième centrifugation, le culot a été resuspendu dans 750 mL d'une solution stérile de TE (1 M Tris, 0,5 EDTA pH 8)/0,1 M LiAc. 0,5 µg de pGADT7-librairie d'ADNc de Hoxa9 + Meis1 et 50 µg d'ADN de sperme de saumon ont été mélangés à 50 µL de levures AH109 auxquels 300 µl d'une solution stérile de 40% PEG 4000/TE/0,1 M LiAc (pH 7,5) ont été additionnés. Le tout a été incubé à 30°C sous rotation pendant 30 minutes. 10% DMSO a été rajouté au mélange précédent et les levures ont été soumises à un choc thermique à 42°C pendant 10 minutes puis déposées sur glace. Pour sélectionner les levures doublement transformées (pGBKT7-Meis1 + pGADT7-librairie d'ADNc), les cellules ont été étalées sur des pétris renfermant le milieu de sélection SD dépourvu des acides aminés leucine et tryptophane.

Les colonies contenant pGBKT7-Meis1 et pGADT7-librairie d'ADNc sont diluées dans 100 ml de SD- Leu-Trp et étalées sur des pétris d'interaction contenant le milieu de sélection SD-Leu-Trp-His-Ade + 3-AT + α-gal pour identifier les partenaires interagissant avec Meis1. Les colonies bleues ayant un diamètre de 2 mm et apparaissant à l'intérieur de 5 jours, sont sélectionnées pour extraire l'ADN afin d'identifier le partenaire potentiel de Meis1. Pour ceci, les colonies sont resuspendues dans une solution de sorbitol /EDTA (1 M sorbitol,

0,1M EDTA pH 7,5) + 0,1 mg/mL de zymolase et incubées à 37°C pendant 1 heure. Les cellules fragilisées sont centrifugées et resuspendues dans une solution de 50 mM Tris/20 mM EDTA. À ceci, 1% SDS est rajouté et les tubes sont incubés à 65°C pendant 30 minutes. Après précipitation, le culot est resuspendu dans l'eau et sujet à une amplification par PCR en utilisant les conditions suivantes : 1X de tampon de PCR, 100 ng d'ADN, 10 pmol de l'amorce en 5' du domaine d'activation de pGADT7 (5' – CTA-TTC-GAT-GAA-GAT-ACC-CCA-CCA-AAC-CC-3'), 10 pmol de l'amorce en 3' du domaine d'activation de pGADT7 (5' –AAG-TGA-ACT-TGC-GGG-GTT-TTT-CAG-TAT-CTA-CGA-3'), 10 mM dNTP, 0,35 mM MgCl₂ et 0,5U de la polymérase Taq. Le mélange a été soumis à 1 cycle : 94°C pendant 3 minutes suivi de 30 cycles : 94°C pendant 45 s, 61°C pendant 45s et 72°C pendant 2 minutes.

3. Résultats

3.1. Identification de partenaires de Meis1

Au total, 24 clones représentant 15 facteurs différents qui interagissent avec Meis1 ont été identifiés. Cinq de ces 15 facteurs, obtenus chacun 1 fois, codent pour des protéines d'intérêt potentiel comme ceci est décrit brièvement dans le Tableau VI.

Tableau VI. Identification des partenaires de Meis1

<u>Clone</u>	<u>Nomenclature</u>	<u>Fonction</u>
Control (+)	Pbx	
Control (-)	LaminC	
1	TAP	Transport de l'ARNm vers le cytoplasme
2	RalGDS-like	Signalisation cellulaire
3	DP-1	Cycle cellulaire
4	SNF-2-like	Remodelage de la chromatine
5	BAF250	Remodelage de la chromatine

3.1.1. Tap (Tip-associated protein): l'analyse de la séquence protéique de Tap révèle plusieurs caractéristiques : 1) les acides aminés chargés constituent approximativement 26% de la séquence totale de Tap; 2) le domaine C-terminal de Tap est riche en résidus de glutamine retrouvés au niveau des protéines impliquées dans l'activation transcriptionnelle; 3) un domaine riche en leucine et en isoleucine est retrouvé dans la région centrale de Tap comprise entre les acides aminés 111 et 140 et 4) un motif de liaison aux intégrines (RGD) est situé au niveau des résidus d'acides aminés 22-24 de Tap.

Tap lie une structure d'ARN en cis retrouvée chez différents rétrovirus, appelée l'élément de transport constitutif (CTE pour 'constitutive transport element') et

transporte l'ARN viral non-épissé vers le cytoplasme, de façon constitutive. La région N-terminale de Tap comportant les premiers 372 résidus d'acides aminés est suffisante pour interagir avec le CTE de l'ARN viral *in vitro* et *in vivo* et le transporter vers le cytoplasme. Ce domaine comprend 4 motifs riches en leucine désignés LRR (leucine rich repeat).

Tap a été aussi impliqué dans le transport de l'ARN messenger du noyau vers le cytoplasme, en interagissant avec d'autres partenaires protéiques. Ainsi, Tap peut s'associer directement avec les nucléoporines (CAN/Nup214) et p15, un membre de la famille des protéines (NFT-2) impliquée dans le transport nucléaire.

3.1.2. Rlf (RalGDS-like factor) : a été isolé à partir du système double hybride et identifié comme un partenaire de la GTPase Rap1A, apparentée à Ras. L'ADNc de Rlf est de 2334 nucléotides (nt) et code pour une protéine de 778 acides aminés avec une masse moléculaire de 84 kDa (Wolthuis, 1996).

3.1.3. DP1 : est retrouvé sous forme d'un hétérodimère avec le facteur de transcription E2F, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, durant la phase G1 du cycle cellulaire, E2F/DP1 interagit avec les protéines de la famille du Rétinoblastome. La phosphorylation de pRB par les kinases des cycline D/CDK4, 6 et cycline E/CDK2 libère pRB et permet à E2F/DP1 d'activer la transcription de gènes nécessaires pour la phase S du cycle cellulaire dont la thymidine kinase, l'ADN polymérase α , p34^{cdc2} et B-myb.

Récemment, il a été démontré qu'une protéine connue sous TRIP-Br (pour 'Bromodomain') interagit avec DP1 et stimule l'activité transcriptionnelle de

E2F/DP. D'après la figure 4.3, TRIP-Br empêche l'effet inhibiteur de $p16^{\text{INK4}}$ sur la cycline D/CDK4 à la fin de la phase G1.

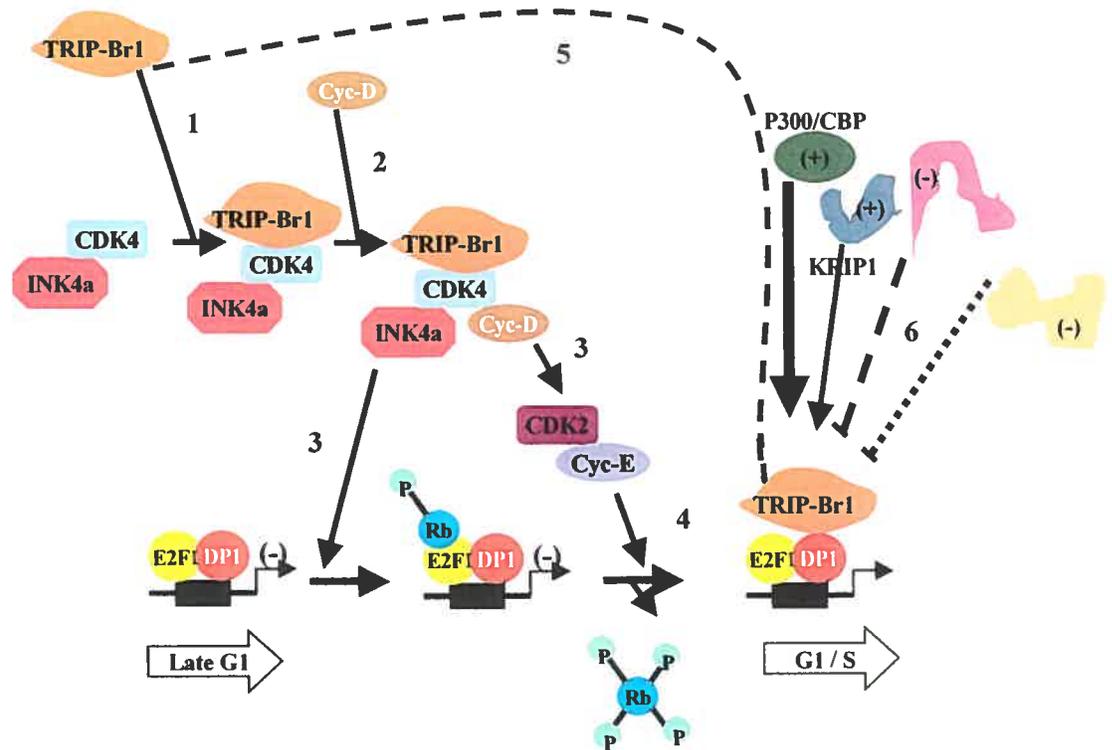


Figure 4.3 : Modèle proposé pour le rôle joué par TRIP-Br dans la régularisation de la progression du cycle cellulaire

Ceci a pour conséquence d'activer la cycline E/CDK2 et de générer la forme hypophosphorylée de Rb (étape 3). Rb se lie alors au dimère E2F/DP1 et inhibe l'activation transcriptionnelle. L'hyperphosphorylation de Rb par la cycline E/CDK2 (étape 4) prépare la cellule pour la phase S du cycle cellulaire. Ainsi, Rb se dissocie et TRIP-Br est recrutée par DP-1 au niveau du dimère E2F/DP1 pour former le complexe ternaire E2F/DP1/TRIP-Br (étape 5). Ce complexe lie différents activateurs (p300/CBP ou KRIP1) ou répresseurs. Ceci résulte en une

régularisation positive (+) ou négative (-) des gènes liés par le dimère E2F/DP1 (étape 6).

3.1.4. SNF-2-like : est un membre de la famille SNF-2 qui comporte des hélicases d'ADN et d'ARN impliquées dans les voies de réparation, de réplication et de recombinaison. Récemment, l'hélicase Bloom (BLM) a été identifiée comme membre de la famille des gènes SNF-2, ce qui a établi un lien entre ces derniers et le cancer. De plus, BLM fait partie du complexe de surveillance du génome associé à BRCA1 (BASC pour 'BRCA1-associated genome surveillance complex') et les mutations BLOOM sont associées à une instabilité génomique et l'induction de leucémie/lymphome chez l'humain et la souris.

3.1.5. BAF250 : a été identifié grâce à des séquences d'antigènes retrouvées au niveau de p300 et CBP (Dallas, 1997; Dallas, 1998). L'analyse de séquence a révélé que BAF250 est l'orthologue de SWI1 chez la levure, un membre du complexe SNF/SWI impliqué dans le remodelage de la chromatine et dans la régularisation transcriptionnelle. BAF250 est l'orthologue d'osa chez la Drosophile, un membre du complexe Brahma qui équivaut au complexe SNF/SWI (Voir chapitre I page 48). Récemment, le clonage et la caractérisation de l'ADNc d'osa chez la souris ont été documentés (Figure 4.4).

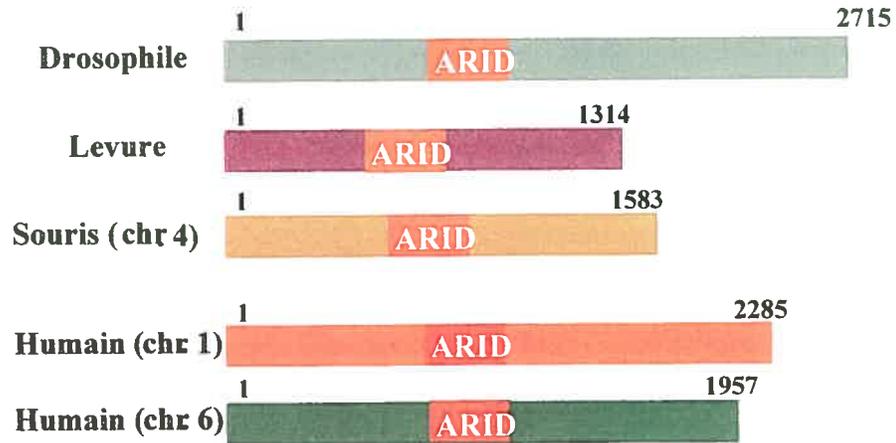


Figure 4.4 : Représentation schématique des différents orthologues de BAF250. *Abbrev. Chr. : chromosome. Les isoformes BAF250a est retrouvé sur le chromosome 1 alors que BAF250b est localisé sur le chromosome 6 chez l'humain.*

D'après la figure 4.4, la caractéristique la plus évidente et partagée entre les orthologues de BAF250 est le domaine de liaison à l'ADN appelé ARID qui a été récemment défini comme un domaine à 'helix-turn-helix'. En général, les membres de la famille ARID lient des séquences riches en AT, d'où le nom de 'AT-rich interacting domain (ARID)'. Cependant, parmi ceux-ci, BAF250 (humain) et *osa* (Drosophile) ne montrent pas de préférence pour la liaison d'une séquence déterminée d'ADN, suggérant que le domaine ARID ne confère pas de spécificité pour la liaison à l'ADN. Des études d'hybridation in situ ont déterminé les patrons d'expression de l'orthologue de BAF250 chez la souris, *osa1*, durant le développement. Au stade embryonnaire, *Osa1* est exprimée de façon ubiquitaire alors qu'au stade adulte, elle est restreinte aux extrémités des membres, aux lentilles des yeux, au tube neural et au cerveau. Chez l'humain, des études de buvardage de Southern ont indiqué que BAF250 est exprimé dans tous les tissus adultes examinés.

4. BAF250, un modulateur potentiel de l'activité de MEIS1 dans l'hématopoïèse

Une liste de critères a été établie pour donner la priorité à l'étude des partenaires spécifiques à MEIS1 dans les cellules leucémiques *Hoxa9 + Meis1*. Ils incluent : i) la confirmation de l'interaction avec MEIS1 dans le système génétique de levure; ii) l'interaction avec MEIS1 dans les cellules de mammifères; iii) la coexpression avec *Meis1* dans les cellules hématopoïétiques primitives de la moelle osseuse et dans les cellules leucémiques *Hoxa9 + Meis1*. En un premier temps, tous les partenaires potentiels identifiés au Tableau VI ont été surexprimés dans des cellules de mammifères 293T et une étude de co-immunoprécipitation a permis de sélectionner BAF250 comme étant le seul à immunoprécipiter avec MEIS1 (Figure 4.7). La Figure 4.5 montre le clone BAF250 isolé du système de double hybride.

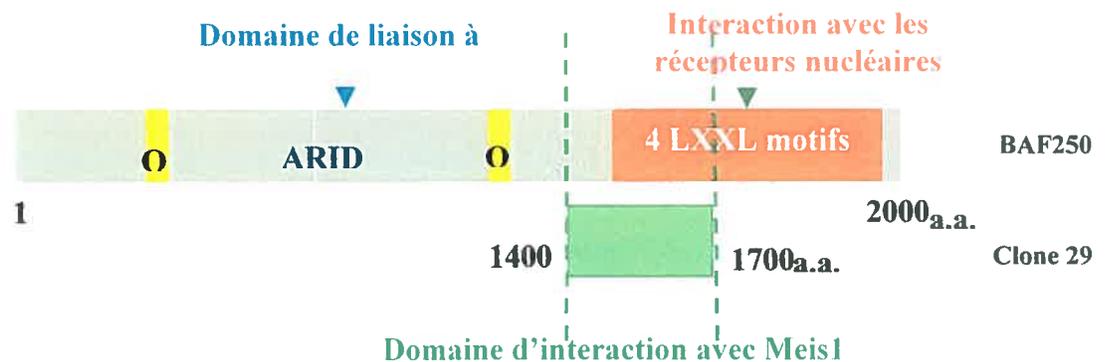


Figure 4.5 : Représentations schématiques de la protéine humaine BAF250 et du clone 29 isolé du double hybride. Le clone 29 correspond aux acides aminés 1400 à 1700 de BAF250 (humain). Abbrév. a.a. : acide aminé; Q : lysine; xx : n'importe quel acide aminé; LXXL : séquence consensus contenant leucine xx leucine

De façon spécifique, l'interaction de BAF250 avec la partie C-terminale de MEIS1 n'a pas été évaluée dans les cellules de mammifères. Dans le système du

double hybride, la partie C-terminale induit un niveau élevé de 'background' impossible à réduire ce qui empêche l'utilisation de ce système pour l'évaluation de l'interaction de BAF250 avec la partie C-terminale de MEIS1. Des études d'expression utilisant la technique de RT-PCR semi-quantitative ont démontré que BAF250 est exprimé dans les sous-populations primitives et matures de la moelle osseuse (Figure 4.6). J'ai ensuite généré un anticorps polyclonal spécifique à BAF250 et j'ai démontré que la protéine endogène BAF250 co-immunoprécipitait avec MEIS1 dans les cellules leucémiques *Hoxa9 + Meis1* (surexprimant *Hoxa9* et *Meis1* par transfert de gènes à l'aide de constructions rétrovirales) (Figure 4.9).

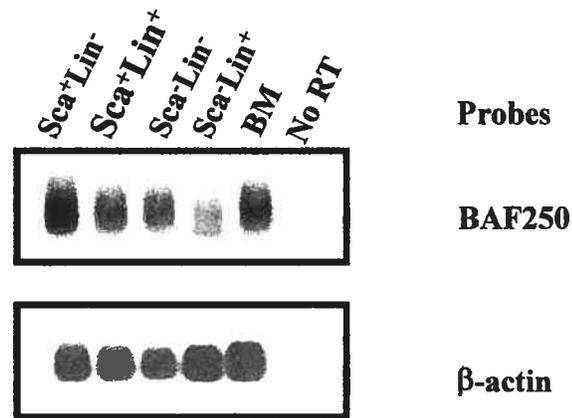


Figure 4.6 : BAF250 est exprimé dans les sous-populations primitives de la moelle osseuse. 10,000 cellules ont été isolées de chaque population (> 98% de pureté après analyse). Leur ADNc a été préparé et amplifié par PCR comme décrit au chapitre II. Les populations les plus primitives sont Sca-1+Lin- et les plus matures sont Sca-1-Lin+. Les temps d'exposition sont comme suit : β -actine (30 minutes) et BAF250 (?).

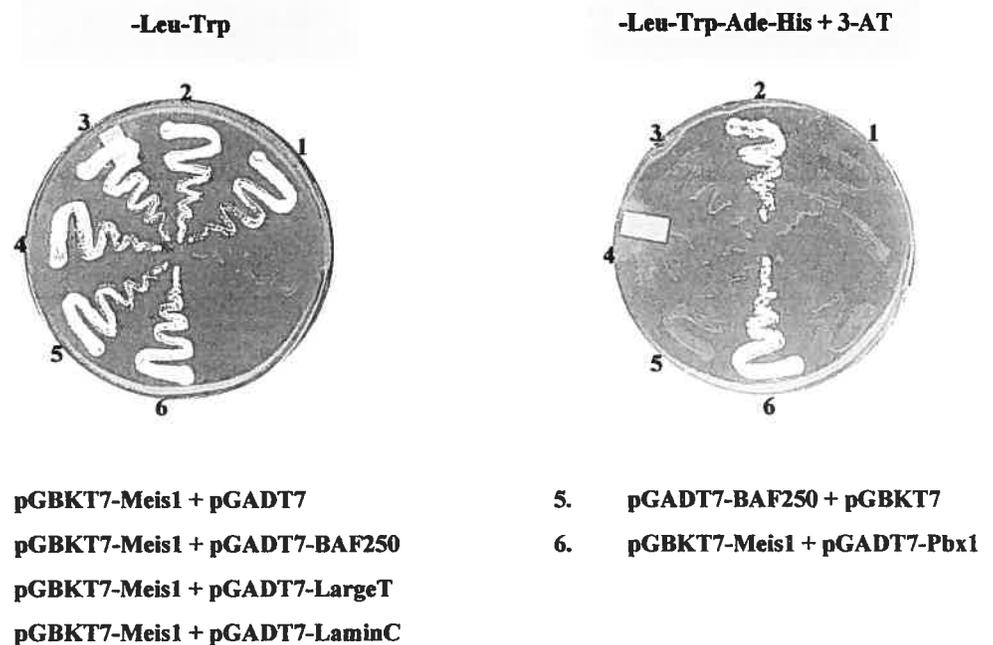


Figure 4.7 : BAF250 interagit spécifiquement avec MEIS1 dans le système du double hybride. Les levures AH109 ont été transformées avec les vecteurs d'expression pGBKT7-Meis1/pGADT7-PBX (contrôle +), pGBKT7/pGADT7-BAF250; pGBKT7-Meis1/pGADT7-LaminC (contrôle -) ou pGBKT7-Meis1/pGADT7-LargeT (contrôle -). Les levures ont été étalées sur des milieux de sélection dépourvus en tryptophane (Trp) et en Leucine (Leu) pour permettre la croissance des levures co-transformées. Les colonies positives ont été redéposées sur des milieux d'interaction dépourvus en adénine (Ade) et en histidine (His) pour permettre la croissance des partenaires interagissant ensemble. Abbrév. 3-AT : 3-amino-1,2,4,-triazole.

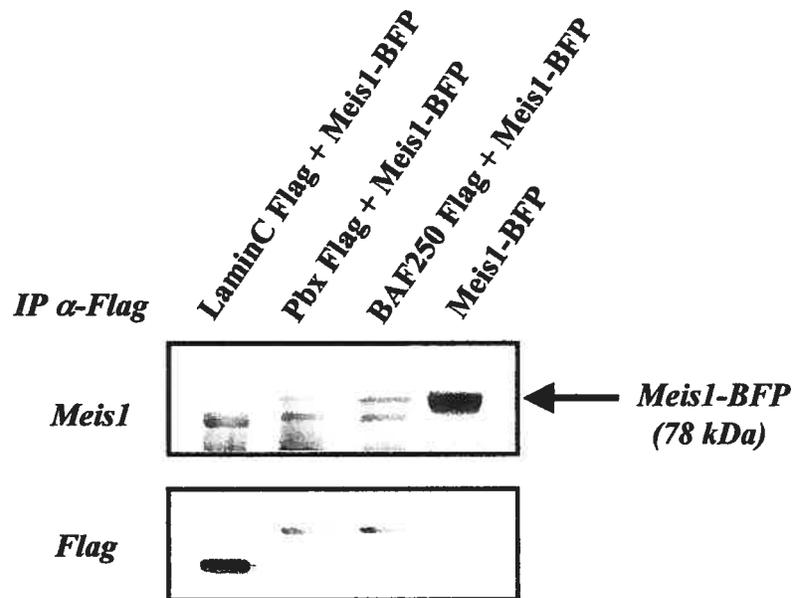


Figure 4.8: BAF250 co-immunoprécipite avec MEIS1 dans les cellules humaines 293T. Les cellules 293T ont été co-transfectées avec la protéine de fusion Meis1-BFP et 20 µg d'ADNc de LaminC-flag (contrôle -) ou de Pbx-Flag (contrôle +) ou du fragment BAF250 isolé du double hybride lié aussi à l'épitope flag. Les extraits cellulaires totaux ont été immunoprécipités à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-flag pendant 2 heures à température de la pièce. Pour les immunobuvardages, l'anticorps polyclonal anti-Meis1 (pour la co-immunoprécipitation) ou l'anticorps monoclonal anti-flag (pour l'expression des protéines de fusion LaminC-flag, Pbx-flag et Baf250-flag) ont été utilisés. Abrévi. IP : immunoprécipitation, BFP : 'Blue-Fluorescent Protein', kDa : kilodalton.

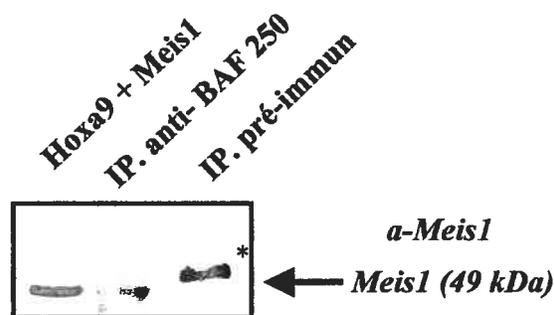


Figure 4.9: BAF250 endogène immunoprécipite avec MEIS1 à partir des cellules leucémiques Hoxa9 + Meis1. Pour les immunoprécipitations, les sérums de lapin préimmuns ou anti-BAF250 ont été utilisés. Les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE et les membranes ont été hybridées avec l'anticorps polyclonal anti-Meis1. (*) 'Background'. Le puits identifié Hoxa9 + Meis1 sert de contrôle positif pour Meis1.

5. Génération d'outils pour étudier la fonction de BAF250 dans l'hématopoïèse

5.1. *Slany RNA interference*

Les conséquences phénotypiques observées suite à une altération de la fonction d'un gène dans une cellule ou un organisme donnent une idée sur son rôle biologique. Au début, les rôles des gènes chez les mammifères étaient déduits à partir des études effectuées avec leurs orthologues retrouvés au niveau d'organismes moins complexes servant de modèles génétiques.

Bien que *C. elegans* ait été considéré le modèle génétique par excellence, la difficulté de générer un allèle nul d'un gène donné limitait l'utilisation de *C. elegans*. Afin de dépasser cet obstacle, Mello et Fire ont découvert que l'ARN double brin était beaucoup plus efficace que l'ARN antisens pour réprimer les gènes. Des études subséquentes ont démontré que la formation d'ARN double brin résulte du mécanisme du 'RNA interference (RNAi)' présent chez tous les organismes eukaryotes. Les mécanismes sous-jacents le RNAi commencent à être élucidés. C'est un processus constitué de 2 étapes (Figure 4.10) :

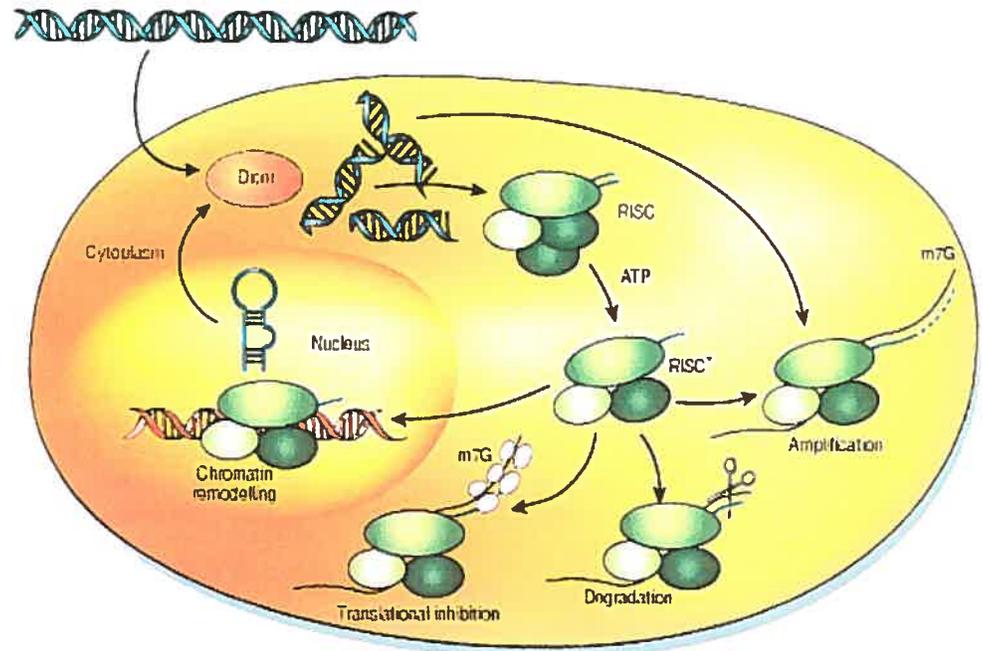


Figure extraite de Nature 418, 2002

Figure 4.10 : Un modèle du mécanisme de "RNA interference"

1) la nucléase RNase III appelée Dicer lie l'ARN double brin et le digère en 21-23 nucléotides de siRNA (pour 'small interfering RNA') (Bernstein, 2001); 2) les fragments siRNAs sont incorporés dans le complexe RISC qui a pour fonction de rechercher les séquences d'ARNm homologues à celles des siRNAs et les détruire. Bien que cette technique ait été un moyen efficace pour manipuler l'expression des gènes chez les invertébrés, plusieurs obstacles ont été notés chez les cellules de mammifères. Ces dernières possèdent un mécanisme de défense antiviral activé par l'ARN double brin. La composante clé de ce mécanisme est une protéine kinase désignée PKR qui phosphoryle EIF-2 et induit une inhibition généralisée de la traduction. De plus, l'ARN double brin active le système du 2-5-oligoadenylate polymerase/RnaseL qui réprime IKB et entraîne la mort

cellulaire par apoptose (Gil, 2000). À l'opposé, la micro-injection de l'ARN double brin dans les zygotes de souris inhibe spécifiquement l'expression du gène ciblé sans affecter celle des autres. Les mêmes observations ont été décrites au niveau des cellules souches embryonnaires (ES) et des cellules de carcinome embryonnaires (EC). Cependant, la restriction de cette méthode conventionnelle d'ARNi à certaines lignées cellulaires, limite l'utilisation de cette approche chez les mammifères.

Tuschl et ses collaborateurs (Tuschl, 1999) ont démontré que des duplexes d'ARN mimant les produits générés par l'enzyme Dicer induisent un RNAi au niveau des extraits embryonnaires de *Drosophile in vitro*. La même observation a été faite au niveau des cellules somatiques de mammifères. Ils ont démontré que des siRNA synthétisés chimiquement, induisaient une répression spécifique de l'expression d'un gène donné au niveau d'une grande variété de lignées cellulaires murines et humaines. Ainsi, la synthèse chimique devient la méthode de choix pour étudier la fonction d'un gène au niveau des cellules de mammifères.

Récemment, il a été décrit que des ARNs endogènes ayant une structure en épingle connus sous 'micro-ARNs', régularisent l'expression des gènes chez la *Drosophile*, *C. elegans* et les mammifères. Bien que leurs fonctions soient encore inconnues, il est probable qu'ils soient transcrits comme des précurseurs d'ARN à épingle servant de substrats pour l'enzyme Dicer. Ceci suggère que leur mécanisme d'action est semblable à celui du RNAi. Des études récentes ont exploité ce mécanisme biologique pour étudier la régularisation de gènes cibles d'intérêt. Pour ceci, un gabarit d'ADN tel que représenté ci-dessous dans les séquences A ou B ou C à la page 194 de cette thèse est cloné dans un vecteur

d'ADN en aval du promoteur de l'ARN polymérase III (ou le promoteur H1). Les cellules de mammifères sont transfectées / infectées à l'aide de ces constructions, produisant des ARNs à épingle ou shRNA pour 'short hairpin RNA', mimant l'effet biologique des micro-ARNs endogènes. J'ai utilisé la technique du shRNA pour étudier la fonction de BAF250 dans le système hématopoïétique. À partir de la séquence complète de l'ADNc d'osa1, l'orthologue de BAF250 chez la souris, j'ai choisi les 3 séquences suivantes :

Codon initiateur



```

1 agatctatgg atcagatggg caagatgaga cctcagccgt atggtggggac taaccatac
61 tcgcaacaac agggacctcc ttcaggaccg caacaaggac atgggtaccc agggcagcca
121 tatgggtccc agactccaca gcggtacccc atgaccatgc agggccgggc tcagagtgcc
181 atgggcagcc tctcttatgc acagcagatt ccaccttatg gccagcaagg cccagtgcg
241 tatggccagc agggccagac tccatactat aaccagcaaa gtccatcatc ccagcagcag
301 ccaccttacg cccagcaacc accatcccag acccctcatg cccagccttc gtatcagcag
361 cagccgcaga ctcagcaacc acagcttcag tcctctcagc ctccatattc ccagcagcca
421 tcccagcctc cacatcagca gtccccaact ccatatccct cccagcagtc caccacacaa
481 cagcatcccc agagccagcc cccctactca caaccacagg cacagtctcc ctaccagcag
541 cagcaacctc agcagccagc atcctcgtcg ctctcccagc aggccgcata tcctcagccc
601 cagcctcagc agtcccagca aactgcctat tcccagcagc gcttcocctc accacaggag
661 ctttctcaag attcatttgg gtctcaggca tcctcagccc cctcaatgac ctccagtaag
721 ggagggcaag aagatatgaa cctgagtctt cagtcaaggc cctccagctt gcctgatctg
781 tctggttcaa tcgatgatct ccccatgggg acagaaggag ctctgagtcc tggcgtgagc
841 acatcagggg tttccagcag ccaaggagag cagagcaatc cagctcagtc tcccttttct
901 cctcacacct cccctcacct gcctggcctc cgaggcccgt tcccgtcccc tgttggctct
961 cctgccagtg tcgcccagtc tcgctcagga cactctcgc ctgctgcagt gccaggcaac
1021 cagatgccac ctgcccacc cagtggccag tcagacagca tcatgcaccc ttccatgaa
1081 caatcaagca ttgccaaga gcgaggttat atgcagagga actcccagat gccccagtac
1141 acttcccctc agcctggctc gccttatctt ccagctcagc cgtctggagg acagatgac
1201 tcgggcgtgg gctcctacca gcagaactcc atggggagct acggccccc aacgcagtcag
1261 tatggcccac aaggaggcta tcctaggcag cctaactata atgccttgcc caacgccaac
1321 taccccaatg caggcatggc cgaagtata aaccctatgg gtgctggagg tcagatgcat
1381 gggcagcctg gaatcccacc ttacggcaca ctccctccag ggagaatggc tcatgctct
1441 atgggcaaca ggcctatgg ccctaatatg gccaatatgc cacctcaggt tgggtcaggg
1501 atgtgtcctc caccaggggg aatgaacagg aaaactcaag agtctgctgt tgccatgcat
1561 gttgctgcca actctatcca aaacaggcca ccaggctacc caaatgtaa tcaagggggc
1621 atgatgggaa ctggacctcc ctatggacag gggatcaata gtatggctgg catgatcaac
1681 cctcagggac ccccatatcc tatgggcgga accatggcca acaattcagc agggatggca
1741 gccagcccag agatgatggg ccttggggat gttaagttaa ctcccggcac aaaaatgaa
1801 aacaaggcag atgggacacc caagacagaa tccaaatcta agaaatccag ttcttctacc
1861 accaccaatg agaagatcac ccaattgtat gagttgggtg gtgagcccga gaggaagatg
1921 tgggtggacc ggtacctggc ctctcagagc gagaaggcca tgggcatgac aaactctgct
1981 gctgtgggga ggaagcctct ggacctctat gcctctatg tgtctgtgaa ggagatgggt
2041 gggttgactc aggtcaacaa gaacaaaaaa tggcgggaa cttgcaaccaa cctcaatgtg
2101 ggtacatcaa gcagtgtctc cagctcactg aaaaagcagt atatccaatg tctctatgcc
2161 tttgagtgca agatcgagcg tggagaagac cctccccccg atatcttctg agctgctgac
2221 tccaagaagt cccaacccaa gatccagccc cctctctctg cgggatcagg gtctatgacg
2281 gggccacaaa ctcatcagtc aaccagcag tctatggcag aggaggaga cctgaagcca
2341 ccaactccag catccacacc acatagtcaa attccccct taccaggcat ggggagcaac
2401 tcagtccgaa tccaggatgc ctttctctgat ggaagtgacc cccattcca gaagcggaa
2461 tccatgactc caaaccttgg gtaccagccc agtatgaata cctctgacat gatggggcgc
2521 atgtcctatg agccaaataa ggatccttat ggcagcatga ggaaagcgc aggaagtgat
2581 cccttcatgt cctcagggca gggccccaat ggcgggatgg gtgatcccta cagccgtgct

```

2641 gctggccctg ggctgggaag tgtggcgatg ggaccacggc agcactatcc ctatggaggt
 2701 ccttacgaca gagtgaggac ggagcctgga atcgggctcg aaggaatat gggactgga
 2761 gcccctcagc caaatctcat gccttcacc ccagattcgg ggatgtattc tcctagccgc
 2821 taccctccgc agcagcagca gcaacagcag caacagcagc aacagcaacg acatgatcc
 2881 tatggcaatc aattctctac ccaagggacc ccttccagca gcccctccc cagccagcag
 2941 accacaatgt atcagcagca gcagcagaat tataagaggc caatggatgg cacatatggc
 3001 ccccctgcca agcggcatga aggggagatg tacagtgtgc cgtacagcgc tgggcaaggc
 3061 cagcctcaac agcagcagtt gcctgcagct cagtcccagc ctgccagcca gccacaagct
 3121 gccacgcctt cccctcagca ggacgtgtac aaccagtaca gcaatgccta ccctgcctcc
 3181 gccaccgctg ctactgatcg ccgaccagca ggcgcccccc agaaccaat tcattccag
 3241 tttggccgag accgagtctc tgcacctcct ggttccagtg aacagcagaa cctgccacca
 3301 caaatgatgg gtgggcccac acaggcatca gctgaggttg ctcagcaggg caccatgtgg
 3361 cagggggcaa atgacatgac ctacaattat gccaacaggc agaacacagg ctctgccacc
 3421 cagggccctg cgtatcatgg tgtgaaccga acagatgaaa tgctccacac agatcagagg
 3481 gccaacctatg aaggcccctg gccttcccac ggacacagcc agcctccgta tggctcctca
 3541 gcccctgttc cccccatgac aaggccccct ccatctaact accagcccc accaagcatg
 3601 ccgaatcaca ttctcaggt atccagcccc gctcccctcc cccggcccc ggagaaccgt
 3661 acttctccta gcaagtctcc attcctgcac tctgggatga aaatgcacaaa gcgggtcca
 3721 ccggtgctcg cttcgcacat agcgcctacc cctgtgcagc cgcctataat tcggcgggat
 3781 atcaccttcc cacctggctc tgtagaggcc actcagcctg tgttgaagca gagaaggcgg
 3841 ctacacaatga aagacattgg aaccccgag gcatggcggg taatgatgtc cctcaagtcc
 3901 gggctcctgg cagagagcac gtgggcgcta gacaccatta acattctact gtatgatgac
 3961 aacagcatta tgaccttcaa cctcagccag ctcccaggct tgctagagct ccttgtggaa
 4021 tatttccgta gatgcctaag tgaatcttta ggcatltaa aggagtatga ggtaggggac
 4081 ccaggacaga gaacattact agaccctggg agattcacca agtgtctag tccagccat
 4141 acagaggaag aagaggaaga acacctgat cctaaaactgg aggaggaaga ggaagaagg
 4201 gttggaaatg atgaggagat ggcctttttg ggcaaggaca agccacctc agagaatagt
 4261 gaggagaagc tagtcagtaa gtttgacaag cttccggtaa agatcgtgca gaggaaatgac
 4321 ccatttgtgg tggactgtc agataagctt gggcgctgc aggagtttga cagtggcctg
 4381 ctacactggc ggattgggtg tggggatacc actgagcata tccagaccca ctttgagagc
 4441 aagatagagc tgctgccttc ccggccttat gtgcctgcc caacgcccc tcggaacac
 4501 ctacacaacag tagagggcac accagggaca acggagcagg agggcccccc gccgatggc
 4561 cttccagaga aaaggatcac agccaccatg gatgacatgt tgtctaccg gtctagcaca
 4621 ttgactgatg agggggcaaa gagtgacagc gccaccaagg aaagcagcaa gtttccggtt
 4681 ggcattagcc cagcacagag ccaccggaac atcaaaattt tagaggatga ccccatagt
 4741 aaggatgaga ccccactgtg tacccttctg gactggcagg atccccttgc taagcgtgt
 4801 gtctgtgtct ccaataccat ccggagcctg tcgthtgtgc caggcaacga ccttgagatg
 4861 tccaaacacc cagggctgtc gcttatcctg ggcaagctga tccctgtgca ccacaagc
 4921 ccagagcggg agcaggcacc actaacttat gagaaggagg aggaacagga ccaaggggtg
 4981 agctgtgaca aagtggagt gtgggtgggac tgcttgagga tgctccgaga aaacacgctg
 5041 gtcaccctcg ccaacatctc ggggcaattg gacctaacc catatcctga gagcatctg
 5101 ctgcctgtcc tggacggact cctacactgg gcagtttggc cttcagctga agcccaggac
 5161 ccttctcaa ccttagccc caatgcctg ctctcccccc agagatttga cttgaaacc
 5221 ctacagaaa ctagcatcca ggacaacaat gtggactgta tctggccac tcccctttt
 5281 agccgcctgg agaagtgtga tagtaccatg gtgcgcttcc tcagtgaccg aaagaacca
 5341 gtgtgccggg agatggcctg ggtactgtc gcaaatctgg cccaggggga cagcctggca
 5401 gcccgggcca ttgcagtga gaagggcagc atcggcaacc tcctgggtt cctggaggac
 5461 agccttctg ccacacagtt ccagcagagc caggcaagcc tcctgcata gcagaatcca
 5521 ccctttgaac caactagtgt ggacatgat cgtcgggct cccgagcact gcttgccctg
 5581 gccaaagtgg atgagaacca ctcagagttc actctgtatg actcacggct gttggacatc
 5641 tccgtgtcac cactgatgaa ctcatgtgtt tcacaagtca tttgtgatgt actgtttttg
 5701 attggccagt catgacagcc gtgggacacc tcccctcccc gtgtgtgtgt gagtgtgtgg
 5761 agaacttaga aactgactgt tgccctttat ttatgcaaaa ccacctcaga atccagtta
 5821 ccctgtgctg tccagcttct ccctttggga aagcctctac ttgttctctc tctcccaca
 5881 ccctcactcc ctacacactt tctgttcccc atctcactc gctaccctca ggaccccacc
 5941 ctattttgaaa agacaaagct ctgcctacat agaagacttt tttatttaa ccaaagttac
 6001 tgttgtttac agtgagtttg gggaaaaaaa atggctttcc cagtcttgc atcaacggga
 6061 tgccacattt cataactgtt tttaatgggt aaaaaaaaa aaaaaagga aaaaaataca
 6121 aaaaccctga aggacaaagg tgactgtcga gctgtgtggt ttgtcgtgt ccattcaca
 6181 tctcgcggag ccaagaagt cgcagttgt agcagacct gttcactgga gagccctgtg
 6241 cagtagagtg tagatccttt catgtactgt actgtacacc tgatactgta aacatactgt
 6301 aataataatg tctcacatgg aaacgagaga agacgtggg tcagcagca gctgtagttt
 6361 ttaaaaatgt ttttagttaa ttgttagaaa aaaaaatggc tttccccca aagtaactctg
 6421 tgtgaacctc caacgcctg acctcttct ctctctctg attgtatgaa tagccctgag
 6481 atcacctctt agacctggt ttaaccttta gctgcagcgg ctgcgtgcc acgtgtgtat
 6541 atatatgatg ttgtacattg cacataccct tgaatctcca cagtttggtc ccctcccag

```

6601 ctaccocttt atagtatggc gagttaacaa gttggtgacc tgcacaaagc gagacacagc
6661 tatttaatct cttgccagac attgcccctc ttggtgcagt gctctacagg tctctgtaaa
6721 aagccttgc tgtctcagca gccaatcaac ttacagtta ttttttctct gggtttttgt
6781 tttgttttgt ttccatttcc taatccgaag tgtgaaaaaa ggttcctagg ttccagttga
6841 agttcctgat gaagaaacac aattgagatt ttttcagtga taaaatctgc atatttgtat
6901 ttcaacaatg tagotaaaaa acttgatgta aattcctct ttttttctct tttttggctt
6961 aatgaatctc atttattcag tatgaaatct ttatactata tgttccacgt gttaagaata
7021 aatgtacatt aaatcttggg g 3' UTR

```

Séquence A:

```

aac cac agc ttc agt cct etc ttc aag aga gag agg act gaa gct gtg gtt tttt
ttg gtg teg aag tea gga gag aag ttc tct etc tcc tga ctt cga cac caa aaaaa
      21 nt sens Baf250          9 nt loop          21 nt anti-sens BAF250          Polymerase III
termination

```

Séquence B:

```

aac cag cag ttc tat ggc aga ttc aag aga tct gcc ata gaa ctg ctg gtt tttt
ttg gtc gtc aag ata ccg tct aag ttc tct aga cgg tat ctt gac gac caa aaaaa
      21 nt sens Baf250          9 nt loop          21 nt anti-sens BAF250          Polymerase III
termination

```

Séquence C:

```

aag gac aag cca cct tea gag ttc aag aga etc tga agg tgg ctt gtc ctt tttt
ttc ctg ttc ggt gga agt etc aag ttc tct gag act tcc acc gaa cag gaa aaaaa
      21 nt sens Baf250          9 nt loop          21 nt anti-sens BAF250          Polymerase III
termination

```

Les 3 séquences A, B et C ont été sous-clonées dans le site BglIII du vecteur rétroviral pMSCV-puro, en aval du promoteur H1 (Figure 4.11). Pour vérifier si ces constructions sont efficaces à cibler BAF250, j'ai adopté la technique d'immunobuvardage pour évaluer les niveaux protéiques de BAF250 avant et après la transfection cellulaire avec ces 3 constructions. Des cellules 293T ont été transfectées avec ces constructions et sélectionnées par addition de la puromycine à une dose de 2 µg/mL pendant 7 jours. Les cellules résistantes à la puromycine ont été lysées et les extraits cellulaires ont été séparés par SDS-

PAGE et les membranes ont été hybridées avec l'anticorps polyclonal anti-BAF250 (Figure 4.11).

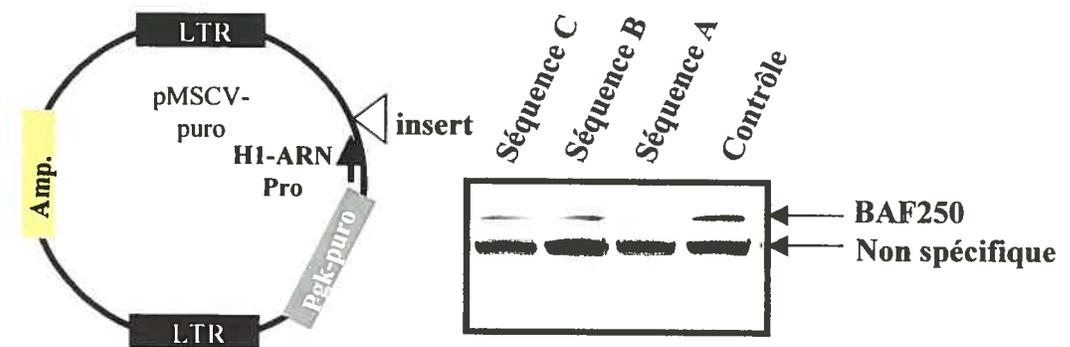


Figure 4.11: Un vecteur rétroviral qui médie le mécanisme de "RNA interference".

Les résultats de la Figure 4.11 démontrent que les cellules transfectées avec la construction pMSCV-Séquence A-puro ont leurs niveaux protéiques BAF250 diminués ce qui n'est pas observé avec le contrôle et les constructions pMSCV-Séquence B-puro ou pMSCV-Séquence C-puro. Puisqu'une séquence sur trois a été efficace à réduire les niveaux protéiques BAF250, j'ai voulu ensuite savoir si cette réduction affectait le système hématopoïétique au niveau des progéniteurs et des cellules plus matures. Pour ceci, les constructions pMSCV-contrôle-puro, pMSCV-SéquenceA-puro et pMSCV-SéquenceB-puro ont été digérées avec l'enzyme SpeI et sous-clonées dans le même site de pMSCV-GFP. Des cellules de moelle osseuse ont été infectées avec chacune de ces constructions et des modèles de transplantation murins ont été générés comme ceci est décrit aux chapitres II et III respectivement. La Table VII montre les résultats de transfert

de gènes dans des cellules de moelle osseuse fraîchement transduites avec chacune des constructions rétrovirales désignées dans le Tableau VII. Ce dernier représente le nombre de progéniteurs *in vitro* CFC GFP⁺ provenant des cellules transduites et transplantées dans des modèles murins.

Tableau VII. Nombres absolus de CFCs totaux et transduits transplantés par souris obtenus 7 jours post-transplantation.

Groupe de souris	(n)	Nombre de CFCs Total (x10 ²)	Nombre de CFCs Transduits injectés par Souris ^a GFP ⁺ (x10 ²)
Contrôle	4	1255	355
Séquence A	4	1280	45
Séquence B	6	1150	225

^a Le nombre de CFCs transduits par souris a été calculé comme suit: (nombre de cellules de moelle osseuse injectées par souris (5×10^5 cellules)) x (fréquence de CFCs dans l'échantillon de cellules injectées) x (pourcentage de CFCs GFP⁺).

La séquence A diminue le niveau protéique de BAF250 (Figure 5.10) et les cellules de moelle osseuse infectées avec cette construction génèrent 7x moins de progéniteurs *in vitro* (Tableau VII). Le contrôle et la séquence B n'affectent pas les niveaux protéiques de BAF250 (Figure 4.11) et génèrent approximativement le même nombre de progéniteurs CFCs myéloïdes *in vitro* (Tableau VII). Ces résultats suggèrent que BAF250 pourrait être requis pour la génération des progéniteurs. Ensuite, j'ai voulu savoir si cette réduction du nombre des progéniteurs se reflétait en une réduction des cellules matures provenant des cellules transduites par les 3 différentes constructions. À l'aide de la cytofluorométrie, j'ai essayé de détecter les cellules GFP⁺ provenant des donneurs Ly 5.1, au niveau du sang périphérique de souris receveuses Ly 5.2, 4 semaines après la transplantation (Tableau VIII).

Tableau VIII. Une réduction des niveaux protéiques BAF250 affecte négativement la reconstitution à court terme *in vivo*

Groupe de souris	(n)	% GFP ⁺ Ly5.1 ⁺
Contrôle	4	13.5 ± 2.0
Séquence A	3	1.6 ± 0.5
Séquence B	6	14.0 ± 4.0

D'après le Tableau VIII, les résultats préliminaires démontrent qu'une réduction des niveaux protéiques BAF250 (Séquence A) induit une diminution de 8x du pourcentage des cellules GFP⁺ Ly5.1⁺ par rapport au contrôle et à la séquence B. Ces données nous mènent à hypothétiser qu'une réduction des niveaux protéiques BAF250 affecte négativement la reconstitution à court terme *in vitro* et *in vivo*, suggérant que BAF250 est requis pour l'hématopoïèse normale. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de générer un modèle murin knock-out conditionnel. Mon projet a consisté à générer un allèle conditionnel pour BAF250 comme ceci est décrit dans le chapitre V.

CHAPITRE V

GÉNÉRATION D'UN ALLÈLE CONDITIONNEL POUR BAF250, UNE PROTÉINE QUI INTERAGIT AVEC MEIS1

1. Introduction

Les méthodes de ciblage génique conventionnelles mènent à une inactivation ou à une modification génique dans tous les tissus de l'organisme. Récemment, de nouvelles techniques ont été développées visant à cibler un gène dans un temps et un espace bien déterminés. Ces approches de ciblage génique conditionnel sont particulièrement utiles dans le cas où l'inactivation génique conduit à une létalité prévenant l'analyse et la compréhension de l'action d'un gène donné. De plus, si un gène est exprimé de façon ubiquitaire, son inactivation dans un tissu spécifique pourrait définir son rôle physiologique dans un type tissulaire, sans pour autant compromettre ses autres fonctions dans l'organisme. Le contrôle du ciblage génique dans un temps déterminé, permet la comparaison entre les effets d'une déplétion chronique et aigue de la protéine ainsi que l'analyse fonctionnelle génique à différents intervalles de temps durant le développement.

Le ciblage génique conditionnel implique l'utilisation de plus en plus courante du système de recombinaison Cre/loxP. Cette approche implique l'utilisation de la recombinaison Cre provenant du phage P1 qui reconnaît et lie une séquence d'ADN palindromique de 34 pb connue sous le nom de loxP (locus of crossover x dans P1). La recombinaison Cre a la capacité d'exciser toute séquence située entre 2 sites loxP arrangés dans la même orientation, suite à recombinaison intramoléculaire. Après la recombinaison, un seul site loxP est retrouvé à l'intérieur du génome et un autre loxP est inclus dans le fragment d'ADN excisé et circularisé. Si les sites loxP sont arrangés dans des orientations opposées, la recombinaison résultera en une inversion de la séquence comprise entre les 2 sites loxP.

2. Matériel et méthodes

2.1. La librairie d'ADN recombinant

La taille d'une librairie de fragments d'ADN génomique, nécessaire pour représenter une séquence d'intérêt particulière, est dictée par la taille des fragments clonés et la taille du génome. La probabilité qu'une séquence d'intérêt soit présente dans cette librairie est estimée par des statistiques simples basées sur la distribution de Poisson. Spécifiquement, le nombre de clones indépendants N , qui doivent être criblés afin d'isoler une séquence particulière ayant une probabilité P est donné par l'équation 1 :

$$N = \ln(1 - P) / \ln[1 - (I / G)] \text{ (Équation 1)}$$

Où I représente en moyenne la taille du fragment cloné en paires de bases et G représente la taille du génome entier considéré en paires de bases.

Pour une chance de 99% d'isoler une séquence individuelle d'un génome de mammifères typique en utilisant un vecteur de phage λ ,

$$N = \ln(1 - 0,99) / \ln[1 - (2 \times 10^4 / 3 \times 10^9)] = 690,000$$

En général, pour une chance de 99% d'isoler la séquence désirée, le nombre de clones criblés doit être tel que le nombre total de paires de bases présentes dans les clones criblés ($I \times N$) représente 4,6 x le nombre total de paires de bases présentes dans le génome (G). Une fois le fragment d'intérêt est purifié, la taille de la librairie peut être réduite. La taille de la librairie peut être alors estimée par $N \sim 3 \times 1/P$ où P = la probabilité d'isoler un fragment particulier = 1/nombre total de fragments dans la librairie.

2.1.1. Criblage d'une librairie d'ADN génomique

Dans une cellule ou un génome diploïde, un gène est représenté par 2 copies. Ainsi, la fréquence prédite pour une séquence particulière doit être identique à n'importe quelle autre séquence présente dans le même génome. La formule de détermination du nombre de clones à cribler est présentée dans l'équation 1. Le nombre est en fonction de la complexité du génome et de la taille moyenne des clones de la librairie. Chez les mammifères, 1 million de clones de bactériophages doivent être criblés pour identifier le clone génomique d'intérêt. Or dans une librairie, plusieurs clones seront détectés plus d'une fois. Donc, le nombre total de clones à cribler doit être 30-40% plus élevé que le nombre calculé à partir de l'équation 1.

2.2. Isoler un clone génomique BAF250

Pour isoler le clone génomique BAF250, j'ai utilisé une librairie génomique de phages, générée à partir de l'ADN génomique extrait des cellules ES SV129 et sous-cloné dans le vecteur λ GEM12. Ensuite, j'ai adopté une technique de PCR sur cette librairie divisée en 10 fractions (contenant chacune $2,5 \times 10^5$ clones) afin de réduire au minimum le nombre de pfu à cribler en utilisant un essai d'hybridation standard. Après avoir identifié une fraction positive, j'ai ensuite criblé les 10 sous-fractions du même échantillon afin de déterminer la sous-fraction candidate.

Dans cette stratégie de PCR, les 2 paires d'amorces utilisées correspondent aux exons 2 et 7 de BAF250 et sont espacés de 29 kb. Ainsi, la fraction positive pour les réactions de PCR utilisant les 2 paires différentes d'amorces (forward

exon 2 : 5'- AGA-CTC-CAT-ACT-ATA-ACC-AGC-3'; reverse exon 2 : 5' – AGT-TTG-CTG-GGA-CTG-CTG-AGG-3'; forward exon 7 : 5'-AGG-CAG-CCT-AAC-TAT-AAT-GCC-3'; reverse exon 7 : 5'-aga-gtt-ggc-agc-aac-atg-cat-3') devrait contenir un clone assez long et intéressant à caractériser. Pour identifier une fraction contenant BAF250, chacune des 10 fractions de la librairie sert de gabarit pour une amplification par PCR en utilisant les conditions suivantes : 1 x tampon de PCR (GIBCO, BRL), 0,75 mM MgCl₂, 0,01 mM de dNTPs, 2,5 pmol/μL de chaque amorce et 0,5 μL de la polymérase Taq. Après avoir identifié une fraction positive, j'ai criblé les 10 sous-fractions de ce même échantillon en utilisant les conditions de PCR précédentes. Pour obtenir le nombre de pfu de la fraction positive, j'ai multiplié le facteur de dilution de la fraction positive par son titre et j'ai criblé le double du nombre de pfu déjà calculé.

Des cultures bactériennes LE392 ont été incubées à 37°C dans du milieu LB (10 g de tryptone, 2,5 g de NaCl pour 1 litre) jusqu'à obtenir une densité optique (O.D.) de 0,6-0,8. Ensuite, les bactéries ont été (aliquot de 0,3 mL) ont été mélangées avec 75,000 pfu dans un tube de 15 ml et incubées à 37°C pendant 5 minutes. 2,5 mL de l'agar maintenu à 45°C dans un bain à eau, ont été rajoutés aux bactéries. Le tout a été mélangé vigoureusement et immédiatement transféré à un pétri de LB agar. Les pétris ont été incubés pendant 6 heures à 37°C. Deux filtres ont été déposés l'un après l'autre sur chaque pétri pendant 5 minutes et marqué avec 3 tous asymétriques. Les filtres ont été placés sur des papiers Whatmann 3MM imbibés de tampon de lyse (2X SSC, 5% SDS). Ils ont été laissés à l'air libre pendant 2 minutes et séchés dans micro-onde pendant 2 minutes à 800W jusqu'à ce que les colonies paraissent transparentes et les membranes soient

complètement sèches. Pour se débarrasser des débris bactériens, les membranes ont été lavées à 42°C pendant 2 heures dans une solution contenant 0,05 M de Tris pH 8; 1 M de NaCl, 1 mM EDTA, 10% SDS. L'hybridation a été effectuée à 60°C dans 4,5 mL de 20X SSPE, 3 mL de 20% SDS, 6 mL de 10% de lait et 45 mL d'eau, auxquels 1,5 mL de 'hearing sperm DNA' ont été ajoutés. La sonde utilisée provient du produit de PCR obtenu pour l'exon 2 de BAF250. Après l'hybridation, les filtres ont été lavés 3 x 30 minutes à 55°C dans du 0,5% SDS, 0,5 X SSC. La plage contenant le clone génomique de BAF250 a été localisée sur pétri, isolée et déposée dans 0,1 mL de solution de λ SM (0,1 M de NaCl, 50 mM de Tris pH 7,5, 1 mM de MgSO₄, 0,01% de gélatine) additionné de 10 μ L de chloroforme. 5 μ L de cette solution ont été déposés sur une couche de bactéries LE392. Les pétris ont été incubés à 37°C et les plages obtenues ont été transférées sur des membranes et réhybridées avec la sonde de l'exon 2 de BAF250 afin de confirmer que le clone retenu est bel et bien positif. Après cette confirmation, une grande quantité de phages a été obtenue en étalant 3×10^4 pfu sur des pétris de bactéries LE392. Quand 90% des bactéries ont été lysées, 2 mL de λ SM et 50 μ L de chloroforme ont été rajoutés par pétri et incubés sous rotation à température de la pièce pour quelques heures. Ensuite, cette solution a été collectée et mélangée vigoureusement. L'ADN recombinant de phage a été purifié du milieu suivant les recommandations du manufacturier (Promega).

3. Résultats

3.1. Génération du vecteur de ciblage conditionnel BAF250

Après criblage de la librairie d'ADN génomique de phage, le clone génomique BAF250 est de 16 Kb et contient les exons 1, 2 et 3. L'exon 1 renferme le codon ATG initiateur (Figure 5.1).

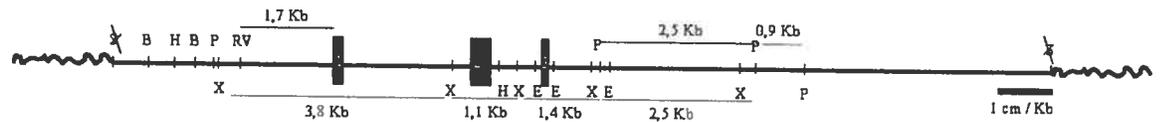
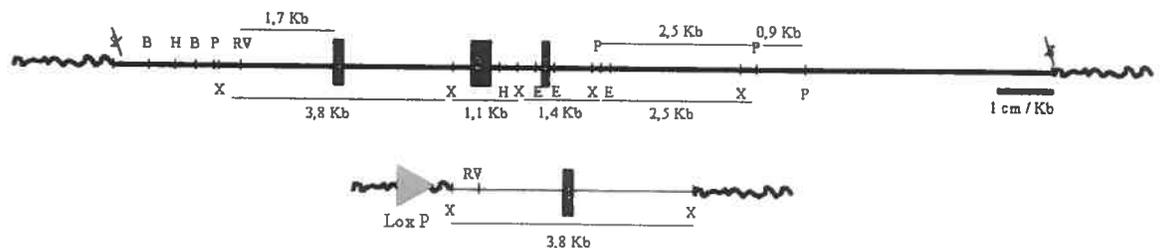


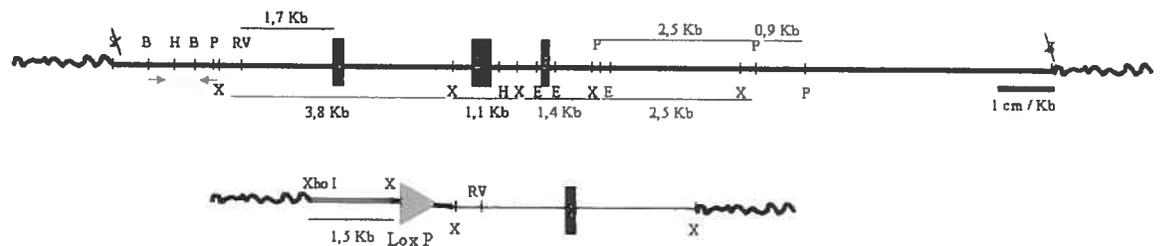
Figure 5.1 : Représentation schématique du clone génomique BAF250. *Abbrev. B : BamHI; H : HindIII; P : PstI; RV : EcoRV; X : XbaI; E : EcoRI; S : SmaI*

La construction du vecteur de ciblage comprend 5 étapes :

- 1) La première étape consiste à digérer le clone génomique BAF250 avec l'enzyme de restriction XbaI et cloner le fragment de 3,8 kb comprenant l'exon 1 en aval du premier loxP contenu dans le plasmide pBlueScript.



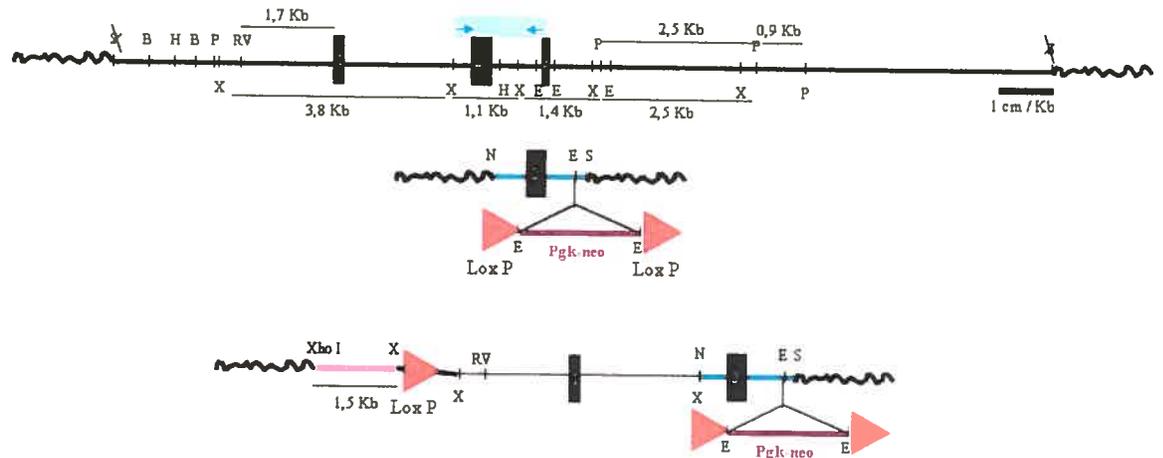
2) Dans un vecteur de ciblage conditionnel, les bras homologues en 5' et en 3' sont nécessaires à la recombinaison et doivent avoir une taille d'au moins 1,5 Kb pour obtenir une recombinaison efficace. Le premier bras homologue situé en 5' a été amplifié par PCR en utilisant le clone génomique BAF250 comme gabarit et les amorces suivantes : sens : 5' – CCGCTCGAGATACACATCTTTAATCCCAAC – 3'; reverse : 5' – CCGCTCGAGTAGCTCTGAACTACATGGAGA – 3'. Les amorces comprennent des sites de reconnaissance pour l'enzyme de restriction XhoI situés au niveau de leurs extrémités 5'. Le produit de PCR (1,5 Kb) a été digéré avec XhoI et cloné dans le vecteur de l'étape 1, en amont du premier loxP comme ceci est indiqué ci-dessous.



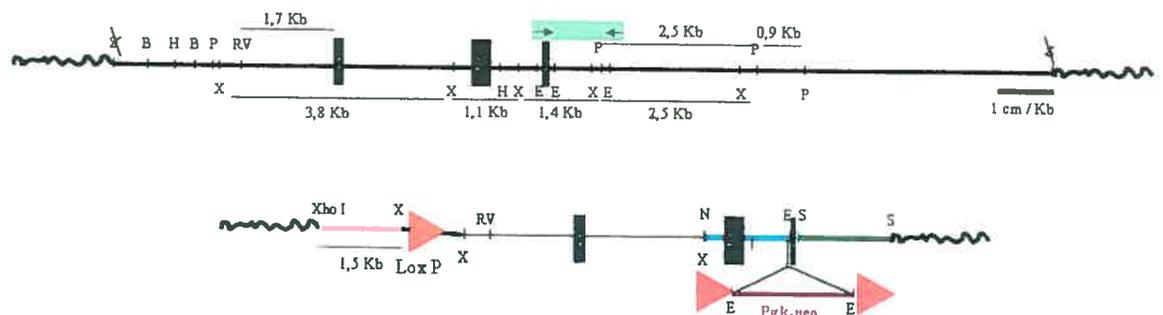
3) Le second bras homologue en 3' est de 5 Kb et comporte les exons 2, 3 et une cassette de pgk-neo flanquée de 2 sites loxP. Ce fragment a été construit en 2 étapes :

a) La première a consisté à amplifier par PCR un fragment de 1,5 Kb situé en aval de l'exon 1 en utilisant les amorces suivantes sens : 5' – ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATTGGGTGGTAGAAGGAAGG – 3'; reverse : 5' – CCCC GCGGGGAAGTTGGTCTCTGAATTCCACA – 3'. Les amorces comprennent des sites de reconnaissance pour les enzymes de restriction NotI et SacII au niveau de leurs extrémités 5'. Le produit de PCR comprenant

l'exon 2 a été digéré avec ces 2 enzymes et sous-cloné en premier dans le vecteur pBSK. La cassette de *pgk-neo* flanquée par 2 séquences *loxP* est sous-clonée dans le site *EcoRI* du fragment de PCR amplifié dans l'étape 3. Le produit est ensuite digéré *NotI* et *SacII* et sous-cloné dans le vecteur de ciblage de l'étape 2, comme ceci est démontré ci-dessous.



- 4) La deuxième partie a consisté à amplifier par PCR le dernier fragment de 1,5 Kb en utilisant les amorces suivantes : sens : 5' – TCCCCGCGGGGATGCCTCTGCCTGCCAGGTGCT – 3'; reverse : 5' – TCCCCGCGGGGAACCAGGCACCAAGTGCTCTCC – 3'. Les amorces comprennent le site de reconnaissance pour l'enzyme *SacII* au niveau de leurs extrémités 5'. Le produit de PCR contenant l'exon 3 a été coupé *SacII* et sous-cloné dans le vecteur de ciblage de l'étape 4 coupé avec la même enzyme de restriction *SacII* et déphosphorylé, comme ceci est décrit ci-dessous.



Pour vérifier si les 3 sites lox P sont arrangés dans la même orientation, des bactéries exprimant la recombinaise Cre à la température permissive 30°C, ont été électroporées avec le vecteur de ciblage conditionnel BAF250. L'ADN plasmidique a été purifié par lyse alcaline et digéré avec les enzymes de restriction XhoI et SacII. Si les sites lox P sont arrangés dans la même orientation, je dois obtenir 2 fragments de 1,5 K et le plasmide pBlueScript de 2,9 Kb. Dans le cas contraire, j'obtiens 3 fragments de 5,3 Kb, 1,5 Kb et 2,9 Kb. Les résultats de la Figure 5.2 démontrent que les 3 sites présents dans le vecteur de ciblage conditionnel BAF250 sont dans la même orientation



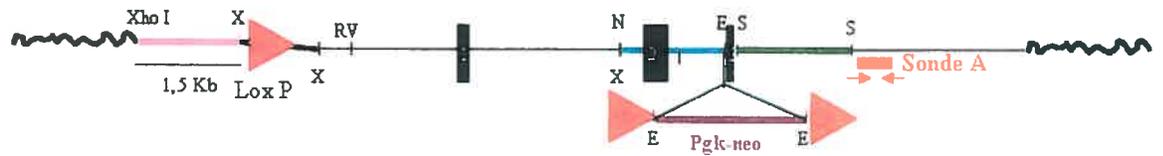
Figure 5.2 : Recombinaison intramoléculaire des 3 loxP inclus dans le vecteur conditionnel BAF250 en présence de la recombinaise Cre

3.2. Génération d'un allèle conditionnel BAF250

3.2.1. Ciblage des cellules ES avec le vecteur conditionnel BAF250

Le vecteur de ciblage a été linéarisé avec les enzymes de restriction XhoI et PvuI et introduit par électroporation dans les cellules ES de type R1 (passage 15). Les cellules R1 sont maintenues sur des MEFs (Mouse Embryonic Fibroblast) irradiées. Le milieu de culture utilisé contient du DMEM (teneur en glucose élevée + glutamine + pyruvate (Gibco BRL)), 15 % FCS (inactivé par la chaleur et testé préalablement pour les cellules ES), 0,1 mM d'acides aminés, 0,15 mM MTG et 1000U/ml de LIF (ESGRO, Chemicon). Avant l'électroporation, les cellules R1 sont étalées sur 0,1% de gélatine afin de se débarrasser des MEFs contaminants. Après un passage sur la gélatine, les cellules sont trypsinisées, dissociées et resuspendues à 10⁷ cellules dans 0,8 ml de milieu de culture. 25 µg d'ADN linéarisé resuspendu dans de l'eau stérile, est ajouté aux cellules contenues dans une cuvette de 0,4 cm (BioRad). L'électroporation a été faite à 225V, 950 µF en utilisant le mode 'exponential decay' de l'électroporateur. La cuvette a été incubée 20 minutes à température de la pièce. Ensuite, les cellules ont été transférées sur les MEFs irradiés. La sélection au G418 (0,3 mg/ mL) (Geneticin, Invitrogen) a débuté 24 heures après l'électroporation et le milieu a été changé tous les jours jusqu'à ce les colonies aient été prélevées (7-10 jours). À peu près 400 colonies ont été prélevées, trypsinisées, dissociées et étalées sur des MEFs irradiés. À 80% de confluence, ¼ des cellules sont transférées dans d'autres plaques à 96 puits et étalées sur de la gélatine pour l'extraction éventuelle d'ADN et ¾ des cellules sont mélangées au milieu de congélation contenant 20% de DMSO et la plaque est déposée à -80°C. Le milieu des clones

amplifiés sur de la gélatine est changé tous les jours et les puits confluent sont mélangés à 100 µl de DNAzol (Invitrogen) et transférés un à un dans une plaque à 96 puits en forme de V gardée à 4°C. Lorsque tous les clones ont été transférés, un volume de 50 µl d'éthanol 100% est ajouté aux puits et la plaque est centrifugée. Les culots d'ADN ont été lavés 2-3 fois avec l'éthanol 75% et digérés avec l'enzyme de restriction HincII. L'ADN a été soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose 0,85% et transféré sur une membrane de nylon Zeta-Probe (BioRad). Les membranes ont été préhybridées à 65°C dans une solution de 6X SSC, 10% formamide, 1% SDS, 2 mM EDTA, 1% lait et 0,5 mg/mL d'ADN de sperme de saumon pendant 2 heures. Pour l'hybridation, 7,5% de dexatran sulfate et la sonde BAF250 marquée au dCTP ³²P ont été ajoutés. La sonde BAF250 a été générée par une amplification par PCR en utilisant le clone génomique BAF250 comme gabarit et les amorces suivantes : sens : 5' – CCGGAATTCCGGGGCATAGTGTCCGACATTGTA – 3'; reverse : 5' – CCGGAATTCCGGGGACGCTAACTTATGGCTAAA – 3', comme ceci est décrit ci-dessous.



Les membranes ont été lavées à 65°C pendant 15 minutes dans 3 solutions successives : 1) 2X SSC + 0,1% SDS; 2) 0,2X SSC + 0,1% SDS; 3) 0,2X SSC. Les membranes ont été déshybridées dans 1% SDS à 65°C pendant 15 minutes et

ensuite réhybridées avec la sonde neo marquée au dCTP³²P. Les clones positifs ont été décongelés et maintenus sur des MEFs irradiés pour l'expansion.

3.3. Analyse des résultats

Au total 400 clones ont été analysés et les résultats démontrent que pour 9 clones, 2 bandes sont détectées : la bande endogène est à 2,7 Kb et après la recombinaison homologue, elle passe à 4,6 Kb, suggérant que ces 9 clones ont recombiné spécifiquement au locus ciblé. La Figure 5.3 représente un exemple des clones 1 et 2. De plus, les membranes ont été réhybridées avec une sonde neo pour vérifier la présence ou non d'intégrants aléatoires dans le génome. Les 9 clones recombinés n'avaient pas d'autres intégrants aléatoires dans le génome et la Figure 5.4 démontre un exemple pour les clones 1 et 2 de la Figure 5.3.

Figure 5.3 : Buvarbage de southern démontrant la recombinaison homologue pour les clones 1 et 2

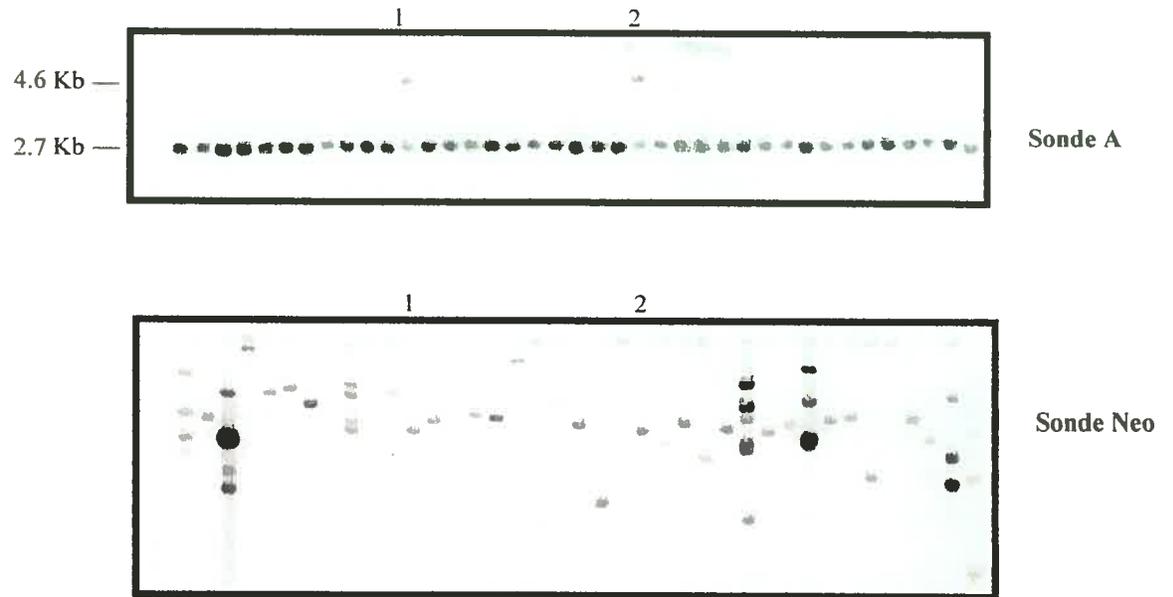


Figure 5.4 : Buvarbage de southern démontrant l'intégration unique pour les clones 1 et 2

L'intégrité du premier lox P situé en 5' du vecteur de ciblage conditionnel a été vérifiée à l'aide d'une réaction de PCR utilisant des amorces situées de part et d'autres de la séquence lox P comme ceci est schématisé ci-dessous.



Si le lox P est intact, la réaction de PCR devrait nous donner un fragment de 164 pb, alors que si le lox P est excisé suite à des réarrangements, je devrai obtenir un fragment de 130 pb. Sur les 9 clones ciblés, 3 avaient un lox P intact. La figure 5.5 montre un exemple d'une réaction positive versus une négative.

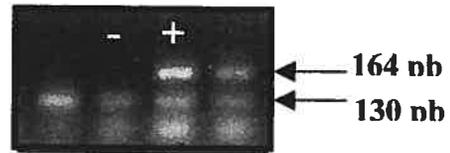


Figure 5 .5. Criblage par PCR de l'intégrité du lox P situé en 5' du vecteur conditionnel BAF250. Abbrev. + : clone positif; - : clone négatif

Un de ces clones a été injecté dans des blastocystes pour générer des souris chimères par le service de la transgénèse de l'IRIC, à l'Université de Montréal.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET DISCUSSION

Mon projet a consisté à étudier les rôles de 2 gènes homéotiques soit *Hoxa9* et *Meis1* dans l'hématopoïèse normale et leucémique. Le chapitre II de ma thèse a démontré que la sur-expression de *Hoxa9* induit une expansion des HSCs dans des modèles de transplantation murins. Au niveau des progéniteurs, l'expansion est observée au niveau des progéniteurs myéloïdes seulement, expliquant la restriction de *Hoxa9* à transformer les cellules myéloïdes. Le chapitre III a démontré l'existence de 2 domaines importants de MEIS1 impliqués dans la transformation leucémique en collaboration avec *Hoxa9*. Le premier est situé au niveau de la région N-terminale et lie PBX; le deuxième est retrouvé au niveau de la partie C-terminale de la protéine et renferme une activité de trans-activation. Les chapitres IV et V ont identifié plusieurs facteurs interagissant avec MEIS1 dans le contexte leucémique *Hoxa9* + *Meis1*. Parmi ces derniers, j'ai retenu BAF250, un membre du complexe de remodelage de la chromatine comme facteur potentiel interagissant avec MEIS1. Le rôle de ce dernier dans l'hématopoïèse normale et leucémique sera étudié à l'aide du modèle de knockout conditionnel que j'ai généré.

La machinerie transcriptionnelle responsable de la régularisation de la fonction des HSCs est complexe. Parmi les facteurs transcriptionnels, nous distinguons ceux qui sont impliqués dans la spécification des HSCs durant l'embryogenèse dont SCL/tal-1 et AML1 (requis pour l'hématopoïèse définitive). Le facteur de transcription SCL/tal-1 est essentiel pour l'établissement de l'hématopoïèse primitive. Les souris mutantes *SCL/tal-1^{-/-}* meurent au stade embryonnaire et sont dépourvues de l'hématopoïèse provenant du sac vitellin. Orkin et al. ont généré un allèle conditionnel de *SCL/tal-1* et ont démontré que ce gène est critique pour la genèse des HSCs et qu'une expression continue est dispensable pour la

fonction des HSCs. Les souris *AML^{-/-}* meurent au stade embryonnaire et sont par contre dépourvues de l'hématopoïèse provenant du foie fœtal. Ceci suggère l'existence de différentes classes de facteurs régularisateurs des HSCs : ceux qui sont requis pour la genèse des HSCs (identité) et ceux qui sont requis pour l'auto-renouvellement et la multipotentialité. Au niveau de l'auto-renouvellement, nous distinguons 2 types : l'auto-renouvellement/expansion au niveau du foie fœtal et impliquant des divisions symétriques et l'auto-renouvellement/maintien au niveau de la moelle osseuse, impliquant des divisions asymétriques. Le facteur de transcription MEIS1 est exprimé à des niveaux élevés au niveau des sous-populations *Sca1⁺Lin⁻* de cellules de foie fœtal. Les souris mutantes *Meis1^{-/-}* meurent au stade embryonnaire et ont un nombre réduit de cellules de foie fœtal ainsi que des défauts de différenciation au niveau de plusieurs lignées hématopoïétiques. De plus, les cellules de foie fœtal *Meis1^{-/-}* ne sont pas capables de protéger contre une dose de radioactivité létale et ne peuvent pas compétitionner dans des essais de reconstitution *in vivo*. D'après ces données, je déduis que MEIS est un régularisateur intrinsèque de l'auto-renouvellement/expansion des HSCs du foie fœtal. Les souris *Hoxa9^{-/-}* sont viables et fertiles. Au niveau du compartiment hématopoïétique, le nombre des HSCs de la moelle osseuse est réduit de 10x fois par rapport aux contrôles. À l'opposé, une surexpression de *Hoxa9* induit une augmentation des HSCs de la moelle osseuse dans des modèles de transplantation murins. Ces résultats suggèrent que *Hoxa9* serait impliqué dans l'auto-renouvellement/maintien des HSCs au niveau de la moelle osseuse.

De plus, comme pour HOXA9, une variété de facteurs de transcription (SCL et AML-1), impliqués dans des translocations chromosomiques induisant des

transformations leucémiques, jouent un rôle dans la prolifération et la différenciation des HSCs (discuté dans le chapitre II de cette thèse). Pour ce qui suit, je me limiterai à discuter de l'importance des mécanismes de répression et d'activation dans la transformation leucémique.

Un nombre de modèles impliquant une activation ou une répression de la transcription ont été proposés pour expliquer la contribution des gènes homéotiques dans la transformation leucémique.

Une dérégularisation de l'expression des gènes *Hox* ou la génération d'une homéoprotéine de fusion, résulte en une expression continue des cibles, un blocage de la différenciation et une prolifération des précurseurs hématopoïétiques. De même, la modulation de l'expression des cofacteurs MEIS et PBX, ou la dérégularisation transcriptionnelle suite à une perte de fonction de MLL, affectent l'activité des protéines HOX.

En effet, les translocations chromosomiques génèrent des protéines de fusion qui peuvent acquérir des fonctions distinctes. Dans le cas de E2A-PBX1, la plupart de la séquence codante de PBX1 incluant l'homéodomaine est fusionnée à la partie N-terminale de E2A comprenant les 2 domaines d'activation transcriptionnelle (Kamps, 1990; Nourse, 1990). La protéine PBX1 n'est pas oncogénique (Kamps, 1996; Kroon, 1998; Kros, 1998; Monica, 1994) et la fusion avec E2A est essentielle pour acquérir ce potentiel. Des expériences de mutagenèse et de structure-fonction ont démontré que les 2 domaines d'activation transcriptionnelle de E2A sont essentiels pour la transformation des cellules NIH3T3 (Monica, 1994) et sa sur-expression dans des cellules hématopoïétiques primaires induit un blocage de la différenciation des progéniteurs myéloïdes (Kamps, 1996). De plus, des essais de trans-activation utilisant des éléments

réponse pour HOX et PBX1 (ou E2A-PBX1) ont démontré que E2A-PBX1 et non PBX1 est capable de trans-activer le gène rapporteur et que les protéines HOX modulent l'activité de trans-activation de E2A-Pbx1 (Lu, 1995). Ces observations suggèrent que le potentiel oncogénique de E2A-Pbx1 est lié à sa fonction d'activation transcriptionnelle.

L'interaction de la protéine de fusion NUP98-HOXA9 avec le co-activateur CBP est responsable d'une aberration d'expression de gènes cibles. Les protéines CBP et p300 possèdent une activité intrinsèque d'histone acétyltransférase. Ces protéines participent au remodelage de la chromatine et à l'acétylation des facteurs de transcription (Blobel, 2000; Goodman, 2000). Il est à noter que CBP et p300 peuvent soit activer soit réprimer l'expression de gènes, agir comme des facteurs de pro ou d'anti-différenciation selon le contexte du promoteur lié et les facteurs qui y sont associés. Elles jouent aussi le rôle d'un pont moléculaire liant les complexes activateurs et répresseurs transcriptionnels à l'appareil de transcription de base.

Plusieurs homéoprotéines interagissent directement avec CBP. Par exemple, dans les cellules transformées, l'interaction de HOXB7 avec CBP trans-active *Hoxb7*. Cette activation est renforcée par l'addition d'un inhibiteur de l'histone déacétylase, la trichostatin A (TSA) (Chariot, 1999) et par interférence avec le recrutement du complexe co-répresseur N-CoR/SMRT.

La figure 6.1, extraite de l'article de Saleh et al. (Saleh et al., 2000) décrit une observation similaire quant à l'interaction de HOXB1 avec son élément autorégularisateur, en présence du co-facteur PBX1.

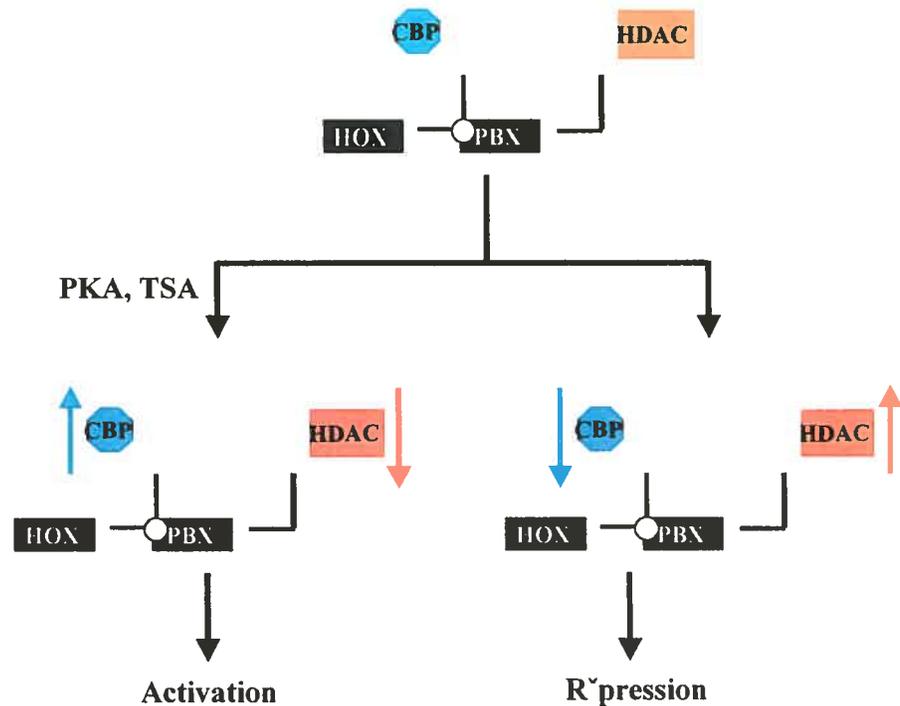


Figure extraite de Saleh et al., *MCB* 20 (22), 2000

Figure 6.1: Un modèle d'activation et de répression par les complexes HOX-PBX

Les complexes co-activateurs et co-répresseurs CBP et HDAC 1 et 3 interagissent avec HOX et PBX respectivement. Dans certaines conditions de culture cellulaire, l'activité nette des complexes co-répresseurs dépasse celle des complexes co-activateurs (à droite 'répression'). Dans d'autres cas (par addition de TSA ou en réponse à la voie de signalisation PKA), une augmentation de la fonction des co-activateurs ou une diminution de la fonction des co-répresseurs déplace la balance vers la voie d'activation (à gauche 'activation'). La flèche rouge verticale dénote une augmentation/diminution de CBP alors que la flèche bleue verticale dénote une augmentation/diminution de HDACs. La boîte noire représente l'homéodomaine et le cercle ouvert représente l'hexapeptide de Hox rentrant en contact avec Pbx. Abrév. TSA : 'trichostatin A', PKA : 'proteine kinase A'.

D'après la figure 6.1, Saleh et al., (Saleh et al., 2000) ont utilisé le modèle cellulaire murin P19 ('embryonal carcinoma') et ont démontré que dans certaines conditions de culture cellulaire, le dimère HOXB1-PBX1 réprime la transcription

de gènes cibles. Ils ont élucidé le mécanisme moléculaire sous-jacent en identifiant les éléments du complexe répresseur formé par HDAC 1 et 3, mSIN3B et N-CoR/SMRT comme les facteurs interagissant avec la partie N-terminale de PBX1A. Par contre le recrutement du co-activateur CBP par HOX induit une activation de la transcription des gènes cibles. Les résultats de cet article mènent les auteurs à conclure que le dimère HOX-PBX peut agir 'en 'activateur' ou en 'répresseur' de la transcription par association soit aux complexes co-activateurs ou co-répresseurs'. De plus, ils soulignent que 'les signaux extracellulaires peuvent dicter les rôles joués par HOX-PBX dans l'activation ou la répression de la transcription des gènes cibles' (Saleh et al., 2000).

Shen et al. ont démontré que l'interaction entre les protéines HOX et CBP bloque l'activité d'histone acétyltransférase de CBP (Shen, 2001). Cette interaction implique l'homéodomaine de HOX et varie suivant l'homéoprotéine en question. Étant donné que plusieurs protéines interagissent avec CBP, cette liaison ne détermine pas un mécanisme d'action spécifique aux homéoprotéines.

D'autres mécanismes de répression médiés par les homéoprotéines ont été décrits incluant une répression directe en interférant avec d'autres composantes de l'appareil de transcription de base tel le cas de "Even-Skipped" (Eve) chez la Drosophile (Li & Manley). Eve réprime la transcription en liant directement la "TATA binding protein (TBP)", empêchant ainsi l'interaction de TBP-TFIID avec le promoteur (Li & Manley, 1998).

De plus, la sur-expression de *Hoxa10* dans les cellules myéloïdes U937 induit leur différenciation accompagnée d'une augmentation des niveaux d'expression de la 'cyclin-dependent kinase' p21 (Bromleigh, 2000). Ce résultat est à l'opposé de ce qui a été obtenu avec les cellules hématopoïétiques primaires

(Throsteinsdottir, 1997), suggérant que HOXA10 recrute des cofacteurs différents dans chaque contexte cellulaire.

Des études ont démontré que la protéine HOXA5 trans-active le promoteur de p53 (Raman, 2000). En effet, l'introduction de HOXA5 dans des cellules épithéliales cancéreuses p53^{+/+} induit leur mort par apoptose. De plus, une perte d'expression en ARNm et en protéine de HOXA5 et de p53 est notée au niveau des lignées cellulaires et chez les patients souffrant de cancer du sein. Dans 16/20 échantillons de cancer du sein p53^{-/-}, la région du promoteur de HOXA5 est méthylée (Raman, 2000), ce qui a suggéré qu'une perte d'expression de p53 dans ce type de cancer est obtenue suite à une absence d'expression de HOXA5. Cependant, aucune association spécifique n'a été documentée entre la perte de fonction de HOXA5 et la transformation leucémique.

Les voies de modulation du potentiel oncogénique de *Meis1* dans le contexte leucémique *Hoxa9 + Meis1*

D'après les partenaires de MEIS1 identifiés en utilisant le système du double hybride, je peux suggérer que MEIS1 est impliqué dans plusieurs voies potentielles pour la transformation cellulaire. Celles-ci incluent soit le transport de l'ARN messager (Tap), la signalisation cellulaire (Rlf), le cycle cellulaire (DP-1), la réparation de l'ADN (SNF-2) ou le remodelage de la chromatine et la régularisation transcriptionnelle (BAF250) (Figure 6.2).

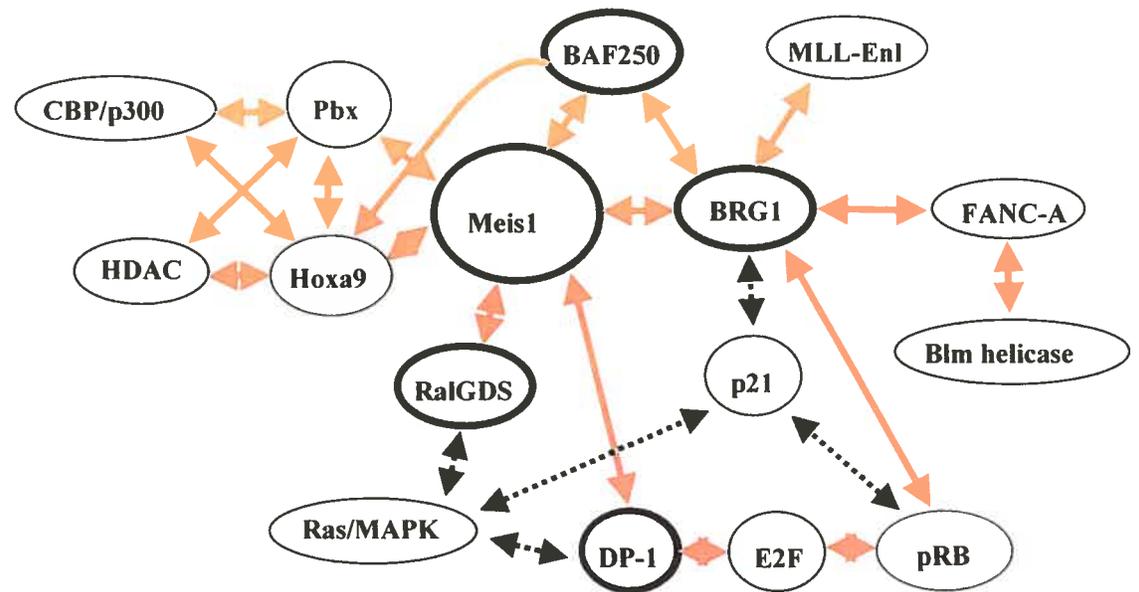


Figure 6.2: Le réseau MEIS1 proposé

Basée sur une revue de littérature exhaustive et sur mes résultats de double-hybride, je propose une discussion portant sur l'implication possible de chaque gène du réseau MEIS1 proposé à la figure 6.2.

Implication de Rlf dans la leucémie Hoxa9 + Meis1 : Les protéines Ras lient les nucléotides guanidines et possèdent une activité intrinsèque de GTPase. Chez les mammifères, les facteurs de croissance favorisent la production de la forme active de Ras lié au GTP (Dickinson, 1992; Moodie et Wolfman, 1994). L'activation de la voie de Ras est responsable de la prolifération cellulaire (Bourne, 1991), ce qui pourrait mener à une transformation oncogénique. Ras possède plusieurs effecteurs dont Rlf qui lie Rap1A-GTP et Ras-GTP avec des affinités égales (Wolthuis, 1996). Dans la leucémie Hoxa9 + Meis1, l'interaction

de MEIS1 avec Rlf dans le cytoplasme maintiendrait l'activation de la voie de Ras, favorisant ainsi la prolifération et la transformation cellulaires.

Implication de DP1 dans la leucémie Hoxa9 + Meis1 : Les cellules leucémiques *Hoxa9 + Meis1* ont un taux de prolifération élevé. L'interaction de MEIS1 avec DP1 permettrait l'activation de gènes impliqués dans la phase S du cycle cellulaire.

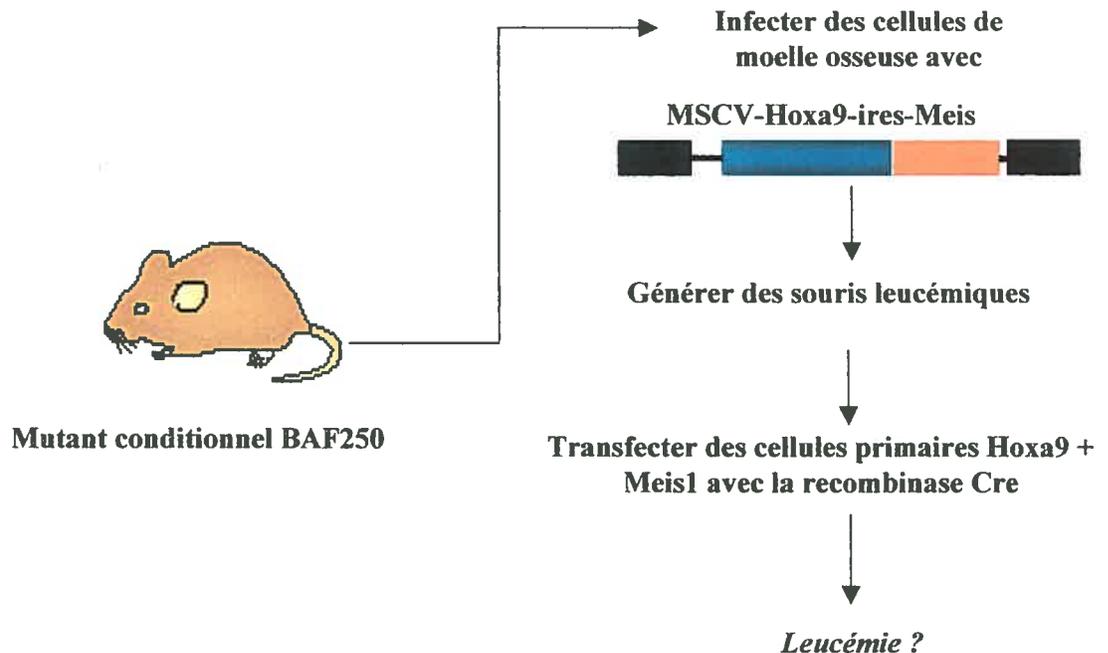
Implication de SNF-2-like dans la leucémie Hoxa9 + Meis1 :

Des études de notre laboratoire ont démontré que la surexpression de *Meis1* induit une instabilité génomique (Manuscrit en préparation). Dans la leucémie induite par *Hoxa9*, *Meis1* peut séquestrer des protéines impliquées dans la reconnaissance de dommages d'ADN et prévenir un arrêt du cycle cellulaire en vue de réparation des anomalies. Le résultat final serait qu'une combinaison entre la prolifération (*Hoxa9*) et l'instabilité génomique (*Meis1*) conduise à la transformation leucémique.

Implication de BAF250 dans la leucémie Hoxa9 + Meis1 : Les résultats présentés au chapitre IV de cette thèse suggèrent que MEIS1 pourrait faire partie d'un complexe de transactivation impliqué dans la transformation leucémique. L'interaction de MEIS1 avec BAF250 recruterait le complexe SNF/SWI pour activer la transcription de gènes cibles impliqués dans la leucémie induite par *Hoxa9*.

Puisque BAF250 est exprimé dans les HSCs et qu'une réduction des niveaux protéiques affecte le système hématopoïétique (chapitre IV), il sera important d'évaluer son rôle dans l'hématopoïèse normale au niveau des HSCs et des progéniteurs en utilisant les essais fonctionnels *in vivo* et *in vitro* présentés au chapitre I. De plus, le rôle de son interaction avec MEIS1 dans le contexte d'une leucémie induite par *Hoxa9* doit être élucidé par évaluation à premier abord de l'agressivité de la leucémie *Hoxa9* + *Meis1* obtenue ou non, en sa présence ou en son absence et ce en adoptant le modèle murin de mutant conditionnel généré dans le cadre de ma thèse, comme ceci est schématisé ci-dessous (Figure 6.3).

Figure 6.3: Évaluation du rôle de BAF250 dans la leucémie *Hoxa9* + *Meis1*



Références

Blobel,G.A. CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood* **95**, 745-755 (2000).

Bourne, HR. *Nature* **349**, 117-127 (1991).

Chariot,A. *et al.* CBP and histone deacetylase inhibition enhance the transactivation potential of the HOXB7 homeodomain-containing protein. *Oncogene* **18**, 4007-4014 (1999).

Dickson, BF. *Nature* **360**, 600-603 (1992).

Goodman,R.H. & Smolik,S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes & Development* **14**, 1553-1577 (2000).

Kamps,M.P., Murre,C., Sun,X.H. & Baltimore,D. A New Homeobox Gene Contributes the Dna-Binding Domain of the T(1-19) Translocation Protein in Pre-B All. *Cell* **60**, 547-555 (1990).

Kamps,M.P., Wright,D.D. & Lu,Q. DNA-binding by oncoprotein E2A-Pbx1 is important for blocking differentiation but dispensable for fibroblast transformation. *Oncogene* **12**, 19-30 (1996).

Kroon,E. *et al.* Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *Embo Journal* **17**, 3714-3725 (1998).

Krosel, J. *et al.* Cellular proliferation and transformation induced by HOXB4 and HOXB3 proteins involves cooperation with PBX1. *Oncogene* **16**, 3403-3412 (1998).

Lu, Q.A., Knoepfler, P.S., Scheele, J., Wright, D.D. & Kamps, M.P. Both Pbx1 and E2A-Pbx1 Bind the Dna Motif Atcaatcaa Cooperatively with the Products of Multiple Murine Hox Genes, Some of Which Are Themselves Oncogenes. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 3786-3795 (1995).

Monica, K., Lebrun, D.P., Dederer, D.A., Brown, R. & Cleary, M.L. Transformation Properties of the E2A-Pbx1 Chimeric Oncoprotein - Fusion with E2A Is Essential, But the Pbx1 Homeodomain Is Dispensable. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 8304-8314 (1994).

Moodie, S.A. & Wolfman, A. *Trends Genet.* **10**, 44-48 (1994).

Nourse, J. *et al.* Chromosomal Translocation-T(1-19) Results in Synthesis of a Homeobox Fusion Messenger-Rna That Codes for a Potential Chimeric Transcription Factor. *Cell* **60**, 535-545 (1990).

Raman, V. *et al.* Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* **405**, 974-978 (2000).

Saleh, M., Rambaldi, I., Yang, X.J. & Featherstone, M.S. Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 8623-8633 (2000).

Shen,W.F., Krishnan,K., Lawrence,H.J. & Largman,C. The HOX homeodomain proteins block CBP histone acetyltransferase activity. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 7509-7522 (2001).

Thorsteinsdottir,U. *et al.* Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 495-505 (1997).

Wolthuis RMF *et al.*, RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap 1A-associating protein. *Oncogene* **13**, 353-362 (1996)

