

2m11.3441.7

Université de Montréal

**Mise au point d'un modèle d'étude des bases
moléculaires de l'auto-renouvellement des cellules
souches hématopoïétiques induit par HOXB4**

par

Mélanie Laurin

Département de biologie moléculaire, Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en biologie moléculaire

Février, 2006

© Mélanie Laurin, 2006



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
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Mise au point d'un modèle d'étude des bases moléculaires de l'auto-
renouvellement des cellules souches hématopoïétiques induit par HOXB4

présenté par :

Mélanie Laurin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Alain Verrault, président-rapporteur
Guy Sauvageau, directeur de recherche
Pierre Thibault, co-directeur
Benoit Coulombe, membre du jury

Résumé

Les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) sont caractérisées par leur habilité à s'auto-renouveler et à générer des cellules matures de toutes les lignées hématopoïétiques via leur différenciation. Étant donné leur faible nombre, il est essentiel de développer des méthodes pour augmenter leur nombre en culture afin de pouvoir les utiliser à leur plein potentiel dans des thérapies cliniques. HOXB4 a été identifié comme étant une protéine permettant d'induire une expansion des CSHs d'environ 40 fois en culture et de nouvelles approches moléculaires via la régulation négative de PBX, un cofacteur des gènes *Hox*, suggèrent qu'il serait possible d'amplifier le nombre de ces précieuses cellules jusqu'à plus de 1000 fois en culture. Nous savons que pour exercer son effet sur les cellules souches, HOXB4 a besoin de son domaine de liaison à l'ADN. Ceci suggère qu'HOXB4 induit une expansion des CSHs via une activation ou une répression de certains gènes cibles qui ne sont toujours pas identifiés. Alternativement, il se peut que ce domaine exerce une tout autre fonction. Ainsi, les bases moléculaires menant à une amplification du nombre de CSHs demeurent obscures et mon projet avait pour but de construire deux approches qui pourraient éventuellement faciliter la découverte des gènes cibles de cette protéine en plus de mener à la découverte de ces partenaires protéiques permettant d'identifier de nouveaux régulateurs de l'auto-renouvellement des cellules souches.

Mots-clés : HOXB4, cellules souches hématopoïétiques, auto-renouvellement, gènes *Hox*

Abstract

Hematopoietic stem cells (HSCs) are characterized by their ability to self-renew and to generate mature cells of all hematopoietic lineages through differentiation. Because of their limiting numbers, we need to develop methods to expand these cells in culture in order to use them at their full potential in clinical therapies. HOXB4 was identified as a protein that can induce around 40 fold expansion of HSCs in culture and new molecular strategies using a down regulation of the *Hox* gene cofactor PBX suggest that it may be possible to expand these cells to more than 1000 fold in culture. We know that HOXB4 needs its DNA binding ability to perform its effect on stem cells. This suggests that HOXB4-induced expansion of HSCs via an activation and/or repression of target genes that remain unidentified. The molecular bases around the specific expansion of HSCs by HOXB4 remain obscure and my project main goal was to set up two approaches that would facilitate the discovery of target genes of this protein as well as the finding of new protein partners that would be implicated in stem cell self-renewal.

Keywords: HOXB4, hematopoietic stem cells, self-renewal, *Hox* genes

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Résumé..... | iii |
| Abstract | iv |
| Table des matières..... | v |
| Liste des figures | ix |
| Liste des sigles et abréviations | xi |
| Remerciements | xv |
| Chapitre 1: Introduction | 1 |
| 1. Hématopoïèse et cellules souches | 2 |
| 1.1 L'hématopoïèse | 2 |
| 1.2 Les cellules souches hématopoïétiques..... | 4 |
| 1.3 L'auto-renouvellement des CSHs et son implication clinique..... | 6 |
| 2. HOXB4, un régulateur de l'auto-renouvellement des CSHs | 7 |
| 2.1 Les gènes <i>Hox</i> comme régulateur de l'hématopoïèse normale et leucémique..... | 7 |
| 2.2 HOXB4, un facteur d'expansion des CSHs <i>in vivo</i> | 11 |
| 2.2.1 HOXB4 et l'interaction à l'ADN..... | 13 |
| 2.2.2 PBX, un cofacteur des gènes <i>Hox</i> | 14 |
| 2.3 HOXB4, un facteur d'expansion des CSHs <i>in vitro</i> | 15 |
| 2.3.1 La protéine HOXB4 comme facteur de croissance des CSHs | 16 |
| 3. Bases moléculaires du mécanisme d'action des Hox | 18 |
| 3.1 Gènes cibles des Hox | 18 |
| 3.2 Partenaires protéiques des Hox..... | 20 |
| 4. Présentation du projet de recherche..... | 22 |
| 4.1 Hypothèses de recherche | 22 |
| 4.1.1. HOXB4 agirait en tant que facteur de transcription..... | 22 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 4.1.2. | HOXB4 ferait parti d'un complexe protéique d'auto-renouvellement. | 23 |
| 4.2 | Objectifs de recherche | 23 |
| 4.2.1 | Faciliter l'identification des gènes cibles grâce à la génération d'une forme activatrice et répressive de la protéine HOXB4 | 24 |
| 4.2.2 | Faciliter l'identification des partenaires protéiques d'HOXB4 grâce à la génération de stratégies de purification | 24 |
| Chapitre 2: Matériel et méthodes..... | | 26 |
| 1. Stratégie pour générer une forme activatrice et répressive de la protéine HOXB4 | | 27 |
| 1.1 | Construction des vecteurs rétroviraux et d'expression..... | 27 |
| 1.2 | Transcription et traduction <i>in vitro</i> | 28 |
| 1.3 | Analyse de retard sur gel | 28 |
| 1.4 | Génération et maintenance des lignées cellulaires transitoires | 28 |
| 1.5 | Génération des cellules productrices de rétrovirus et infection des cellules de moelle osseuse | 29 |
| 1.6 | Essai de prolifération <i>in vitro</i> | 29 |
| 1.7 | Essai de compétition <i>in vitro</i> | 30 |
| 1.8 | Analyse des CFCs | 30 |
| 1.9 | Analyse par western blot..... | 31 |
| 1.9.1 | Extraits protéiques totaux | 31 |
| 1.9.2 | Extraits protéiques des fractions nucléaires et cytoplasmiques.... | 31 |
| 2. Stratégie pour l'identification des partenaires protéiques d'HOXB4.... | | 32 |
| 2.1 | Construction des vecteurs rétroviraux..... | 32 |
| 2.2 | Génération des cellules productrices de rétrovirus, infection des cellules de moelle osseuse, infection et maintenance des lignées cellulaires stables..... | 33 |
| 2.3 | Essai de compétition <i>in vitro</i> | 33 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 2.4 | Extraits protéiques et purification par affinité en tandem (TAP tag) | 34 |
| 2.4.1 | Préparation des extraits protéiques totaux..... | 34 |
| 2.4.2 | Purification par affinité en tandem (TAP tag) | 34 |
| 2.5 | Extraits protéiques et purification par immunoprécipitation (Flag tag).. | 37 |
| 2.5.1 | Préparation des extraits protéiques totaux..... | 37 |
| 2.5.2 | Immunoprécipitation (Flag tag) | 38 |
| 2.6 | Analyse par western blot..... | 39 |
| 2.7 | Gel de séparation et coloration au nitrate d'argent..... | 39 |
| Chapitre 3: Résultats | | 41 |
| 1. Stratégie pour générer les formes activatrice et répressive de la protéine HOXB4 | | 42 |
| 1.1 | Génération des protéines de fusion VP16-HOXB4 et EN-HOXB4 | 42 |
| 1.2 | Les protéines de fusions VP16-HOXB4 et EN-HOXB4 sont traduites et transcrites <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> | 42 |
| 1.3 | La protéine VP16-HOXB4 confère un avantage prolifératif aux cellules de moelle osseuse infectées..... | 45 |
| 1.4 | La protéine VP16-HOXB4 confère un avantage prolifératif aux progéniteurs de moelle osseuse | 49 |
| 1.5 | Les cellules de moelle osseuse surexprimant VP16-HOXB4 expriment des niveaux élevés d'HOXB4..... | 50 |
| 2. Stratégie pour identifier les partenaires protéiques d'HOXB4..... | | 51 |
| 2.1 | Génération des protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag..... | 51 |
| 2.2 | Les protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag sont fonctionnelles | 52 |
| 2.3 | Les lignées cellulaires 293T, BaF/3 et K562 expriment les protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag..... | 54 |
| 2.4 | La purification par affinité en tandem nécessite une optimisation | 55 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 2.5 | La protéine HOXB4-TAP est retrouvée dans l'élution de la purification par affinité en tandem | 58 |
| 2.6 | La protéine HOXB4-Flag est retrouvée dans l'élution de la purification par immunoprécipitation..... | 60 |
| Chapitre 4: Discussion et conclusion | | 63 |
| Discussion | | 64 |
| Conclusion..... | | 73 |
| Bibliographie..... | | I |

Liste des figures

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figure 1.1 | Représentation schématique de la hiérarchie hématopoïétique..... | 3 |
| Figure 1.2 | Représentation schématique d'un essai CRU permettant de quantifier le nombre de CSHs dans une population test | 5 |
| Figure 1.3 | Représentation schématique de l'organisation chromosomique des gènes <i>Hox</i> de mammifères..... | 8 |
| Figure 1.4 | Représentation de la stratégie de transfert de gène par l'intermédiaire de vecteurs rétroviraux..... | 10 |
| Figure 1.5 | Régulation de la reconstitution du pool de CSH suivant une greffe de moelle osseuse..... | 12 |
| Figure 1.6 | Représentation schématique de la protéine HOXB4 et de son interaction avec le cofacteur PBX..... | 13 |
| Figure 2.1 | Représentation schématique de la stratégie de purification par affinité en tandem..... | 36 |
| Figure 2.2 | Représentation schématique de la stratégie de purification par immunoprécipitation..... | 38 |
| Figure 3.1 | HOXB4 et les protéines de fusion EN-HOXB4 et VP16-HOXB4, vecteurs rétroviraux et d'expression et analyses d'expression dans différents systèmes..... | 43 |
| Figure 3.2 | Capacité de liaison à l'ADN d'HOXB4 et des protéines de fusion VP16-HOXB4 et EN-HOXB4..... | 44 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Figure 3.3 | L'expression de VP16-HOXB4 confère un avantage prolifératif aux cellules de moelle osseuse..... | 46 |
| Figure 3.4 | Profil de FACS des cellules de moelle osseuse de l'essai de compétition <i>in vitro</i> | 48 |
| Figure 3.5 | L'expression de VP16-HOXB4 confère un avantage prolifératif aux progéniteurs de moelle osseuse..... | 49 |
| Figure 3.6 | Les cellules de moelle osseuse surexprimant VP16-HOXB4 expriment des niveaux élevés d'HOXB4..... | 51 |
| Figure 3.7 | Vecteur rétroviral pour les stratégies de purification par affinité en tandem et par immunoprécipitation..... | 52 |
| Figure 3.8 | Les protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag sont fonctionnelles..... | 53 |
| Figure 3.9 | Les lignées cellulaires stables expriment les protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag..... | 55 |
| Figure 3.10 | La purification par affinité en tandem requiert une optimisation..... | 56 |
| Figure 3.11 | Validation de la stratégie de purification par affinité en tandem..... | 59 |
| Figure 3.12 | Validation de la stratégie de purification par immunoprécipitation.... | 61 |

Liste des sigles et abréviations

| | |
|-------|---|
| 5-Fu | 5-Fluorouracil |
| A | Acide aminé alanine |
| ADN | Acide déoxyribonucléique |
| ADNc | Acide déoxyribonucléique complémentaire |
| AGM | <i>Dorsal aorta, gonads and mesonephroi</i> |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| CBP | <i>Calmoduline binding peptide</i> |
| CFC | <i>Colony forming cell</i> |
| CFU-S | <i>Colony forming unit-spleen</i> |
| CLP | <u>Progéniteur lymphoïde commun</u> |
| CMP | <u>Progéniteur myéloïde commun</u> |
| CRU | <i>Competitive repopulating unit</i> |
| CSH | Cellule souche hématopoïétique |
| EN | Domaine de répression de la transcription d' <i>Engrailed</i> |
| ErP | Progéniteur des érythrocytes |
| FACS | <i>Fluorescence activated cell sorting</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| G | Acide aminé glycine |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> |
| GMP | Progéniteur des macrophages et granulocytes |
| HD | Homéodomaine |
| His | Histidine |
| Hox | Homéobox |
| IL-3 | Interleukin-3 |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IRES | <i>Internal ribosomal entry site</i> |

| | |
|----------|---|
| LTR | <i>Long terminal repeat</i> |
| MEIS | <i>Myeloid ecotropic leukaemia virus integration site</i> |
| MEP | Progéniteur des érythrocytes et mégacaryocytes |
| MkP | Progéniteur des mégacaryocytes |
| MSCV | <i>Murine stem cell proviral vecteur</i> |
| N | Acide aminé asparagine |
| Neo | Néomycine |
| NK | <i>Natural killer</i> |
| NOD-SCID | <i>Nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency</i> |
| Pb | Paire de base |
| PBS | <i>Phosphate-buffered salt</i> |
| PBX | <i>Pre-B-cell homeobox 1</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PGK | Phosphoglycérate kinase |
| PM | Poids moléculaire |
| Pro-B | Progéniteur des cellules B |
| Pro-NK | Progéniteur des cellules NK |
| Pro-T | Progéniteur des cellules T |
| Prot A | Protéine A |
| PS | <i>Para-aortic splanchnopleura</i> |
| SCF | <i>Stem cell factor</i> |
| SCL | <i>Stem cell leukemia</i> |
| SRC | <i>NOD-SCID mouse repopulating cells</i> |
| TAP | <i>Tandem affinity purification</i> |
| TEV | Tobacco etch virus |
| TMO | Transplantation de moelle osseuse |
| VP16 | Domaine d'activation de la transcription de VP16 |
| VSV | <i>Vesicular stomatitis virus</i> |

W

Acide aminé tryptophane

À mes parents pour leur support...

Remerciements

J'aimerais exprimer mon appréciation sincère envers mon directeur de recherche, le Dr Guy Sauvageau, pour son aide et support à la réalisation de mon projet de recherche ainsi que pour son enthousiasme contagieux envers la recherche en laboratoire. J'aimerais aussi remercier mon co-directeur, le Dr Pierre Thibault pour ses précieux conseils.

Merci à tous les membres du laboratoire pour leur aide et pour leur camaraderie. J'aimerais aussi souligner le grand aide de Nathalie Beslu et d'Erinn Soucie et les remercier pour leur esprit critique au quotidien ainsi que pour leur amitié précieuse.

Enfin, un merci tout spécial aux membres de ma famille et à mon copain pour leur amour et support essentiel.

Chapitre 1

Introduction

1. Hématopoïèse et cellules souches

1.1 L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus physiologique permettant la production quotidienne et continue des cellules sanguines matures dont la durée de vie est limitée. Ce processus de synthèse se fait sous la forme d'une cascade impliquant l'engagement séquentiel de cellules pluripotentes en progéniteurs de capacité restreinte et finalement en cellules fonctionnelles telles que les globules rouges, les plaquettes, les lymphocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, et les monocytes/macrophages¹ (Figure 1.1).

Chez les mammifères, il a été établi que les sites d'hématopoïèse varient au cours du développement de l'embryon. Une première vague d'hématopoïèse dite primitive d'origine extra embryonnaire entraînera l'apparition de progéniteurs des érythroblastes et des macrophages². La présence des premières cellules pluripotentes à la base de la hiérarchie hématopoïétique dite définitive a été rapportée au jour E8.0 dans la région intra embryonnaire de l'aorte-gonade-mésonephroi (AGM) et de la para-aortique-splanchnopleure (PS)³⁻⁵. Toutefois, malgré tous les efforts mis dans ces études, ces résultats demeurent controversés. En effet, la circulation sanguine qui est déjà initiée à ce moment entre l'embryon et le sac vitellin extra embryonnaire complique fortement ces analyses. Néanmoins, les cellules pluripotentes produites migreront et coloniseront le foie fœtal afin de poursuivre leur différenciation⁶. Ce dernier deviendra le site principal d'hématopoïèse jusqu'à la naissance. Les cellules pluripotentes coloniseront enfin la moelle osseuse qui constituera le principal site d'hématopoïèse pour le restant de la vie de l'adulte. D'autres organes, soit la rate et le thymus contribueront à titre secondaire à l'hématopoïèse adulte⁶. De nombreux facteurs extrinsèques tels que

les interactions entre les facteurs de croissance et leur récepteur membranaire ainsi que des facteurs intrinsèques tels que la présence de facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de la différenciation hématopoïétique⁷.

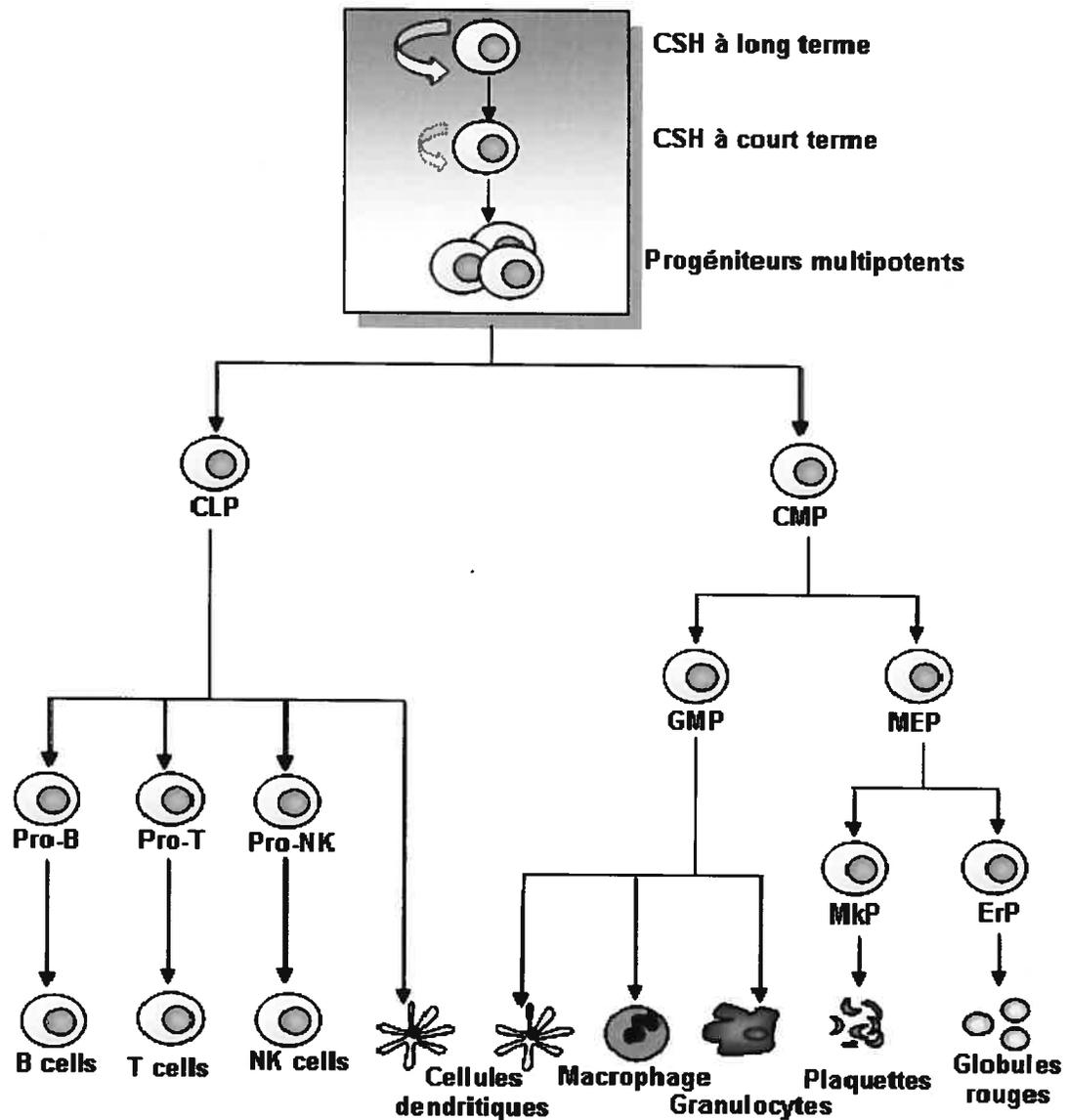


Figure 1.1 Représentation schématique de la hiérarchie hématopoïétique
Adapté de Reya T. *Nature* 414, 105 (2001)⁸

1.2 Les cellules souches hématopoïétiques

Ainsi, toutes les cellules sanguines matures découlent d'une petite population de cellules pluripotentes au sommet de la hiérarchie hématopoïétique. Ce sont les cellules souches hématopoïétiques (CSHs). Ces cellules peuvent être définies fonctionnellement comme étant capable de reconstituer un organisme à long terme et de se différencier dans toutes les lignées hématopoïétiques⁹. Les expériences fort élégantes réalisées par Till et McCulloch furent parmi les premières à apporter des évidences sur les propriétés des CSHs^{10, 11}. Ce groupe fut en mesure de démontrer la présence d'un type de cellules dans la moelle osseuse qui lorsque transplantées dans un receveur myélosupprimé étaient capables de générer des nodules dans la rate du receveur. Ces unités formant des colonies dans la rate (CFU-S) étaient d'origines clonales¹¹⁻¹³ et généralement capable de former des colonies secondaires lorsque re-transplantées. Ces CFU-S furent initialement considérées à tort comme étant des CSHs, mais on sait maintenant qu'elles sont généralement des progéniteurs engagés dans la voie de différenciation myéloïde^{14, 15}. Néanmoins, ces premières études ont été pionnières et allaient aider à la caractérisation fonctionnelle des CSHs.

Depuis, de nombreux efforts ont été investis dans l'identification de marqueurs permettant d'isoler cette précieuse population¹⁶. Une combinaison de marqueurs positifs tels que Sca1 et c-kit et de marqueurs de sélection négative tels que CD38, Mac-1, Gr-1 CD8, B220, CD3 et CD4 permettent aujourd'hui d'enrichir fortement les cellules de moelle osseuse en cellules de potentiel plus primitif¹⁷. Plus récemment, le groupe de Morrison a utilisé une combinaison des récepteurs SLAM afin de rigoureusement discriminer les progéniteurs des CSHs¹⁸.

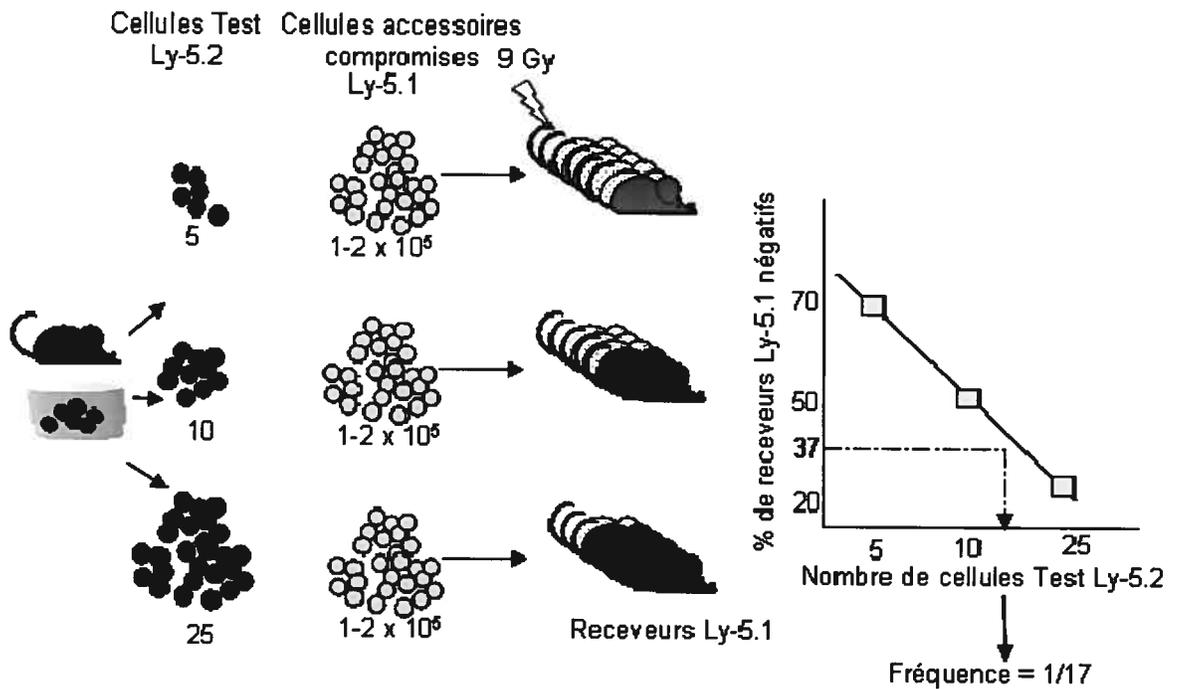


Figure 1.2 Représentation schématique d'un essai CRU permettant de quantifier le nombre de CSHs dans une population test. Un nombre décroissant de cellules test provenant d'une culture ou d'une souris différant des cellules du receveur par le marqueur congénique Ly-5.2 est transplanté en combinaison avec un nombre fixe de cellules accessoires dans des souris préalablement irradiées. Après 16 semaines, le sang périphérique de ces souris est analysé. On considère que les CSHs du donneur ont contribué à la reconstitution d'une souris lorsqu'on retrouve plus de 1% des cellules provenant du donneur dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes. À l'aide de la loi de Poisson, la fréquence de CSHs dans la population test est déterminée. Adapté de Coulombel L. *Oncogene* **23**, 7210 (2004)¹⁹

Pourtant, l'étude des CSHs repose toujours sur une définition fonctionnelle. Le seul moyen de quantifier et d'évaluer la présence réelle de CSHs dans une culture ou dans un organisme repose donc sur un essai fonctionnel. Un des essais standards

est le CRU, pour unité de repopulation compétitive^{19, 20} (Figure 1.2). Dans cet essai, une population test de cellules de moelle osseuse est transplantée à dilution limite en combinaison avec un nombre fixe de cellules accessoires dans des souris préalablement irradiées. Les cellules du donneur diffèrent généralement des cellules du receveur et des cellules accessoires par le marqueur congénique Ly-5.1 et Ly-5.2. Seize semaines après la transplantation, le sang périphérique des souris transplantées est analysé. On considère que les CSHs du donneur ont contribué à la reconstitution d'une souris lorsqu'on retrouve plus de 1% des cellules provenant du donneur dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes. À l'aide de la loi de Poisson, on peut alors évaluer la fréquence de CSHs présente initialement dans la population test¹⁹.

1.3 L'auto-renouvellement des CSHs et son implication clinique

La capacité des CSHs de s'auto-renouveler et de générer toutes les cellules sanguines est à la base de leur utilisation clinique dans les greffes de moelle osseuse. Le système hématopoïétique d'un receveur est alors reconstitué grâce aux cellules souches se trouvant dans la moelle osseuse du donneur permettant ainsi de guérir certains désordres du système hématopoïétique tels que les leucémies²¹. Depuis leur première utilisation²², des efforts constants ont été fournis pour identifier des méthodes permettant d'augmenter le nombre de cellules souches *in vitro* et *in vivo* ce qui permettrait d'envisager de nouvelles applications thérapeutiques. Notamment, une approche qui suscite beaucoup d'intérêt est l'utilisation des cellules souches de sang de cordon. Toutefois, cette méthode est présentement limitée au traitement de l'enfant étant donné le faible nombre de CSHs disponible dans cette source. Des conditions de culture favorisant l'expansion de ces dernières permettraient d'envisager leur utilisation chez l'adulte. De plus, les faibles niveaux initiaux de CSHs peuvent limiter la possibilité d'utiliser des thérapies géniques où les modifications dépendent d'une infection rétrovirale

qui entraîne généralement une forte perte en CSH²³. Ainsi, des méthodes permettant d'augmenter le nombre total ainsi que le nombre de cellules souches en cycle²³ favoriseraient la thérapie génique²¹.

La compréhension des conditions favorisant l'auto-renouvellement des CSHs est donc d'une grande importance clinique. Plusieurs groupes ont tenté d'optimiser les conditions de culture en utilisant différents cocktails de facteurs de croissance²⁴. Ces études ont été peu concluantes quant au degré d'expansion atteint. Toutefois, elles ont permis de démontrer qu'il était bien possible d'obtenir une expansion des CSHs en culture, sans toutefois diminuer leur potentiel de différenciation et d'auto-renouvellement²⁵. De nombreuses molécules impliquées dans le développement de l'embryon telles que Wnt, Sonic Hedgehog et Notch ont aussi été identifiées comme étant des régulateurs de l'auto-renouvellement des CSHs et leurs utilisations dans différents modèles ont permis d'atteindre des niveaux significatifs d'expansion²⁴. Tous ces résultats démontrent néanmoins une grande complexité dans la régulation du processus d'auto-renouvellement.

2. HOXB4, un régulateur de l'auto-renouvellement des CSHs

2.1 Les gènes *Hox* comme régulateur de l'hématopoïèse normale et leucémique

Les gènes *Hox* appartiennent à une famille évolutive de gènes contenant une séquence de 180 paires de bases (pb) fortement conservée nommée homéobox²⁶. Cette séquence code pour un domaine de 60 acides aminés, l'homéodomaine, formant une structure nommée hélice-tour-hélice, permettant d'interagir avec l'ADN génomique. Chez les mammifères, les 39 membres de cette famille sont divisés en quatre groupes (*Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc* et *Hoxd*) occupant chacun un chromosome

différent et dont les 9 à 11 membres respectifs sont organisés de façon colinéaire (Figure 1.3)²⁷. Leur découverte grâce à l'étude des mutations homéotiques chez la drosophile^{28, 29} a permis d'étudier leur rôle dans la détermination du destin cellulaire de l'embryon en développement et plus particulièrement dans le développement axial de ce dernier³⁰.

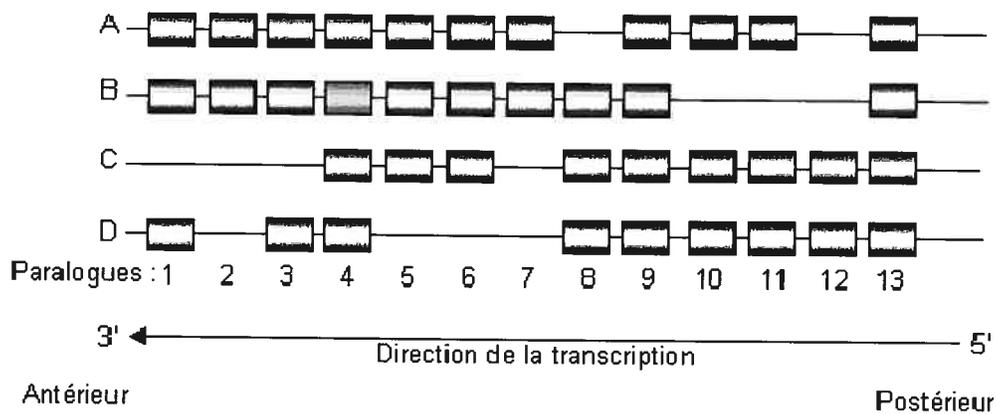


Figure 1.3 Représentation schématique de l'organisation chromosomique des gènes *Hox* de mammifères. Les 13 paralogues sont identifiés au bas de la figure et les 4 groupes sont identifiés à la gauche. Dans le système hématopoïétique, l'expression des gènes situés les plus en 3' du groupe est restreinte aux cellules les plus primitives de la hiérarchie hématopoïétique. Adapté de Sauvageau G. *Hématologie* 3, 123 (1997)³¹

Souvent confinés à leur rôle dans le développement, les études d'Adams et de ces collègues en 1988 ont mis en relief une fonction possible des gènes *Hox* dans l'hématopoïèse étant donné l'expression de certains dans des cellules hématopoïétiques³². Des études plus approfondies ont par la suite montré que de façon générale, les cellules les plus primitives de la hiérarchie hématopoïétique expriment la plupart des gènes *Hox* des groupes A, B et C et qu'il y a diminution de leur expression au fur et à mesure que la différenciation se fait³¹. Les gènes situés les plus en 3' du groupe sont très sensibles à cette diminution et leur expression

est donc particulièrement restreinte aux cellules les plus primitives^{31, 33-36}. L'expression aberrante de certains gènes *Hox* chez des patients atteints de leucémie et leur implication dans certaines translocations telles que NUP98-HOXA9 renforcent une implication de ces gènes dans le processus d'hématopoïèse³⁷.

Depuis, plusieurs études fonctionnelles ont été réalisées afin de clarifier le rôle des *Hox* dans l'hématopoïèse. Certains groupes ont employés des approches par anti-sens^{38, 39}, d'autres des analyses de souris knock-out⁴⁰⁻⁴⁴ et enfin certains ont employés une technologie de transfert de gène par l'intermédiaire de vecteurs rétroviraux⁴⁵⁻⁴⁸ (Figure 1.4). Le principe de cette dernière approche repose sur l'infection des cellules de moelle osseuse de façon à surexprimer un gène *Hox* en particulier pour ensuite étudier son effet après transplantation des cellules de moelle infectées dans une souris receveuse préalablement irradiée. La surexpression des gènes *Hox* dans les cellules de moelle osseuse et leur transplantation dans des souris engendrent généralement des désordres du système hématopoïétique et est associée avec une transformation leucémique^{49, 50}. Contrairement aux autres gènes *Hox*, la surexpression d'*HOXB4* dans des cellules de moelle osseuse n'entraîne pas de leucémie chez les souris préalablement transplantées avec ces cellules⁴⁶. Étant donné que son expression normale est restreinte aux cellules les plus primitives de la hiérarchie hématopoïétique, l'étude d'*HOXB4* est d'autant plus intéressante.

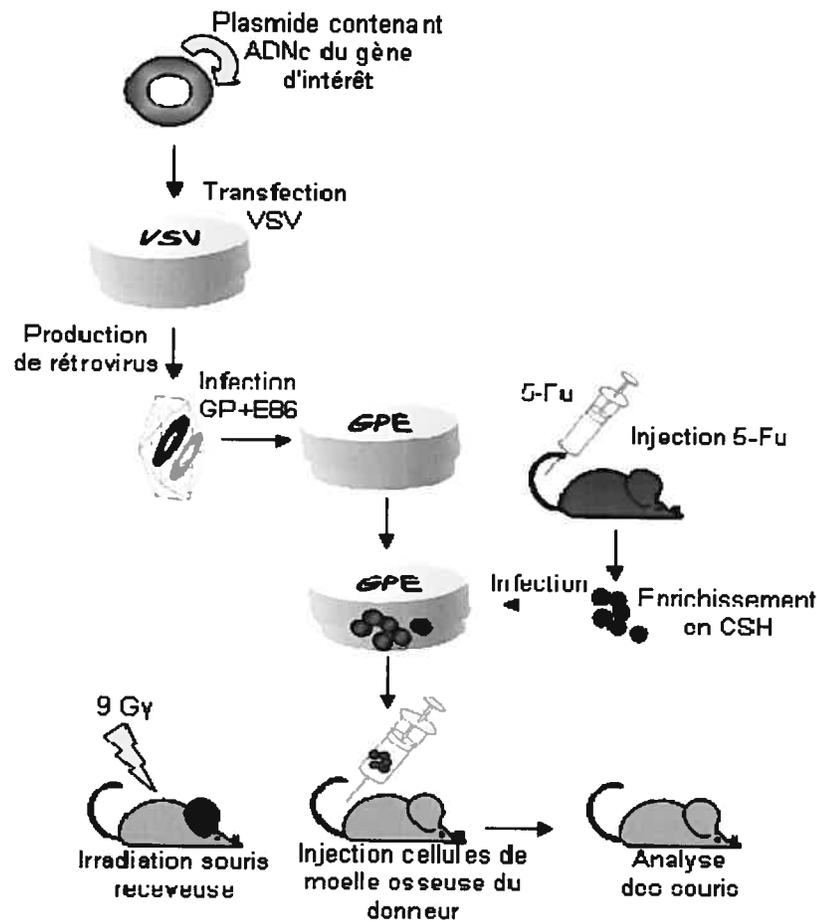


Figure 1.4 Représentation de la stratégie de transfert de gène par l'intermédiaire de vecteurs rétroviraux. Un plasmide contenant l'ADNc d'un gène d'intérêt est transfecté dans les cellules productrices de rétrovirus amphotropiques VSV. Les rétrovirus amphotropiques contenant l'ADNc du gène d'intérêt serviront à infecter les cellules productrices de rétrovirus écotropiques GP+E86. Les cellules de moelle osseuse isolées à partir de souris préalablement injectées au 5-Fu, afin d'enrichir en CSH, sont cocultivées en présence des cellules productrices de rétrovirus écotropiques. Les cellules de moelle osseuse surexprimant maintenant le gène d'intérêt sont transplantées dans des souris préalablement irradiées. Seize semaines après la transplantation, la reconstitution des différents compartiments hématopoïétiques est analysée.

2.2 HOXB4, un facteur d'expansion des CSHs *in vivo*

Ainsi, les souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse modifiées de façon à surexprimer HOXB4 sont viables et elles ne développent aucune anomalie du système hématopoïétique⁴⁶. L'analyse des différents compartiments hématopoïétiques de ces souris indique une reconstitution à des niveaux physiologiques du nombre et du type de cellules matures dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes⁴⁶. Essentiellement, les profils d'intégrations rétrovirales illustrent que les cellules souches surexprimant HOXB4 sont capables de reconstituer les deux lignées suggérant que leur potentiel de différenciation est conservé. Ces mêmes profils dénotent la présence de mêmes clones dans plus d'une souris transplantée indiquant que leur potentiel d'auto-renouvellement est aussi intact. Afin d'évaluer la reconstitution des niveaux physiologiques du pool de CSHs, la moelle osseuse des souris primaires a été transplantée dans des souris secondaires en utilisant un essai CRU précédemment décrit.

Habituellement, lors d'une greffe de moelle osseuse, les différents compartiments hématopoïétiques sont reconstitués. Toutefois, suite à la transplantation, le pool de cellules souches (Figure 1.5A) atteint généralement des valeurs correspondant à 10% des niveaux physiologiques⁵¹⁻⁵³ (Figure 1.5B). Bien que des études aient tenté d'expliquer ce phénomène^{51, 54, 55} les mécanismes impliqués sont encore méconnus.

Par ailleurs, la quantification du pool de CSH des souris primaires transplantées avec des cellules de moelle surexprimant HOXB4 démontre que ces cellules ont une capacité d'expansion *in vivo* permettant de reconstituer entièrement le pool de CSH à des niveaux physiologiques sans toutefois les dépasser (Figure 1.5C). D'autres études ont démontré que cette reconstitution est stable et maintenue pour la vie de l'animal⁵⁶. De plus, elle surviendrait très rapidement après la

transplantation⁵⁷. Enfin, tous ces résultats démontrent que la surexpression d'HOXB4 induit une expansion *in vivo* des CSHs jusqu'à 1000 fois et que ces cellules sont toujours sensibles aux mécanismes de régulation présents à l'intérieur de l'organisme.

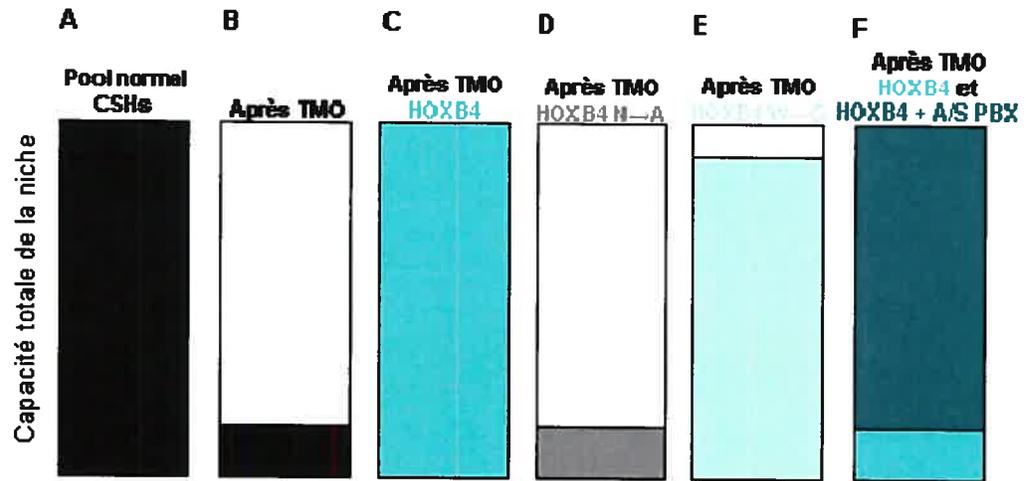
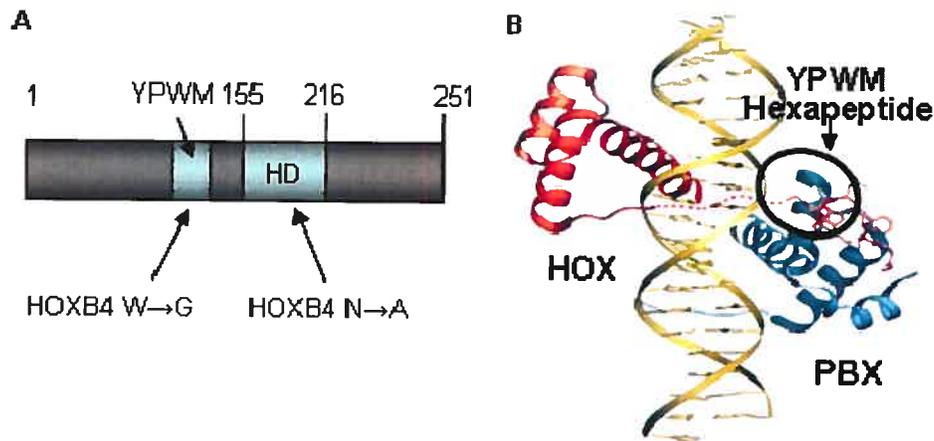


Figure 1.5 Régulation de la reconstitution du pool de CSH suivant une greffe de moelle osseuse. (A) Représentation du pool physiologique de CSHs. (B) Suivant une transplantation de moelle osseuse (TMO), le pool de CSHs est régénéré à des valeurs ne dépassant pas 10% des niveaux physiologiques, soient les niveaux précédant une transplantation. (C) Les cellules souches modifiées de façon à surexprimer HOXB4 ont la capacité de reconstituer entièrement la niche sans toutefois dépasser les niveaux physiologiques. (D) Les cellules souches modifiées de façon à surexprimer le mutant HOXB4 N→A sont incapables de reconstituer la niche (E) Les cellules souches modifiées de façon à surexprimer HOXB4 W→G sont capables de reconstituer la niche. (F) Les cellules souches modifiées de façon à surexprimer HOXB4 et un A/S pour PBX1b sont plus compétitives que les cellules surexprimant HOXB4 et sont toujours sensibles aux mécanismes régulant la niche.



1.6 Représentation schématique de la protéine HOXB4 et de son interaction avec le cofacteur PBX. (A) Représentation des domaines YPWM et de l'homéodomaine de la protéine HOXB4 sauvage. Représentation du mutant HOXB4 W→G incapable de collaborer avec le cofacteur PBX et représentation du mutant HOXB4 N→A incapable d'interagir avec l'ADN seul ou en collaboration avec PBX. (B) L'interaction entre les Hox et le cofacteur PBX requiert un domaine contenant l'hexapeptide YPWM. Adapté de Piper et al. *Cell* **82**, 109 (1999)⁵⁸

2.2.1 HOXB4 et l'interaction à l'ADN

Il est généralement admis que les protéines Hox agissent à titre de facteur de transcription. Toutefois, l'effet d'HOXB4 sur les CSHs se produit en présence d'une surexpression de la protéine. Afin d'apporter des indices sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expansion des CSHs induit par HOXB4, une première étude a tenté de déterminer si HOXB4 avait besoin de sa capacité de liaison à l'ADN afin d'induire une expansion. Il a été montré que lorsque l'asparagine 51 de l'homéodomaine d'HOXB4 est remplacé par une alanine⁵⁹, ce mutant (HOXB4 N⁵¹→A) est incapable de lier l'ADN seul et en coopération avec le cofacteur PBX (Figure 1.6A). Des cellules de moelle osseuse surexprimant ce mutant ont été utilisées dans des essais CRU afin d'évaluer si la forme HOXB4

N⁵¹→A était capable d'induire tout comme la protéine sauvage une expansion *in vivo* des CSHs⁶⁰. Les résultats de cette étude indiquent que ce mutant ne confère pas aux CSHs la capacité de reconstituer la niche et n'entraîne aucune expansion des CSHs *in vivo*⁶⁰ (Figure 1.5D). Par conséquent, ceci suggère qu'HOXB4 nécessite son domaine de liaison à l'ADN afin d'induire une expansion des CSHs et que son effet serait dépendant de la régulation de gènes cibles.

2.2.2 PBX, un cofacteur des gènes *Hox*

Enfin, les protéines *Hox* ont généralement besoin de la présence de cofacteur pour augmenter leur spécificité^{61, 62} et leur affinité^{63, 64} de liaison à l'ADN. Un cofacteur connu d'HOXB4 est la protéine à homéodomaine PBX. Les protéines *Hox* provenant des paralogues 1 à 10 lieraient l'ADN de façon coopérative avec les protéines PBX via un hexapeptide (YPWM) situé en N-terminal de l'homéodomaine des protéines *Hox*⁶¹ (Figure 1.6A et B). Le mutant HOXB4 W¹⁴⁹→G où le tryptophane 149 de l'hexapeptide est remplacé par une glycine est incapable de lier l'ADN en collaboration avec PBX⁶³, mais peut toujours lier l'ADN seul (Figure 1.6A). Ce mutant a été utilisé dans des essais CRU afin de tester si la collaboration d'HOXB4 avec PBX est nécessaire pour induire une expansion des CSHs⁶⁰. On observe, lors de transplantations en série réalisées à l'aide de souris préalablement transplantées avec des cellules de moelle osseuse surexprimant le mutant HOXB4 W¹⁴⁹→G, que le nombre de CSHs atteint des niveaux physiologiques normaux (Figure 1.5E). Cette reconstitution est toutefois un peu plus faible que celle obtenue avec une surexpression de la protéine sauvage. Par ailleurs, les analyses d'expression protéique ont indiqué que ce mutant est exprimé à des niveaux plus faibles que la protéine sauvage dans les cellules de moelle osseuse. Ceci suggère une importance des niveaux de protéine pour induire une expansion des CSHs. Par conséquent, HOXB4 ne requiert pas une collaboration directe avec le cofacteur PBX afin d'induire une expansion des CSHs.

Enfin, la relation entre la protéine HOXB4 et son cofacteur a été évaluée grâce à une autre stratégie. Cette fois, les niveaux de la protéine endogène PBX1b ont été diminués par une approche anti-sens⁶⁵. Des cellules de moelle osseuse modifiées de façon à surexprimer HOXB4 et de façon à diminuer l'expression de PBX1b ont été évaluées quant à leur potentiel d'expansion *in vivo*⁶⁵. Il a été observé que ces cellules étaient capables de reconstituer tous les compartiments hématopoïétiques à des niveaux normaux. Les souris transplantées demeurent viables et ne développent pas de désordre du système hématopoïétique. Étonnamment, les cellules souches surexprimant HOXB4 et un A/S pour PBX1b sont aussi capables de reconstituer le pool de cellules souches à des niveaux physiologiques sans les dépasser et lorsqu'elles sont transplantées en compétition avec des cellules surexprimant seulement HOXB4 elles sont 20 fois plus compétitives que ces dernières⁶⁵ (Figure 1.5F).

Ainsi, PBX ne semble pas être nécessaire pour qu'HOXB4 induise une expansion des CSHs. De plus, une diminution des niveaux de PBX semble potentialiser l'effet d'HOXB4 sur les CSHs.

2.3 HOXB4, un facteur d'expansion des CSHs *in vitro*

Les résultats décrits précédemment montrent la capacité d'expansion *in vivo* que confère une surexpression d'HOXB4 dans les CSHs. Dans les sections précédentes les enjeux cliniques découlant de la possibilité d'augmenter le nombre de CSHs *in vitro* ont été mis en relief. Les résultats obtenus *in vivo* laissaient présager qu'une surexpression d'HOXB4 permettrait de soutenir une expansion des cellules souches *in vitro* dans des conditions où les mécanismes régulant la capacité de la niche sont absents. Des essais CRU ont permis d'évaluer la quantité de CSHs présente sur une période de 14 jours dans une culture de moelle osseuse modifiée de façon à surexprimer HOXB4⁶⁶. Il a été déterminé que

l'expression d'HOXB4 induit une expansion des CSHs *in vitro*. En effet, après 14 jours de culture, on observe une expansion de 40 fois au-dessus des niveaux initiaux de CSHs et une expansion de 1000 fois par rapport aux conditions contrôles. Aussi, malgré la période intensive de culture, ces cellules souches ont conservé leur capacité de repopulation à long terme. De plus, elles sont aussi capables d'expansion *in vivo* et leur potentiel de différenciation n'est pas affecté⁶⁶. Cette étude permet d'envisager d'utiliser HOXB4 à titre de facteur de croissance des CSHs.

2.3.1 La protéine HOXB4 comme facteur de croissance des CSHs

Cependant, les résultats présentés précédemment dépendent d'une infection rétrovirale. Afin de prévenir les dommages irréversibles causés par une intégration stable d'HOXB4 dans le génome des cellules, il serait avantageux de développer une approche permettant d'utiliser la protéine HOXB4 à titre de facteur de croissance des CSHs si on veut l'utiliser chez l'humain. Afin de tester cette possibilité, les membres de mon laboratoire ont utilisé la protéine recombinante HOXB4 fusionnée à la protéine transactivatrice TAT du HIV qui favorise l'entrée dans les cellules^{67, 68}. Cette protéine recombinante capable de pénétrer dans les cellules hématopoïétiques a été ajoutée au milieu de culture toutes les 3 heures pour une période de 4 jours. La quantité de CSHs a été évaluée à différents intervalles de temps. L'ajout de cette protéine a permis d'augmenter le nombre de CSHs en culture de 4 à 6 fois au-dessus des niveaux initiaux et de 8 à 20 fois par rapport aux niveaux présents dans une population contrôle. Ces CSHs demeurent capables de différenciation dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes une fois transplantées et elles sont capables de repopulation à long terme.

Un autre groupe a tiré avantage de la capacité des protéines Hox à traverser passivement les membranes cellulaires⁶⁹. En effet, cette propriété de transfert est

une caractéristique conférée par la troisième hélice de l'homéodomaine⁷⁰. Ce groupe a donc conçu une lignée cellulaire stromale MS-5 modifiée de façon à sécréter la protéine HOXB4 en permanence. Des cellules de sang de cordons ont été cocultivées en présence de cette lignée cellulaire et le nombre de SRCs a été évalué. Les SRCs correspondent aux cellules de la hiérarchie hématopoïétiques humaines les plus primitives identifiables grâce à des essais fonctionnels. Elles correspondent aux cellules capables de reconstituer des souris NOD-SCID (*nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency*). Cette approche a démontré que les cultures cellulaires mises en présence de la protéine HOXB4 contenaient 2,5 fois plus de cellules capables de reconstitution par rapport à la valeur initiale. De plus, ces SRCs ne perdaient pas leur potentiel de différenciation. Ainsi, il serait possible d'augmenter le nombre de CSHs grâce à la protéine HOXB4 sans avoir recours à une infection rétrovirale.

2.3.2 Évidence de l'action d'HOXB4 sur les CSHs humaines

La dernière étude présentée suggère que la protéine HOXB4 est aussi capable d'induire une expansion des CSHs humaines. Jusqu'à maintenant d'autres études vont dans ce sens. Par exemple, la surexpression d'HOXB4 grâce à une infection rétrovirale dans des cellules de sang de cordon a permis d'augmenter de 4 fois le nombre de cellules capables de reconstituer des souris NOD-SCID⁷¹. D'autres groupes ont rapporté que la surexpression d'HOXB4 permettait aussi d'augmenter le nombre de cellules primitives dans les souris NOD-SCID, mais que ces cellules avaient un pouvoir de différenciation altéré⁷². Toutefois, il est difficile d'interpréter ce résultat puisque dans cette étude, HOXB4 est exprimé sous forme d'une protéine de fusion avec la protéine GFP. Il est donc possible que l'activité de la protéine sauvage soit affectée par l'ajout de la protéine GFP. Finalement, des études préliminaires réalisées grâce à la protéine recombinante TAT-HOXB4 semblent indiquer qu'elle serait capable d'induire une expansion des CSHs

mobilisées dans le sang périphérique (DC Roy, G Krosl et G Sauvageau, résultats non publiés). Bien entendu, de nombreuses expériences doivent être réalisées afin de bien caractériser la fenêtre thérapeutique de cette protéine recombinante.

3. Bases moléculaires du mécanisme d'action des Hox

3.1 Gènes cibles des Hox

Les protéines Hox répriment et activent la transcription d'un vaste réseau de gènes cibles grâce à leur interaction avec l'ADN seul ou en collaboration avec des cofacteurs. Les cibles de ces facteurs de transcription sont impliquées dans des processus très variés tels que l'adhésion, la division cellulaire, la mort cellulaire et le mouvement cellulaire⁷³. Jusqu'à ce jour, une trentaine de gènes ont été identifiés comme étant des cibles directes d'une protéine Hox⁷³ dans différents organismes. Ces cibles peuvent être elles-mêmes des facteurs de transcription ou impliquées dans des voies de signalisation classiques. D'autres cibles sont des gènes réalisateurs et leur expression permet à la cellule d'acquérir son identité propre⁷⁴. Par exemple, dans le système hématopoïétique la surexpression de la protéine HOXA10 dans des cellules myélomonocytiques entraîne une différenciation et un arrêt de prolifération⁷⁵. Cet arrêt serait dépendant d'une activation du gène *Cdkn1a* par HOXA10⁷⁵. De plus, plusieurs cibles directes des protéines Hox sont aussi des Hox et ces boucles d'autorégulation seraient très utiles à la formation des segments lors du développement de l'embryon^{76, 77}. D'ailleurs, il est très intéressant de noter que des études récentes ont démontré que les gènes *Hox* seraient d'importantes cibles des miRNA^{78, 79}. Ceci augmente grandement la complexité de la régulation de l'expression des gènes *Hox* et par le fait même de la régulation de leur cible.

Plus spécifiquement, quelques cibles d'HOXB4 ont été identifiées jusqu'à ce jour. Des essais de transactivation *in vitro* suggèrent une faible action de répression de la transcription par HOXB4 (M. Featherstone, observations non publiés). Quelques cibles semblent être régulées de la sorte. En effet, une répression de la transcription du gène *X-Rap1* par HOXB4 dans le développement du *Xenopus* a été rapportée⁸⁰ ainsi qu'une répression de c-MYC dans la lignée HL-60^{81, 82}. Il est intéressant de mentionner qu'une augmentation du nombre de CSHs dans la moelle osseuse a été notée chez les souris c-Myc knock-out⁸³. Toutefois, une activité d'activation de la transcription a été notée chez le *Xenopus* où le gène *Flash* est régulé positivement par HOXB4 dans la notocorde des embryons après la neurulation⁸⁴. Ce gène n'est toutefois pas impliqué pour le moment dans le processus d'auto-renouvellement, mais ce résultat permet de relier HOXB4 au processus de mort cellulaire. Le gène *Iroquois5* du *Xenopus* est aussi régulé positivement par HOXB4⁸⁵. La famille des gènes *lrx* contient des facteurs de transcription à homéodomaine impliqués dans le développement de la plaque neurale^{86, 87}, mais on ne leur connaît aucune implication dans le processus d'auto-renouvellement jusqu'à ce jour.

Des études préliminaires dans le laboratoire ont été réalisées afin d'identifier les cibles d'HOXB4 dans les CSHs. En effet, des analyses d'expression utilisant la plateforme Affymétrie ont été effectuées afin de comparer les profils d'expression de cellules de moelle osseuse en culture surexprimant HOXB4 et des cellules de moelle osseuse d'une population contrôle (résultats non publiés). Étonnamment, les niveaux d'expression du messenger codant pour la protéine prion étaient particulièrement élevés dans la population de cellules surexprimant HOXB4. La forme sauvage de cette protéine est abondamment exprimée dans une variété de tissus, mais sa fonction demeure généralement obscure. Néanmoins, des études récentes ont mis en relief l'implication de cette protéine prion dans le processus

d'auto-renouvellement des CSHs⁸⁸. Ceci laisse entrevoir que les analyses d'expression pourraient être une bonne avenue de recherche pour identifier les cibles d'HOXB4 et par conséquent découvrir de nouvelles molécules impliquées dans l'auto-renouvellement des CSHs. De plus, il est fort probable que certaines des cibles d'HOXB4 soient aussi régulées par HOXA9 puisque cette protéine à homéodomaine possède aussi la capacité d'entraîner une expansion des CSHs²⁴. Toutefois, sa surexpression est associée à une transformation leucémique⁵⁰. Des analyses d'expression ont été réalisées afin d'identifier les cibles d'HOXA9 dans différents modèles⁸⁹⁻⁹¹ et pourront être consultées lors de la recherche des cibles d'HOXB4. De plus, nos analyses d'expression décrites précédemment ont indiqué que les cellules de moelle surexprimant HOXB4 expriment aussi de plus haut niveaux d'*Hoxa9* que la population contrôle.

Par ailleurs, une augmentation des niveaux de CSHs a été rapportée lors d'études réalisées à l'aide d'une surexpression de thrombopoïétine⁹² et d'une forme activée de β -catenin⁹³ où leur expression respective entraînait une augmentation des niveaux endogènes d'HOXB4. Toutefois, les niveaux endogènes d'HOXB4 observés dans ces études sont relativement faibles comparativement aux niveaux de protéine nécessaires pour induire une expansion des CSHs telle qu'observée dans notre laboratoire. Il est donc encore difficile de relier ces voies en amont de l'effet d'HOXB4 sur les CSHs.

3.2 Partenaires protéiques des Hox

Les Hox reconnaissent sensiblement la même séquence d'ADN *in vitro* étant donné la très grande conservation de leur homéodomaine⁹⁴. Cependant, cette séquence est fort répandue dans le génome et elle ne peut expliquer à elle seule la capacité des Hox à réguler leurs cibles spécifiques⁹⁵. Afin d'augmenter leur spécificité^{61, 62} et leur affinité de liaison à l'ADN^{63, 64} les protéines à homéodomaine

interagissent généralement avec des cofacteurs. Les protéines Hox provenant des paralogues 1 à 10 lient l'ADN en collaboration avec les protéines PBX⁶¹ et les protéines Hox des paralogues 9 à 13 interagissent avec les protéines Meis/PREP⁹⁶. De plus, la localisation nucléaire de PBX est dépendante d'une interaction avec Meis1⁹⁷. D'ailleurs, il est à noter que les protéines PBX1 et Meis1 sont impliqués dans le développement du système hématopoïétique^{98, 99}. En étudiant les similarités et les différences entre chacune des séquences des groupes de paralogues, une étude avait déjà montré que la majorité de ces différences sont retrouvées à des positions susceptibles de former des contacts avec d'autres protéines¹⁰⁰. Conséquemment, ces résultats mettent en relief l'importance des interactions protéine-protéine pour une régulation de l'activité des Hox. Néanmoins, jusqu'à ce jour, peu de nouveaux partenaires des Hox ont été identifiés. Outre les cofacteurs PBX et Meis, certains Hox interagissent directement avec CBP/p300¹⁰¹ bloquant ainsi son activité histone acétyltransférase. De plus, l'implication de CBP/p300 dans le processus d'auto-renouvellement a aussi été soulignée¹⁰². D'autres études ont permis d'identifier la liaison de certains Hox avec des protéines de fonction variée¹⁰³⁻¹⁰⁶. Une étude récente a permis de montrer l'interaction de protéines Hox avec l'inhibiteur du cycle cellulaire, geminin¹⁰⁶. L'interaction de geminin avec certains Hox diminue leur affinité de liaison à l'ADN et pourrait interférer avec leur activité d'activation de la transcription de gènes cibles. Ainsi, cette interaction protéine-protéine permettrait de coordonner l'activité des Hox dans le temps en les rendant non disponibles à l'exécution de leur fonction.

Les modifications post-traductionnelles sont aussi des mécanismes employés pour réguler la fonction de certains Hox. Par exemple, la phosphorylation d'une sérine de l'homéodomaine d'HOXA9 par la protéine kinase C entraîne une diminution de la liaison *in vitro* d'HOXA9 à l'ADN et pourrait expliquer le processus de différenciation myéloïde induit par le phorbol-ester¹⁰⁷. Aussi, la phosphorylation de

tyrosine dans l'homéodomaine d'HOXA10 diminuerait son affinité de liaison à l'ADN et par le fait même diminuerait son activité de répression de la transcription de certains gènes cibles¹⁰⁸. Ainsi, la phosphorylation de résidus de l'homéodomaine afin d'augmenter ou de diminuer l'affinité de liaison à l'ADN semble être un mécanisme permettant de réguler le choix des cibles des Hox. Par conséquent, l'interaction des protéines Hox avec des protéines kinases et des protéines phosphatase serait un moyen de contrôler le choix des cibles.

4. Présentation du projet de recherche

4.1 Hypothèses de recherche

Comme il a été présenté, la protéine HOXB4 possède un potentiel clinique remarquable. Afin de l'utiliser éventuellement à sa pleine puissance, il est impératif d'étudier les bases moléculaires de son effet sur les CSHs. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués pourrait permettre d'améliorer les niveaux d'expansion atteints en plus de découvrir de nouveaux facteurs impliqués dans l'auto-renouvellement des CSHs. Conséquemment, une meilleure compréhension du phénomène d'auto-renouvellement pourrait avoir des répercussions non seulement dans le traitement par les cellules souches grâce aux greffes de moelle osseuse, mais aussi dans le traitement plus général du cancer puisque la notion de cellule souche cancéreuse est de plus en plus acceptée⁸.

4.1.1. HOXB4 agirait en tant que facteur de transcription

Tel qu'il a été mentionné précédemment, *HOXB4* possède un domaine de liaison à l'ADN caractéristique des gènes *Hox*. Des études réalisées dans le laboratoire à l'aide d'un mutant ponctuel de l'homéodomaine ont permis de démontrer qu'*HOXB4* nécessite son homéodomaine afin d'exercer son effet sur les CSHs.

Ceci pourrait suggérer qu'HOXB4 agit à titre de facteur de transcription dans les CSHs⁶⁰. Par conséquent, HOXB4 activerait ou réprimerait l'expression de certains gènes cibles régulant ainsi le destin cellulaire d'une CSH en division. Ainsi, HOXB4 entraînerait une expansion des CSHs soit en régulant négativement des gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique soit en régulant positivement des gènes permettant l'auto-renouvellement lors de la division cellulaire.

4.1.2. HOXB4 ferait parti d'un complexe protéique d'auto-renouvellement

Nous savons que le co-facteur PBX régulerait de façon négative l'action d'HOXB4 dans les CSHs⁶⁵. En effet, les études réalisées dans le laboratoire décrite précédemment ont permis de démontrer que non seulement l'interaction avec PBX n'est pas nécessaire pour qu'HOXB4 exerce son effet⁶⁰, mais que l'absence de ce cofacteur dans les CSHs potentialise son effet⁶⁵.

Toutefois, les autres régulateurs protéiques d'HOXB4 demeurent toujours inconnus. Ainsi, les partenaires d'action d'HOXB4 dans les CSHs sont susceptibles d'exercer un rôle capital dans l'identification des gènes cibles dont l'expression doit être régulée par HOXB4. Par conséquent, ceci suggère qu'HOXB4 serait membre d'un complexe protéique d'auto-renouvellement des CSHs.

4.2 Objectifs de recherche

En se basant sur ces deux hypothèses, mon projet de recherche avait donc comme but principal de mettre au point un modèle d'étude des bases moléculaires de l'auto-renouvellement des CSHs induit par HOXB4. Pour y parvenir, j'avais comme premier objectif de faciliter l'analyse des gènes cibles et comme second objectif de générer une stratégie permettant d'identifier les partenaires protéiques d'HOXB4.

4.2.1 Faciliter l'identification des gènes cibles grâce à la génération d'une forme activatrice et répressive de la protéine HOXB4

Une étude chez la mouche utilisant le gène orthologue d'*HOXB4* (*Deformed*) démontre que l'addition d'un domaine de transactivation à la protéine augmente son activité de façon significative¹⁰⁹. Cette étude a permis de mettre en relief le rôle de *Deformed* dans l'activation de la mort cellulaire en régulant l'activité du gène *reaper*. L'addition du domaine d'activation de VP16¹¹⁰ en N-terminal de la protéine *Deformed* induisait un super phénotype du gène cible *reaper*.

En se basant sur cette étude, je voulais concevoir une stratégie qui avait pour but de faciliter une éventuelle recherche des gènes cibles d'*HOXB4*. L'identification des cibles est un défi majeur souvent compliqué par les analyses d'expression qui sont très complexes dans leur interprétation. J'avais donc comme objectif de réaliser une forme activatrice et répressive de la protéine *HOXB4*. En ajoutant le domaine d'activation de VP16 en N-terminal d'*HOXB4*, je voulais évaluer si *HOXB4* induit une expansion des CSHs via une activation ou une répression de gènes cibles. Si l'ajout du domaine d'activation avait comme effet d'entraîner un gain de fonction, l'analyse éventuelle des gènes cibles aurait porté sur les gènes régulés positivement en présence d'*HOXB4*. Enfin, je voulais aussi générer une forme répressive d'*HOXB4* en ajoutant le domaine de répression d'*Engrailed* (EN) de la drosophile^{111, 112} en N-terminal d'*HOXB4*.

4.2.2 Faciliter l'identification des partenaires protéiques d'*HOXB4* grâce à la génération de stratégies de purification

Afin d'identifier les partenaires protéiques d'*HOXB4* lui permettant d'exercer son effet dans les CSHs, j'avais comme second objectif de produire deux approches permettant la purification de la protéine dans des conditions où l'on peut aussi

identifier ses partenaires. La première approche était la purification par affinité en tandem (TAP tag)¹¹³. Enfin, la deuxième approche consistait en une purification par immunoprécipitation utilisant un Flag tag.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1. Stratégie pour générer une forme activatrice et répressive de la protéine HOXB4

1.1 Construction des vecteurs rétroviraux et d'expression

Les vecteurs rétroviraux MSCV-VP16-HOXB4-IRES-GFP (no. 1627) et MSCV-EN-HOXB4-IRES-GFP (no. 1629) ainsi que les vecteurs d'expression pcDNA3-VP16-HOXB4-Flag-psv40-neo^r (no. 1630) et pcDNA3-EN-HOXB4-Flag-psv40-neo^r (no. 1631) ont été générés à l'aide des vecteurs MSCV-HOXB4-IRES-GFP (no. 812) et pcDNA3-HOXB4-Flag-psv40-neo^r (no. 1093 où le vecteur original pcDNA3-psv40-neo^r provient d'Invitrogen) préalablement générés dans le laboratoire. Le domaine d'activation de VP16 a été amplifié à l'aide des amorces sens 5'- gag aga gaa ttc atg gat tcg acg gcc ccc -3' et non sens 5'- gag aga gaa ttc ccc acc gta ctc gtc aat t -3' et le domaine de répression d'*Engrailed* a été amplifié à l'aide des amorces sens 5'- gag aga gaa ttc atg gcc ctg gag gat cgc -3' et non sens 5'- gag aga gaa ttc gga tcc cag agc aga ttt ct -3' permettant d'insérer un site EcoR1 en 5' et 3' de la région codant pour les domaines d'activation et de répression. Les produits de PCR ont été digérés par l'enzyme de restriction EcoR1 et purifiés sur gel avant d'être insérés dans le site EcoR1 du vecteur MSCV-HOXB4-IRES-GFP (no. 812) et pcDNA3-HOXB4-Flag-psv40-neo^r (no. 1093). Cette ligation permet d'ajouter les domaines dans le même cadre de lecture que l'ADNc d'*HOXB4* et plus particulièrement en N-terminal de la protéine. Les quatre constructions ont été séquencées afin de confirmer leur exactitude. Le vecteur d'expression pcDNA3-PBX1b-psv40-neo^r (no. 1094) avait préalablement été généré dans le laboratoire.

1.2 Transcription et traduction *in vitro*

Les protéines HOXB4-Flag, VP16-HOXB4-Flag, EN-HOXB4-Flag et PBX1b ont été produites grâce au système de transcription et de traduction *in vitro* (TNT® Couple Reticulocyte Lysate) et les vecteurs d'expression correspondants (pcDNA3-HOXB4-Flag, pcDNA3-VP16-HOXB4-Flag, pcDNA3-EN-HOXB4-Flag, et pcDNA3-PBX1b).

1.3 Analyse de retard sur gel

L'analyse de retard sur gel permettant de tester la capacité de liaison à l'ADN des protéines de fusion VP16-HOXB4-Flag et EN-HOXB4-Flag a été réalisée telle que mentionnée précédemment¹¹⁴. La sonde correspond à deux oligonucléotides (sens 5'- cga att gat tga tgc act aat tgg ag -3' et non sens 5'- ct cca att agt gca tca atc aat tcg -3') permettant la liaison HOX/PBX. Les protéines utilisées (HOXB4-Flag, VP16-HOXB4-Flag, EN-HOXB4-Flag et PBX1b) ont été produites à l'aide d'un système de transcription et de traduction *in vitro* (TNT® Couple Reticulocyte Lysate). Cette sonde a été marquée aux extrémités à l'aide de $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP pour être ensuite purifiée sur une colonne de Sephadex G-50.

1.4 Génération et maintenance des lignées cellulaires transitoires

Les cellules de mammifères Cos et 293T ont été maintenues dans du DMEM contenant 10% de FCS. Ces cellules ont été transfectées avec les vecteurs d'expression pcDNA3-HOXB4-Flag (1093), pcDNA3-VP16-HOXB4-Flag (1630) et pcDNA3-EN-HOXB4-Flag (1631) à l'aide de calcium phosphate de façon à exprimer la protéine HOXB4-Flag ou les protéines de fusion EN-HOXB4-Flag ou VP16-HOXB4-Flag.

1.5 Génération des cellules productrices de rétrovirus et infection des cellules de moelle osseuse

La lignée productrice de virus amphotropiques VSV (*vesicular stomatitis virus pseudotyped retrovirus packaging cells* 293 GPG) a été maintenue et transfectée telle que précédemment décrit¹¹⁵ de façon à produire des virus contenant l'ADNc d'*HOXB4* ou de *VP16-HOXB4* ou de *EN-HOXB4*. Les soupes rétrovirales ont par la suite servi à l'infection et à la génération des cellules productrices de rétrovirus écotropiques GP+E-86. L'infection des cellules de moelle osseuse a été réalisée telle que décrit antérieurement¹¹⁵. En résumé, des cellules de moelle osseuse dérivées à partir de souris préalablement traitées au 5-Fu (permet de tuer les cellules sanguines matures et d'ainsi faire entrer en cycle les CSHs afin de faciliter leur infection)¹¹⁶ ont été préstimulées dans du milieu DMEM contenant 15% de FCS, 6 ng/mL d'IL-3, 10 ng/mL d'IL-6, 100 ng/mL de SCF, 10 ng/mL de ciproflaxin, 10 ng/mL de gentamicine pour une période de deux jours et co-cultivées pour une période additionnelle de deux jours avec les cellules productrices de rétrovirus GP+E-86 irradiées générant des virus contenant l'ADNc codant pour *HOXB4* sauvage, ou pour les protéines de fusion *VP16-HOXB4* et *EN-HOXB4* ou pour la protéine GFP comme contrôle. La proportion de cellules de moelle osseuse infectées (GFP⁺) a été évaluée grâce à la cytométrie en flux (MoFlo, Cytomation, Fort Collins, CO) un jour après la période de co-culture avec les cellules productrices de rétrovirus GP+E-86.

1.6 Essai de prolifération *in vitro*

Un essai de prolifération *in vitro*⁶⁰ a été initié un jour après la période de co-culture des cellules de moelle osseuse avec les cellules productrices de rétrovirus GP+E-86 en utilisant 3×10^5 cellules de moelle osseuse dans 3 mL de milieu DMEM

contenant 15% de FCS, 6 ng/mL d'IL-3, 10 ng/mL d'IL-6 et 100 ng/mL de SCF. Le nombre de cellules viables a été évalué (négatives au bleu de trypan) tous les deux ou trois jours où elles ont été diluées dans du milieu frais et maintenues à une densité de 1×10^5 cellules/mL.

1.7 Essai de compétition *in vitro*

Un essai de compétition *in vitro*⁶⁰ a été initié un jour après la co-culture des cellules de moelle osseuse avec les cellules productrices de rétrovirus GP+E-86 en utilisant 5×10^5 cellules de moelle osseuse contenant 10% de cellules infectées (GFP⁺) et 90% de cellules de non infectées (GFP⁻) cultivées dans 5 mL de milieu DMEM contenant 15% de FCS et 6 ng/mL d'IL-3. Pour chacune des conditions (HOXB4 sauvage, VP16-HOXB4, EN-HOXB4 et GFP en contrôle) le ratio entre les cellules GFP⁺ et GFP⁻ a été évalué par cytométrie en flux (MoFlo, Cytomation, Fort Collins, CO) tous les deux ou trois jours où elles ont été diluées dans du milieu frais et maintenues à une densité de 1×10^5 cellules/mL.

1.8 Analyse des CFCs

La fréquence des CFCs a été évaluée au jour 0 et au jour 9 de l'essai de prolifération *in vitro* en déposant une fraction des cultures de cellule de moelle osseuse (HOXB4 sauvage, VP16-HOXB4, EN-HOXB4, GFP en contrôle) en milieu semi solides (méthylcellulose contenant 10 ng/mL d'IL-3, 10 ng/mL d'IL-6, 50 ng/mL de SCL et 5 U/mL d'érythropoïétine). Le nombre total de colonies (GFP⁺ et GFP⁻) ainsi que le nombre de colonies infectées (GFP⁺) a été évalué 7 jours après l'initiation des cultures en milieu semi solides.

1.9 Analyse par western blot

Les analyses par western blot ont été réalisées comme relatée précédemment⁵⁹ à partir de 30 µg de lysat protéique total de cellules Cos, de 20 µg de lysat protéique total de cellules de moelle osseuse, de 35 µg de lysat protéique provenant des fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules 293T et de 5 µL de protéines traduites *in vitro*. La concentration des protéines a été déterminée par un essai BCA tel que suggéré par le distributeur (Sigma, St. Louis, Mo). Les anticorps primaires utilisés sont l'anti-Flag de souris (Stratagene), l'anti-HOXB4 de rat (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City) et l'anti-VP16 de lapin (BD biosciences) Les anticorps secondaires utilisés sont l'anti-souris de lapin, l'anti-rat de chèvre et l'anti-lapin de chèvre couplés à la peroxydase de raifort (Santa Cruz Biotechnology).

1.9.1 Extraits protéiques totaux

Les extraits protéiques totaux ont été réalisés tel que mentionné⁵⁹. Les cellules ont été lavées deux fois dans du tampon phosphate salin (PBS) et lysées sur glace pendant 30 min dans du tampon RIPA (10mM Tris-HCl pH8, 140mM NaCl, 0,025% NaN₃, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 1% acide deoxycholique) contenant des inhibiteurs de protéases (2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin). Les lysats protéiques ont été nettoyés par une ultracentrifugation de 20 min à 40,000 rpm à 4°C et les surnageants ont été conservés en tant que lysats protéiques totaux.

1.9.2 Extraits protéiques des fractions nucléaires et cytoplasmiques

Les extraits protéiques des fractions nucléaires et cytoplasmiques ont été réalisés tels que mentionnés¹¹⁷. Les cellules ont été lavées deux fois dans du tampon

phosphate salin (PBS) et l'équivalent de 2×10^7 cellules ont été lysées sur glace pendant 10 min dans 600 μ L de tampon de lyse cytoplasmique (10mM HEPES pH 7,9, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA) contenant des inhibiteurs de protéases (2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/mL aprotinin et 1 μ g/mL leupeptin). Les noyaux ont été séparés à l'aide d'une seringue de 26-gauge. Les noyaux ont été récoltés grâce à une centrifugation de 5 min à 500 rpm où les surnageants ont été conservés en tant que fractions cytoplasmiques. Les noyaux restants ont été lysés dans 60 μ L de tampon de lyse nucléaire (20mM HEPES pH 7,9, 400mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 5% glycérol) contenant des inhibiteurs de protéases (2mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/mL aprotinin et 1 μ g/mL leupeptin). Les lysats nucléaires ont été agités vigoureusement pendant au moins 1 h à 4°C puis centrifuger pendant 2 min à 12 000 rpm. Les surnageants ont été nettoyés par une ultracentrifugation de 20 min à 40,000 rpm à 4°C et les surnageants ont été conservés en tant que fractions nucléaires.

2. Stratégie pour l'identification des partenaires protéiques d'HOXB4

2.1 Construction des vecteurs rétroviraux

Les vecteurs rétroviraux MSCV-TAP-pgk-GFP (no.1510), MSCV-HOXB4-TAP-pgk-GFP (no. 1390), MSCV-HOXB4-Flag-IRES-GFP (no. 1171) ont été générés préalablement par des membres du laboratoire.

2.2 Génération des cellules productrices de rétrovirus, infection des cellules de moelle osseuse, infection et maintenance des lignées cellulaires stables

La lignée productrice de rétrovirus amphotropiques VSV a été transfectée de façon à produire des virus contenant l'ADNc codant pour le peptide TAP, la protéine HOXB4-TAP et la protéine HOXB4-Flag. Les cellules productrices de rétrovirus écotropiques GP+E-86 ont été générées et l'infection des cellules de moelle osseuse par co-culture sur les cellules GP+E-86 a été réalisée telle que décrit à la section 1.5.

Les lignées cellulaires BaF/3 et 293T ont été cultivées en présence des soupes rétrovirales de VSV afin de les infecter pour qu'elles expriment stablement soit le peptide TAP ou la protéine HOXB4-TAP. La lignée cellulaire K562 a été cultivée en présence des soupes rétrovirales afin de l'infecter pour qu'elle exprime stablement la protéine HOXB4-Flag. Le pourcentage d'infection pour chacune des lignées a été déterminé par cytométrie en flux (MoFlo, Cytomation, Fort Collins, CO) et les cellules infectées (GFP⁺) ont été triées. Les cellules 293T ont été maintenues dans du milieu DMEM contenant 10% de FCS, les cellules BaF/3 ont été maintenues dans du milieu RPMI contenant 10% de FCS et 250 ng/mL d'IL-3 et les cellules K562 ont été maintenues dans du milieu RPMI contenant 10% de FCS.

2.3 Essai de compétition *in vitro*

Les essais de compétition *in vitro*⁶⁰ ont été réalisés tel que décrit à la section 1.7 afin de déterminer si les protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag étaient fonctionnelles.

2.4 Extraits protéiques et purification par affinité en tandem (TAP tag)

2.4.1 Préparation des extraits protéiques totaux

Ce protocole a été gracieusement fourni et optimisé par le laboratoire du Dr Benoit Coulombe¹¹⁸. Les cellules BaF/3 ou 293T ont été lavées à deux reprises dans du tampon phosphate salin (PBS). Elles ont été culottées et plongées dans l'azote liquide pour être conservées à -80°C. Afin de procéder à une purification, les culots cellulaires accumulés (l'équivalent de 6g de cellules) ont été décongelés à température pièce et 4/3 volumes (mL/g) de tampon A (10mM HEPES pH 7,9, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,5mM DTT) contenant des inhibiteurs de protéases (0,5mM 4-(2-Aminoethyl)benzenesulphonyl fluoride (AEBSF) et 1 tablette Complete EDTA-free/10mL, Roche) ont été ajoutés. Les culots ont été suspendus à l'aide de 10 coups d'homogénéisateur manuel. Un volume de tampon B (50mM HEPES pH7,9, 1,5mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 0,5mM AEBSF, 1,26M acétate de potassium, 75% glycérol) a été ajouté et suivi de 10 coups d'homogénéisateur. Les lysats ont été incubés pendant 30 min à 4°C sur un rotor et nettoyés par une ultracentrifugation de 3 h à 37 000 rpm à 4°C. Le surnageant a été récupéré et dialysé (10mM HEPES pH7,9, 0,1mM EDTA, 0,1mM DTT, 0,1M acétate de potassium, 10% glycérol, membrane MWCO 3500, Spectra/Por®) pendant la nuit à 4°C. Les lysats dialysés ont été à nouveau nettoyés à l'aide d'une centrifugation de 30 min à 14 000 rpm à 4°C. Les surnageants ont été conservés en tant qu'extraits protéiques totaux et utilisés immédiatement pour une purification par affinité en tandem.

2.4.2 Purification par affinité en tandem (TAP tag)

La purification par affinité en tandem a été réalisée telle que décrit précédemment^{113, 118} (Figure 2.1). En résumé, les lysats protéiques (soit

l'équivalent de 6g de cellules BaF/3 ou de cellules 293T) ont été incubés sur un rotor pendant 4h à 4°C en présence de 150 µL de billes d'IgG (Amersham) préalablement lavées (2x) avec la solution IPP 100G (10mM Tris pH8, 100mM NaCl, 0,1% TritonX100, 10% glycérol). Cette incubation permet la liaison entre les billes d'IgG et le domaine protéine A (Figure 2.1, Étape 1).

Après cette incubation, les billes d'IgG liées au complexe protéique sont culottées et lavées (2x) avec 5 mL de tampon IPP 100G. Les billes sont à nouveau lavées et équilibrées (2x) avec 5 mL de tampon de clivage TEV 100G (10mM Tris pH8, 100mM NaCl, 0,1% TritonX100, 0,5mM EDTA, 10% glycérol, 1mM DTT frais).

Afin de couper la liaison entre les billes d'IgG et le complexe protéique, les billes sont resuspendues dans 500 µL de tampon TEV 100G et 80U d'ActTEV protéase (Invitrogen) et incubées à température pièce pendant au moins 3h (Figure 2.1, Étape 2). Après cette période, la suspension est transférée dans une colonne Bio-Spin de 1 mL (Biorad). Cette colonne laisse passer le complexe protéique coupé des billes d'IgG et permet de retenir ces dernières. Les billes d'IgG contenues dans la colonne sont lavées (2x) avec 500 µL de tampon CBB 100G (10mM Tris pH8, 100mM NaCl, 1mM Imidazole, 1mM acétate de magnésium, 2mM CaCl₂, 0,1% TritonX100, 10% glycérol, 10mM β-mercaptoéthanol frais). L'éluât de la colonne Bio-Spin ainsi que les lavages sont conservés et regroupés dans un même tube eppendorf contenant 100 µL de billes de calmoduline (Amersham) préalablement lavées (2x) avec 1 mL de tampon CBB 100G.

Le volume contenu dans l'eppendorf est calculé (éluât + 2 lavages). La concentration de CaCl₂ est ajustée à 8mM final et les concentrations d'acétate de magnésium et d'imidazole sont ajustées à 1mM final. La suspension est incubée pendant la nuit sur un rotor à 4°C pour permettre la liaison calcium dépendante entre les billes de calmoduline et le domaine de liaison à la calmoduline (Figure 2.1, Étape 3).

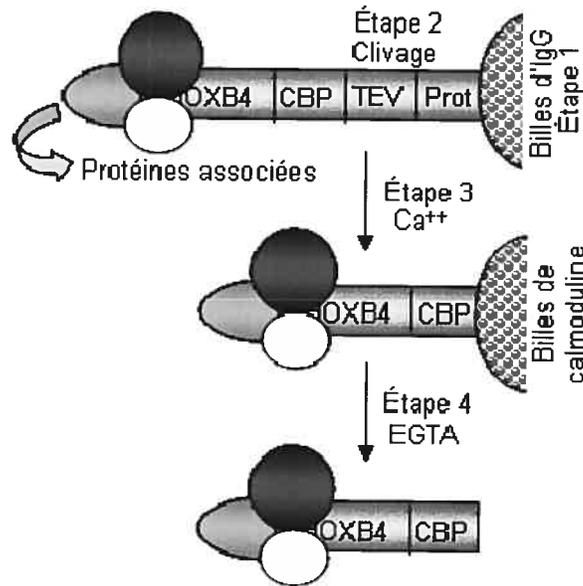


Figure 2.1 Représentation schématique de la stratégie de purification par affinité en tandem. Étape 1: Liaison du domaine protéine A de la protéine HOXB4-TAP et de ses partenaires aux billes d'IgG. Étape 2: Clivage du domaine protéine A par la TEV protéase et relâche du complexe protéique. Étape 3: Liaison calcium dépendante du domaine de liaison à la calmoduline de la protéique HOXB4-TAP et de ses partenaires aux billes de calmoduline. Étape 4: Éluion du complexe protéique.

Après la période d'incubation, les billes de calmoduline liées au complexe protéiques sont culottées et lavées (2x) avec 500 μ L de tampon CBB 100G. Les billes de calmoduline sont resuspendues dans 200 μ L de tampon CBB 100G et transférées dans une micro-colonne de billes de verre. Les colonnes de billes de verre sont construites à l'aide d'un embout de 200 μ L dont l'ouverture a été diminuée à l'aide d'une pince. Cet embout est rempli de 10 μ L de billes de verre de 212-300 microns. Afin d'équilibrer cette colonne, elle est lavée avec 100 μ L de tampon CBB 100G* (Tris pH8, 100mM NaCl, 1mM Imidazole, 1mM Mgacetate, 2mM $CaCl_2$, 0,1% TritonX100, 10mM β - mercaptoéthanol frais) avant de recevoir

la suspension de billes de calmoduline. Les billes de calmoduline liées au complexe protéique sont retenues dans la colonne. Les billes sont lavées à l'aide de 500 μ L de tampon CBB 100G*.

Afin de briser la liaison calcium dépendante entre les billes de calmoduline et le complexe protéique, les billes sont lavées avec 500 μ l de tampon d'éluion CEB 100* (10mM Tris pH8, 100mM NaCl, 1mM Imidazole, 1mM Mgacetate, 10mM β -mercaptoéthanol frais) contenant 10mM d'EGTA chélateur d'ions (Figure 2.1, Étape 4). L'éluât contenant les protéines purifiées est conservé et analysé par western blot ou gel de séparation suivi d'une coloration à l'argent.

2.5 Extraits protéiques et purification par immunoprécipitation (Flag tag)

Ces protocoles ont été gracieusement fournis par Jean-François Clément, étudiant dans le laboratoire du Dr Marc Servant.

2.5.1 Préparation des extraits protéiques totaux

L'équivalent de $3,5 \times 10^8$ cellules K562 ont été lavées à deux reprises dans du tampon phosphate salin (PBS) puis lysées pendant 30 min sur glace dans 18 mL de tampon de lyse (10mM Tris pH 8,0, 150mM NaCl, 0,1% NP-40, 5% glycérol) contenant des inhibiteurs de protéases (1 tablette Complete-EDTA free/10 mL de tampon de lyse, Roche) suivi de 10 coups d'homogénéisateur manuel. Les lysats ont été nettoyés à l'aide d'une centrifugation de 20 min à 14 000 rpm à 4°C. Les surnageants ont été récupérés en tant que lysats protéiques totaux. La concentration des protéines a été déterminée par un essai BCA tel que suggéré par le distributeur (Sigma, St. Louis, Mo).

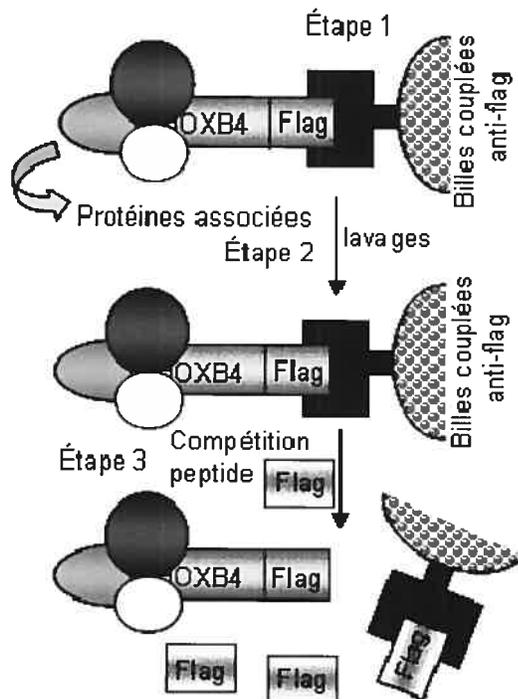


Figure 2.2 Représentation schématique de la stratégie de purification par immunoprécipitation. Étape 1: Liaison de la protéine HOXB4-Flag et de ses partenaires protéiques aux billes couplées à l'anticorps anti-Flag. Étape 2: Lavages des billes liées au complexe protéique. Étape 3: Éluion du complexe protéique en compétition avec le peptide Flag.

2.5.2 Immunoprécipitation (Flag tag)

Les lysats protéiques ont été dilués à l'aide du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et mis en rotation pendant 3 h à 4°C avec 50 µL de billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-Flag (ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel Freezer-Safe, Sigma) (Figure 2.2). Les billes ont été lavées (3x) avec 900 µL de tampon de lyse suivit d'un lavage avec 900 µL de TBS 1x (50mM Tris HCl, 150mM NaCl, pH 7,4). Le complexe protéique immunoprécipité a été élué à l'aide de deux étapes de

compétition (45 min) avec 65 μ L de peptide Flag (250 ng/mL de peptide Flag dans du TBS 1x, Sigma).

2.6 Analyse par western blot

Les analyses par western blot ont été réalisées comme relatée dans la section 1.9. Les analyses ont été faites à partir de 30 μ g de lysat protéique total de cellules BaF/3 et de cellules K562, de 30 μ g de lysat protéique provenant des fractions cytoplasmiques et nucléaires de cellules 293T et de fractions provenant des différentes étapes d'une purification par affinité en tandem ou d'une purification par immunoprécipitation.

2.7 Gel de séparation et coloration au nitrate d'argent

Afin de séparer et visualiser les protéines éluées lors de la purification par affinité en tandem ou lors de la purification par immunoprécipitation, un gel de 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) a été utilisé pour ensuite être coloré au nitrate d'argent.

Ce protocole de coloration au nitrate d'argent a été offert par le laboratoire du Dr Benoît Coulombe où il a été modifié par Celia Jeronimo afin de le rendre compatible avec les analyses par spectrométrie de masse. Après migration, le gel est fixé pendant 30 min (50% méthanol, 10% acide acétique), la solution de fixation est changée et le gel est à nouveau fixé pendant au moins 2 h. Le gel est rincé pendant 20 min (20% éthanol) et lavé pendant 20 min dans l'eau. Le gel est ensuite réduit pendant 2 min (0,2 g/L sodium thiosulfate) et lavé (2x) pendant 20 s à l'eau. Le gel est incubé pendant 30 min au nitrate d'argent (2 g/L de nitrate d'argent) lavé pendant 20 s à l'eau. Le gel est alors lavé une première fois avec la solution de développement (30g/L sodium carbonate, 0,14% formaldéhyde, 10 mg/L sodium thiosulfate) et révélé une deuxième fois avec la même solution de

développement jusqu'à l'obtention de l'intensité désirée. La réaction est arrêtée en changeant la solution de développement par la solution stop (1% v/v acide acétique).

Chapitre 3

Résultats

1. Stratégie pour générer les formes activatrice et répressive de la protéine HOXB4

1.1 Génération des protéines de fusion VP16-HOXB4 et EN-HOXB4

En utilisant des techniques standards de sous clonage, les formes activatrice et répressive d'HOXB4 ont été générées en insérant le domaine d'activation de VP16 et le domaine de répression d'*Engrailed* (EN) en 5' de l'ADNc codant pour la protéine HOXB4 dans un vecteur rétroviral (MSCV) permettant éventuellement d'infecter des cellules de moelle osseuse et dans un vecteur d'expression (pcDNA3) permettant d'utiliser un système de transcription et de traduction *in vitro* et de facilement transfecter des lignées cellulaires (Figure 3.1A).

1.2 Les protéines de fusions VP16-HOXB4 et EN-HOXB4 sont traduites et transcrites *in vitro* et *in vivo*.

Une analyse par western blot réalisée à l'aide de protéines produites par un système de transcription et de traduction *in vitro* (TnT® Couple Reticulocyte Lysate) indique que les deux protéines de fusion VP16-HOXB4-Flag et EN-HOXB4-Flag peuvent être transcrites et traduites *in vitro* (Figure 3.1B). La production de ces deux protéines de fusion a aussi été confirmée dans des cellules de mammifères (Cos) transfectées avec les vecteurs d'expression respectifs (Figure 3.1C). Enfin, les protéines VP16-HOXB4-Flag et EN-HOXB4-Flag ont accès au compartiment nucléaire des cellules de mammifères (293T) transfectées préalablement avec les vecteurs d'expression respectifs et ont donc la même localisation que la protéine sauvage (Figure 3.1D).

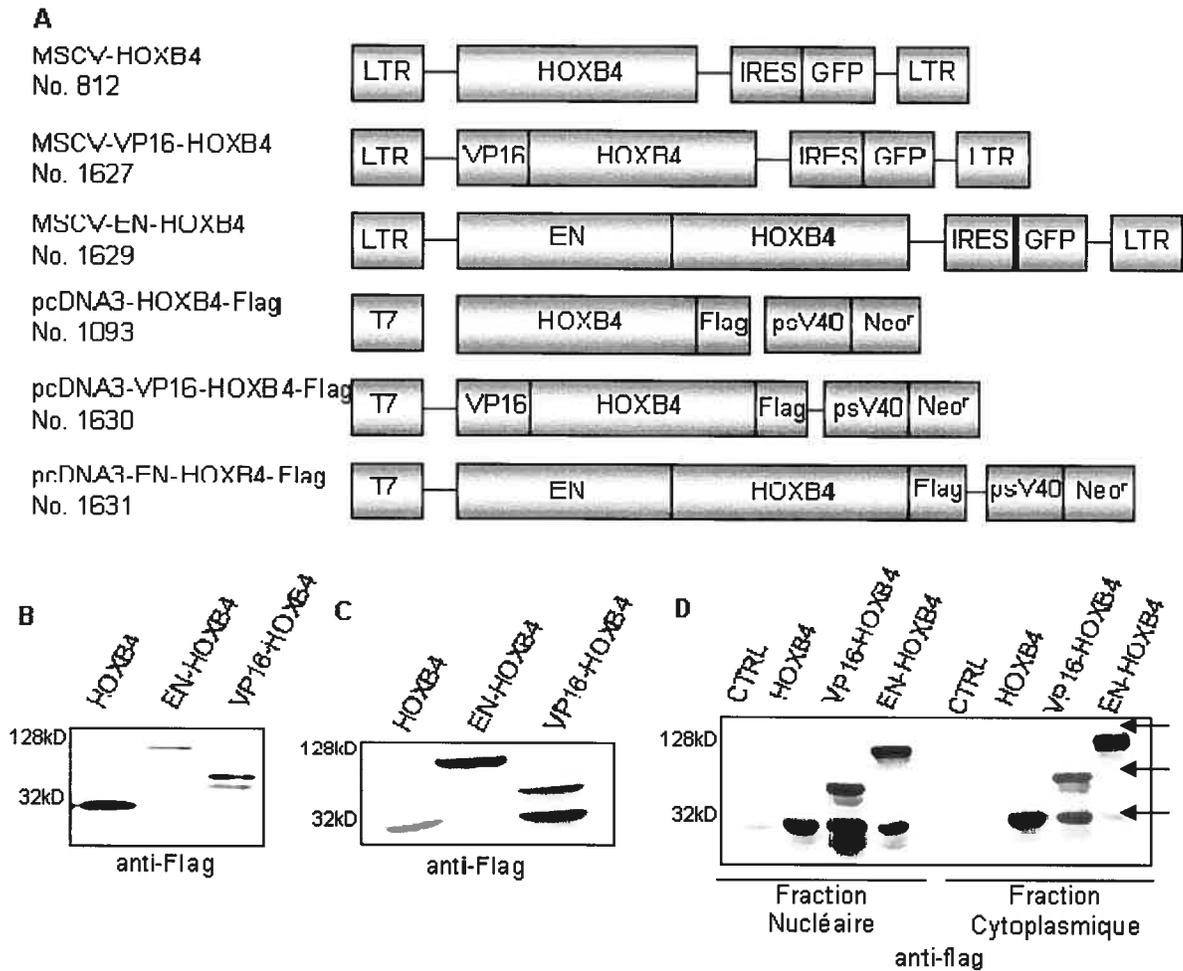


Figure 3.1 HOXB4 et les protéines de fusion EN-HOXB4 et VP16-HOXB4, vecteur rétroviral et d'expression et analyses d'expression dans différents systèmes. (A) Vecteur rétroviral (MSCV) et d'expression (pcDNA3) contenant l'ADNc d'*HOXB4* sauvage ou codant pour les protéines de fusion EN-HOXB4 et VP16-HOXB4. (B) Analyse par western blot des protéines HOXB4, EN-HOXB4 et VP16-HOXB4 transcrites et traduites *in vitro*. (C) Analyse par western blot des protéines HOXB4, EN-HOXB4 et VP-16-HOXB4 à partir de lysat de cellules de mammifères (Cos) transfectées avec les vecteurs d'expression respectifs. (D) Analyse par western blot de la localisation des protéines HOXB4, EN-HOXB4 et VP16-HOXB4 dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques de cellules de mammifères (293T) transfectées avec les vecteurs d'expression respectifs.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| HOXB4 | - | + | - | - | - | + | - | - | + | - | - |
| VP16-HOXB4 | - | - | + | - | - | - | + | - | - | + | - |
| EN-HOXB4 | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | + |
| PBX | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| ANTI-FLAG | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |

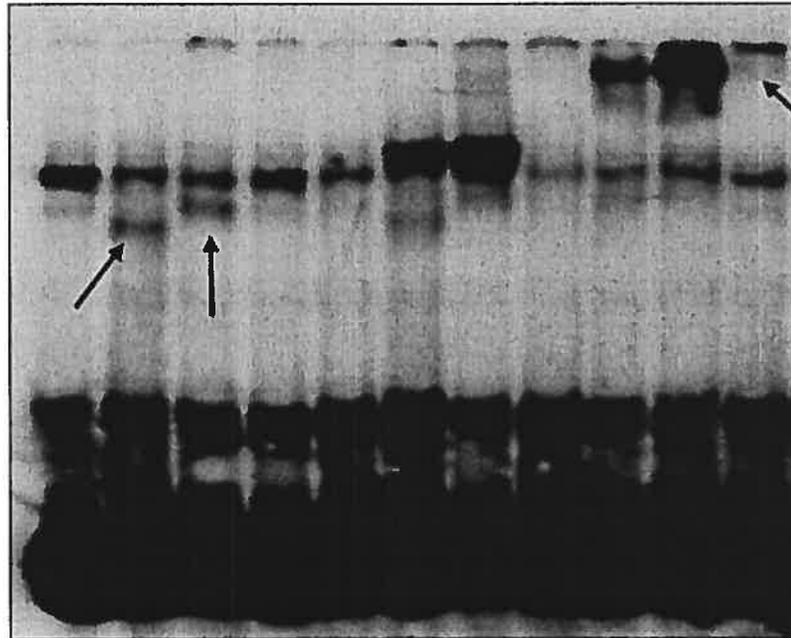


Figure 3.2 Capacité de liaison à l'ADN d'HOXB4 et des protéines de fusion VP16-HOXB4 et EN-HOXB4. L'addition des différentes composantes de la réaction est indiquée. L'étude par analyse de retard sur gel a été réalisée en utilisant la séquence consensus de liaison des protéines HOX/PBX (TGATTGATGG) et les protéines HOXB4-Flag, VP16-HOXB4-Flag, EN-HOXB4-Flag et PBX transcrites et traduites *in vitro*.

Par conséquent, la capacité de ces protéines de fusion d'interagir avec l'ADN *in vitro* a été testée à l'aide d'une analyse de retard sur gel utilisant la séquence de liaison des protéines HOX/PBX et des protéines traduites *in vitro* (Figure 3.2). VP16-HOXB4-Flag et EN-HOXB4-Flag sont capables de lier l'ADN. Toutefois,

alors que VP16-HOXB4-Flag interagit directement avec l'ADN (Figure 3.2, ligne 3), en coopération avec PBX1b (Figure 3.2, ligne 7) et induit un super shift en présence de l'anticorps anti-Flag (Figure 3.2, ligne 10), EN-HOXB4-Flag interagit plus faiblement avec l'ADN. En effet, il y a un faible taux de super shift (Figure 3.2, ligne 11) en présence de l'anti-Flag et la présence d'une liaison directe avec l'ADN (Figure 3.2, ligne 4) est difficile à estimer puisqu'elle serait susceptible d'être détectée au même endroit que le bruit de fond de l'essai. Le domaine de répression d'*Engrailed* dont la taille est de 900 paires de bases (pb) est plus volumineux que le domaine d'activation de VP16 qui est de 250 pb. Son addition pourrait donc affecter la conformation de la protéine HOXB4 sauvage et ainsi masquer son domaine de liaison à l'ADN et nuire à son interaction avec PBX1b.

1.3 La protéine VP16-HOXB4 confère un avantage prolifératif aux cellules de moelle osseuse infectées

Afin de déterminer si l'addition des domaines d'activation ou de répression à HOXB4 permet d'obtenir un super phénotype, les deux protéines de fusion ont été testées quant à leur habilité à augmenter la prolifération des cellules de moelle osseuse comme le fait HOXB4. L'essai de prolifération totale *in vitro* (Figure 3.3A) démontre un avantage significatif de 1000x et de 100x des cellules de moelle osseuse exprimant HOXB4 sauvage ou VP16-HOXB4 respectivement. Toutefois, les cellules exprimant EN-HOXB4 n'ont pas cet avantage prolifératif et se comportent comme un simple contrôle GFP.

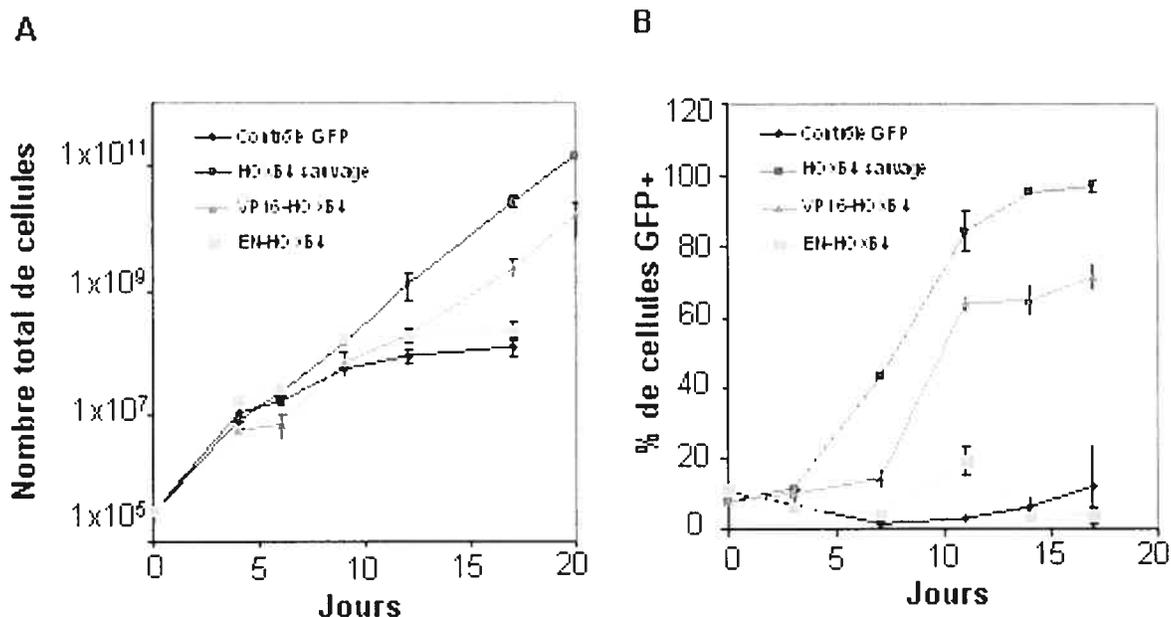


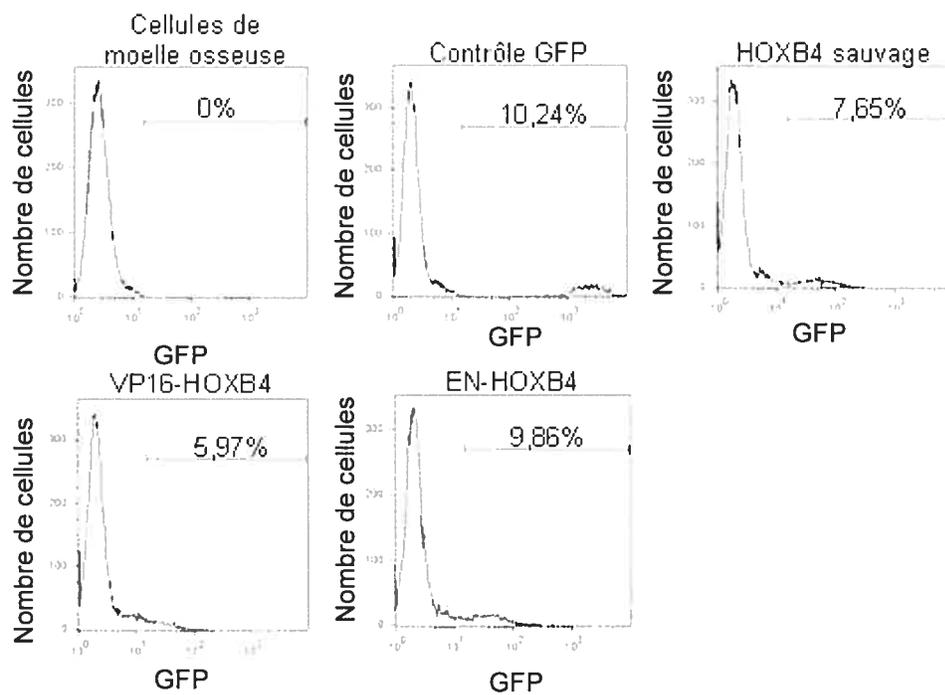
Figure 3.3 L'expression de VP16-HOXB4 confère un avantage prolifératif aux cellules de moelle osseuse. (A) Prolifération des cellules nucléées totales de moelle osseuse modifiées de façon à surexprimer les protéines HOXB4, EN-HOXB4, VP16-HOXB4 et la protéine GFP en contrôle pendant une période de 20 jours. (B) Essai de compétition *in vitro*. Mesure de l'expansion des cellules de moelle osseuse GFP⁺ aux différents temps indiqués sur une période de 19 jours. Les cultures ont chacune été débutées avec 10% de cellules GFP⁺ (HOXB4, VP16-HOXB4, EN-HOXB4, GFP en contrôle) et 90% de cellules non infectées (GFP⁻). La proportion de cellules GFP⁺ est évaluée par cytométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne des valeurs obtenues lors d'une expérience réalisée en duplicata. n=2

Enfin, un autre essai a été réalisé afin de comparer l'avantage prolifératif des cellules de moelle osseuse exprimant la forme activatrice et répressive d'HOXB4 aux cellules exprimant la protéine sauvage. Il s'agit de l'essai de compétition *in vitro* (Figure 3.3b). Cet essai a été initié avec 10% de cellules infectées (GFP⁺) et 90% de cellules non infectées (GFP⁻). Pour chacune des quatre conditions (GFP en contrôle, HOXB4 sauvage, VP16-HOXB4 et EN-HOXB4), le ratio entre les

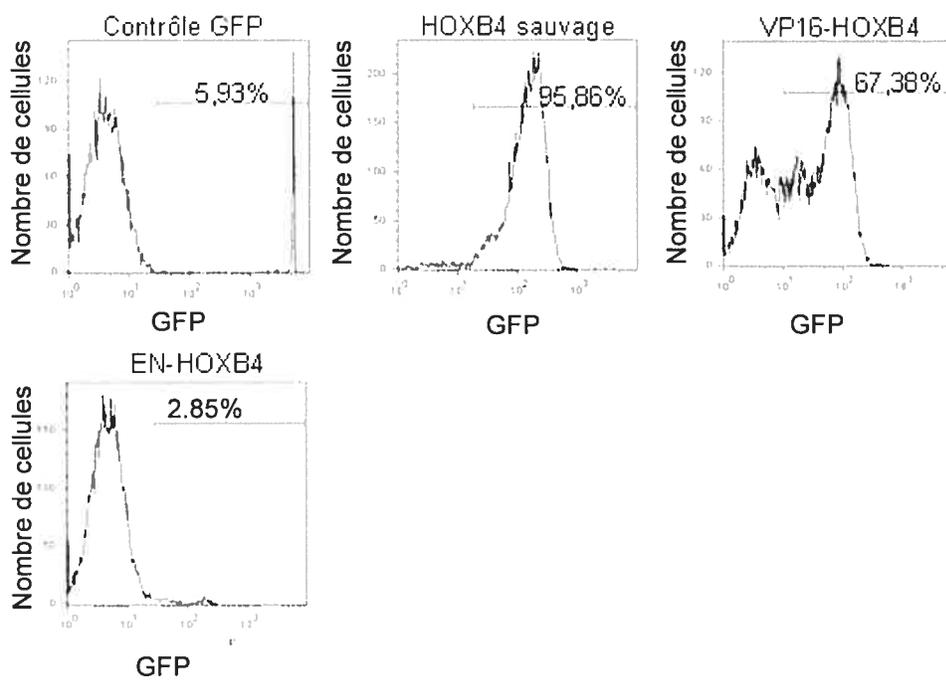
cellules GFP⁺ et GFP⁻ a été évalué tous les deux ou trois jours. Après 18 jours de culture *in vitro*, les cellules infectées et surexprimant HOXB4 sauvage (GFP⁺), exhibent un avantage prolifératif considérable et elles représentent près de 100% de la culture comme il avait été rapporté précédemment⁶⁰. En comparaison, les cellules exprimant EN-HOXB4 demeurent à leur valeur initiale, soit près de 10% de cellules infectées (GFP⁺) après 18 jours. La population de cellules exprimant VP16-HOXB4 présente un phénotype intermédiaire avec une augmentation des cellules infectées à environ 70% après la période de culture. Il est à remarquer que le profil d'expression du gène rapporteur GFP dans les cellules VP16-HOXB4 est différent de celui des cellules HOXB4. En effet, au jour 16 de l'essai de compétition, dans les cellules exprimant VP16-HOXB4, trois populations de cellules apparaissent (une population négative, une population exprimant des faibles niveaux de GFP et une population exprimant des hauts niveaux de GFP) comparativement aux cellules exprimant HOXB4 où l'on observe une seule population exprimant de hauts niveaux du gène rapporteur (Figure 3.4).

Figure 3.4 Profil de FACS des cellules de moelle osseuse de l'essai de compétition *in vitro*. (A) Profils de FACS au jour 0 de l'essai de compétition *in vitro* des cellules de moelle osseuse en contrôle, des cellules de moelle osseuse exprimant GFP en contrôle, HOXB4 sauvage, VP16-HOXB4 ou EN-HOXB4. (B) Profils de FACS au jour 16 de l'essai de compétition *in vitro* des cellules de moelle osseuse exprimant GFP en contrôle, HOXB4 sauvage, VP16-HOXB4 ou EN-HOXB4

A Jour 0 de l'essai de compétition *in vitro*



B Jour 16 de l'essai de compétition *in vitro*



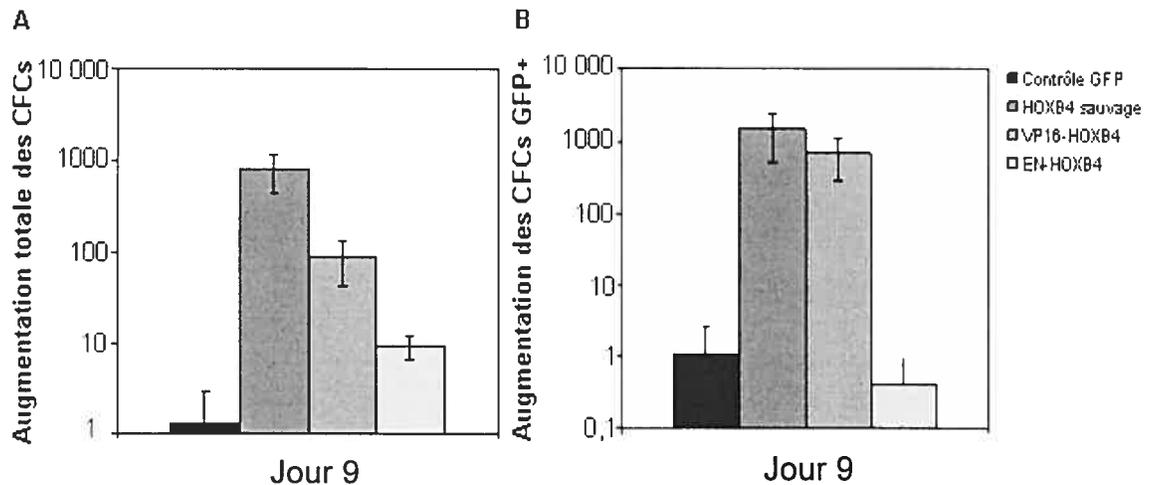


Figure 3.5 L'expression de VP16-HOXB4 confère un avantage prolifératif aux progéniteurs de moelle osseuse. Des cultures semi-solides ont été initiées pour chacune des cultures de moelle osseuse (HOXB4 sauvage, VP16-HOXB4, EN-HOXB4 et GFP en contrôle) au jour 0 et au jour 9 de l'essai de prolifération. L'augmentation du nombre total de colonies (A) et de colonies infectées (GFP⁺) (B) a été évaluée au jour 9 en comparaison avec le jour 0. Les résultats représentent la moyenne des valeurs obtenues lors d'une expérience réalisée en duplicata (n=2).

1.4 La protéine VP16-HOXB4 confère un avantage prolifératif aux progéniteurs de moelle osseuse

L'effet d'une expression de VP16-HOXB4 et d'EN-HOXB4 a été testé au niveau des progéniteurs de moelle osseuse plus particulièrement en effectuant un essai en milieu semi-solide (Figure 3.5). Après 9 jours de culture *in vitro*, la population de cellules de moelle osseuse exprimant HOXB4 et VP16-HOXB4 présente une augmentation du nombre de leurs progéniteurs totaux (GFP⁻ et GFP⁺) en comparaison au jour 0 (Figure 3.5A). Plus particulièrement, le nombre de progéniteurs infectés (GFP⁺) exprimant HOXB4 sauvage et VP16-HOXB4 a

augmenté de près de 1500 et de 700 fois respectivement par rapport à sa valeur initiale (Figure 3.5B). L'expression d'EN-HOXB4 n'entraîne aucun avantage prolifératif dans les progéniteurs infectés. Les cellules exprimant VP16-HOXB4 ont donc un comportement intermédiaire voir semblable aux cellules surexprimant la protéine HOXB4. L'addition du domaine d'activation n'entraîne pas un super phénotype qui aurait été visualisé par une potentialisation de l'effet d'HOXB4 sur les cellules de moelle osseuse.

1.5 Les cellules de moelle osseuse surexprimant VP16-HOXB4 expriment des niveaux élevés d'HOXB4.

Les cellules de moelle osseuse exprimant VP16-HOXB4 présentent donc un phénotype intermédiaire à celui d'une surexpression d'HOXB4. Des études récentes dans le laboratoire suggèrent que la régulation des niveaux d'expression d'HOXB4 est très importante et peut influencer son effet sur les CSHs. Les profils de cytométrie en flux démontrent que les niveaux d'expression du gène rapporteur GFP diminuent dans la population de cellules exprimant VP16-HOXB4 pendant la période de culture, malgré la dominance des cellules infectées. Les niveaux de VP16-HOXB4 dans les cellules de moelle osseuse en culture ont donc été évalués (Figure 3.6). Les cellules de moelle osseuse exprimant VP16-HOXB4 expriment aussi des niveaux élevés de la protéine HOXB4. Ces niveaux sont même plus élevés que ceux de la protéine VP16-HOXB4 qui est à peine détectée.

Finalement, toutes ces études indiqueraient que la forme VP16-HOXB4 ne permet pas d'obtenir un phénotype correspondant à un super HOXB4. Cette forme ne serait donc pas indiquée pour faciliter des analyses d'expression afin d'identifier les gènes cibles d'HOXB4.

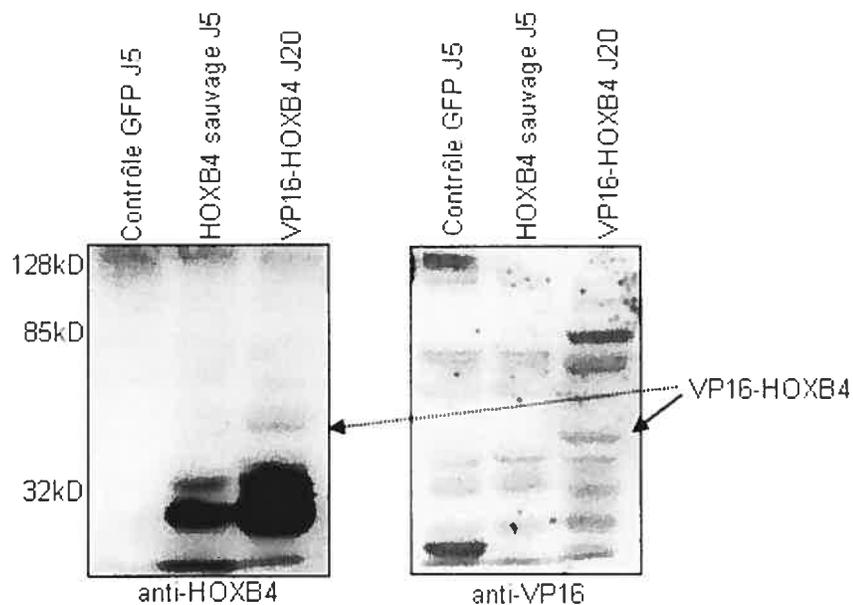


Figure 3.6 Les cellules de moelle osseuse surexprimant VP16-HOXB4 expriment des niveaux élevés d'HOXB4. Analyse par western blot à partir de lysat de cellules de moelle osseuse surexprimant la protéine GFP en contrôle, HOXB4 sauvage ou VP16-HOXB4. Les lysats ont été effectués au jour 5 pour les cellules exprimant les protéines GFP et HOXB4 sauvage et au jour 20 pour les cellules exprimant la protéine VP16-HOXB4 de l'essai de prolifération *in vitro*. Les cellules des trois populations étaient infectées (GFP⁺) à environ 80%.

2. Stratégie pour identifier les partenaires protéiques d'HOXB4

2.1 Génération des protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag

En utilisant des techniques standards de sous clonage, le tag de purification par affinité en tandem (TAP) a été généré et inséré en 3' de l'ADNc d'*HOXB4* contenu

dans un vecteur rétroviral (MSCV). Le tag a aussi été inséré seul dans ce même vecteur à titre de contrôle. Des techniques de sous clonage ont aussi servi à introduire le tag Flag en 3' de l'ADNc d'*HOXB4* contenu dans un vecteur rétroviral (MSCV). Ces constructions serviront éventuellement à infecter des cellules de moelle osseuse ainsi que des lignées cellulaires (Figure 3.7).

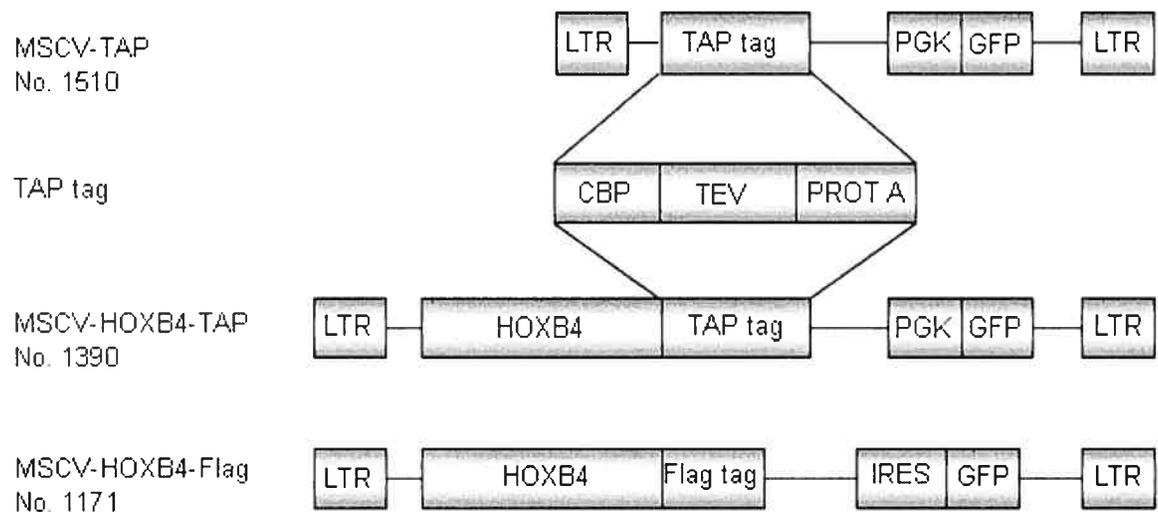


Figure 3.7 Vecteur rétroviraux pour les stratégies de purification par affinité en tandem et par immunoprécipitation. Vecteur rétroviraux (MSCV) contenant le cDNA d'*HOXB4* sauvage couplé dans le même cadre de lecture au tag de purification par affinité en tandem (TAP) ou au tag Flag.

2.2 Les protéines de fusion *HOXB4*-TAP et *HOXB4*-Flag sont fonctionnelles

Afin de s'assurer que l'ajout des deux différents tags ne nuit pas à la fonction d'*HOXB4* dans les CSHs, deux essais de compétition *in vitro* ont été réalisés à l'aide de cellules de moelle osseuse préalablement co-cultivées avec des cellules productrices de rétrovirus contenant l'ADNc de nos protéines d'intérêts. (Figure 3.8). Les essais de compétition *in vitro* ont été initiés avec 10% de cellules de

moelle osseuse infectées (GFP⁺) et 90% de cellules non infectées (GFP⁻). Pour chacune des quatre conditions (GFP en contrôle, HOXB4 sauvage, HOXB4-TAP et HOXB4-Flag), le ratio entre les cellules GFP⁺ et GFP⁻ a été évalué tous les deux ou trois jours. Après 18 jours de culture *in vitro*, les cellules exprimant HOXB4-TAP, exhibaient le même avantage prolifératif que les cellules exprimant HOXB4 sauvage et représentent près de 100% de la culture (Figure 3.8a). Le même phénomène est observé avec les cellules exprimant HOXB4-Flag (Figure 3.8B) suggérant que tout comme le tag TAP, le tag Flag ne nuit pas à la fonction de la protéine. Ces résultats indiquent que l'ajout des domaines nécessaires à la purification d'HOXB4 et de ces partenaires ne défavorise pas le repliement normal de la protéine. Ces protéines seraient donc susceptibles d'interagir avec les partenaires habituels d'HOXB4.

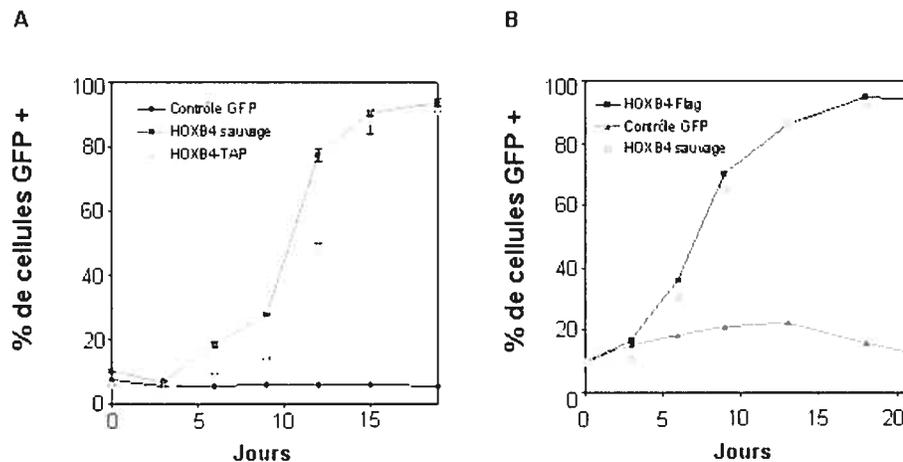


Figure 3.8 Les protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag sont fonctionnelles. (A) Essai de compétition *in vitro*. Mesure de l'expansion des cellules de moelle osseuse GFP⁺ aux différents temps indiqués sur une période de 20 jours. Les cultures ont chacune été débutées avec 10% de cellules GFP⁺ (GFP en contrôle, HOXB4 sauvage, HOXB4-TAP) et 90% de cellules non infectées (GFP⁻). Les résultats représentent la moyenne des valeurs obtenues lors d'une expérience réalisée en duplicata. (B) Essai de compétition *in vitro*. Mesure de

l'expansion des cellules de moelle osseuse GFP⁺ aux différents temps indiqués sur une période de 21 jours. Les cultures ont chacune été débutées avec 10% de cellules GFP⁺ (GFP en contrôle, HOXB4 sauvage, HOXB4-Flag) et 90% de cellules non infectées (GFP⁻). La proportion de cellules GFP⁺ est évaluée par cytométrie en flux.

2.3 Les lignées cellulaires 293T, BaF/3 et K562 expriment les protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag

Afin d'étudier les partenaires protéiques d'HOXB4 impliqués dans l'auto-renouvellement des CSHs, il est important d'utiliser un modèle adéquat. Ce qui signifie qu'il serait préférable d'effectuer la purification des complexes protéiques dans des cellules de moelle osseuse fortement enrichies en CSHs. Par ailleurs, les techniques de purification demandent généralement plusieurs étapes d'optimisation nécessitant une grande quantité de matériel. Ainsi, c'est pourquoi des lignées cellulaires exprimant stablement les protéines de fusion servant aux purifications ont été générées et utilisées. Suite à la culture en présence des souches rétrovirales de VSV, la lignée cellulaire 293T exprime de façon stable HOXB4-TAP. Cette protéine a aussi accès au compartiment nucléaire (Figure 3.9A). La lignée cellulaire BaF/3 infectée de la même façon exprime aussi la protéine HOXB4-TAP (Figure 3.9B). Enfin, les cellules K562 infectées expriment HOXB4-Flag (Figure 3.9C). Ces trois lignées cellulaires étaient donc appropriées pour procéder aux purifications.

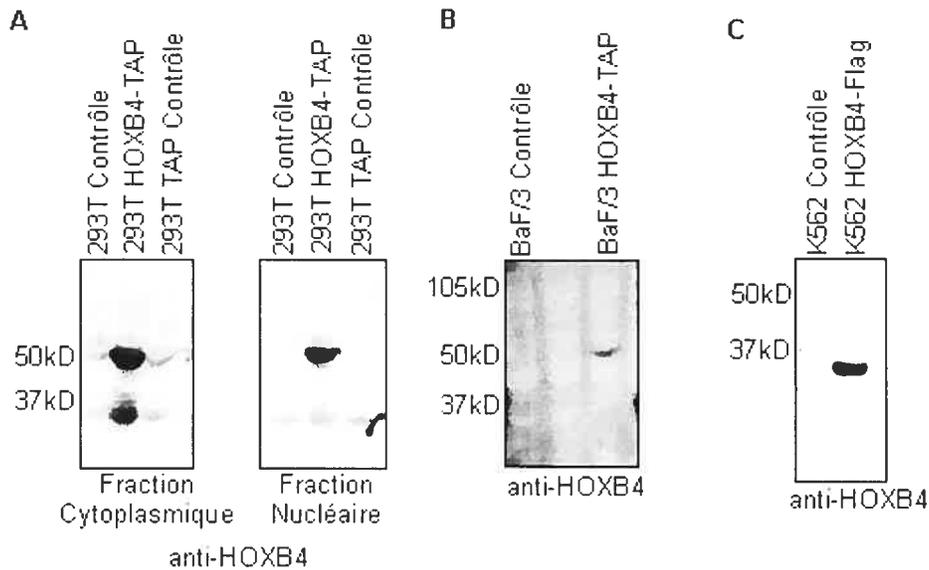


Figure 3.9 Les lignées cellulaires stables expriment les protéines de fusion HOXB4-TAP et HOXB4-Flag. (A) Analyse par western blot de la localisation de la protéine HOXB4-TAP dans les fractions nucléaires et cytoplasmiques de la lignée cellulaire 293T infectées. (B) Analyse par western blot de l'expression de la protéine HOXB4-TAP dans la lignée cellulaire BaF/3 infectée. (C) Analyse par western blot de l'expression de la protéine HOXB4-Flag dans la lignée cellulaire K562.

2.4 La purification par affinité en tandem nécessite une optimisation

La qualité et le rendement des purifications par affinité en tandem (Figure 2.1) ont été évalués en conservant et en analysant par western blot plusieurs fractions récupérées lors de la purification. À la figure 3.10A un profil représentatif d'une purification effectuée à partir de lysats protéiques totaux de cellules 293T exprimant la protéine HOXB4-TAP. La liaison d'HOXB4-TAP aux billes d'IgG semble efficace ce qui se manifeste par un très faible taux d'HOXB4-TAP dans le surnageant suivant la colonne d'IgG (Figure 3.10A, ligne 2).

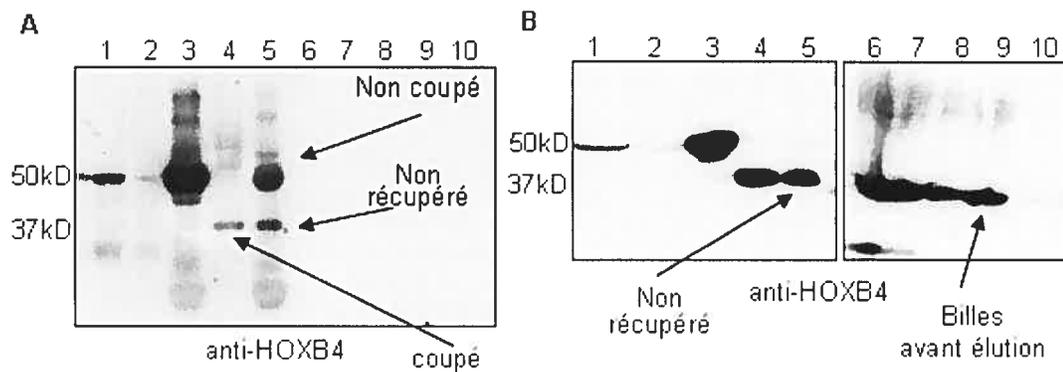


Figure 3.10 La purification par affinité en tandem requiert une optimisation.

(A) Analyse par western blot des fractions récupérées à différentes phases de la purification par affinité en tandem réalisée à partir d'extraits totaux de cellules 293T exprimant HOXB4-TAP (1. 1/700 du lysat initial, 2. 1/700 du lysat après colonne d'IgG, 3. 1/20 des billes d'IgG avant clivage, 4. 1/10 de l'éluat après clivage, 5. 1/10 des billes d'IgG après clivage, 6. 1/30 de la portion non liée après la colonne de calmoduline, 7. 1/10 des billes de calmoduline avant l'élution, 8. 1/5 de la première élution, 9. 1/5 de la seconde élution, 10. 1/5 des billes de calmoduline après l'élution). (B) Analyse par western blot des fractions récupérées à différentes phases de la purification par affinité en tandem réalisée à partir d'extraits totaux de cellules BaF/3 exprimant HOXB4-TAP (1. 1/800 du lysat initial, 2. 1/800 du lysat après colonne d'IgG, 3. 1/150 des billes d'IgG avant clivage, 4. 1/100 de l'éluat après clivage, 5. 1/150 des billes d'IgG après clivage, 6. 100% de la portion non liée après la colonne de calmoduline, 7. 1/100 des billes de calmoduline avant les lavages, 8. 100% des lavages des billes de calmoduline en tube eppendorf, 9. 1/100 des billes de calmoduline avant l'élution, 10. 100% de l'élution)

Ensuite, la protéine de fusion a été coupée par l'enzyme TEV protéase puisque l'on reconnaît une forme d'HOXB4 de poids moléculaire réduit (correspondant à HOXB4 + domaine de liaison à la calmoduline) dans la fraction contenant l'éluat récupéré après l'action de l'enzyme (Figure 3.10A, ligne 4). Néanmoins, la protéine

de fusion n'a pas été entièrement coupée puisqu'il reste une quantité substantielle associée aux billes (Figure 3.10A, ligne 5). De plus, une quantité d'HOXB4 de forme clivée est demeurée dans la fraction des billes d'IgG (Figure 3.10A, ligne 5). La quantité de protéine disponible n'a donc pas été récupérée entièrement. Ce faible rendement de clivage et de récupération explique que l'on ne retrouve pas HOXB4 dans les fractions suivantes correspondant aux étapes de liaison à la calmoduline et d'éluion finale (Figure 3.10A lignes 6 à 10). Le principal problème de cette purification est donc le rendement obtenu après le clivage par la TEV protéase.

Afin de remédier à ce problème, les conditions de clivage ont été optimisées. Premièrement, différentes températures d'incubation ont été testées (4°C, 16°C et la température ambiante). La température de clivage la plus adéquate s'est avérée être la température ambiante. Toutefois, l'enzyme TEV protéase est très thermosensible et bien que son activité soit optimale aux alentours de 25°C, celle-ci décroît très rapidement. Afin d'enrayer ce problème, l'enzyme ActTEV protéase dont l'activité à température pièce est optimale mais beaucoup plus durable, a été utilisée pour les purifications subséquentes.

Suite à l'optimisation du clivage par l'ActTEV protéase, on peut maintenant observer un profil représentatif obtenu lors des purifications par affinité en tandem réalisées à l'aide d'extraits totaux de cellules BaF/3 exprimant HOXB4-TAP (Figure 3.10B). La liaison d'HOXB4-TAP aux billes d'IgG demeure idéale (Figure 3.10B, lignes 1 et 2). Le clivage de la protéine de fusion est efficace puisque l'on ne retrouve plus de forme non clivée dans la fraction des billes d'IgG après clivage bien que l'on ne soit toujours pas capable de bien récupérer tout ce qui a été coupé (Figure 3.10B, ligne 5). Contrairement au profil analysé précédemment, on HOXB4 est observé dans la fraction contenant les billes de calmoduline avant l'éluion (Figure 10B, ligne 9). Toutefois, HOXB4 n'est pas présent dans l'éluion,

suggérant que la protéine reste associée à la colonne de calmoduline. Deux hypothèses ont été envisagées pour expliquer ce phénomène. Premièrement, il se peut que la protéine interagisse avec les billes de calmoduline de façon calcium indépendante et que le tampon d'élution n'ait aucun effet dans le bris de cette liaison. Pour remédier à ce problème, une solution envisageable serait d'inclure un détergent compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse dans le tampon d'élution. Une deuxième hypothèse permettant d'expliquer l'absence d'HOXB4 dans l'élution serait que le calcium nécessaire à la liaison entre les billes de calmoduline et le domaine de liaison aux billes soit présent en trop grande quantité. Si tel est le cas, les quantités d'EGTA présentes dans le tampon d'élution ne sont pas suffisantes pour chélater le calcium présent. Une solution serait d'augmenter la concentration d'EGTA du tampon d'élution. Ces deux possibilités ont été testées.

2.5 La protéine HOXB4-TAP est retrouvée dans l'élution de la purification par affinité en tandem

De nouvelles purifications ont donc été réalisées avec des extraits totaux de cellules BaF/3 exprimant HOXB4-TAP afin de tester ces deux hypothèses (Figure 3.11A). Lorsque la concentration d'EGTA est augmentée de 2mM à 10mM, on récupère HOXB4 dans l'élution (Figure 3.11A, ligne 14). En conséquence, il est maintenant possible d'obtenir HOXB4 après les deux cycles de purification et il est maintenant possible d'évaluer la complexité de cette élution. Afin d'observer la composition de l'élution, une autre purification a été réalisée (Figure 3.11B et C) et 10% de l'élution ont été analysés par western blot et 90% de l'élution ont été séparés sur gel pour ensuite être colorés au nitrate d'argent. La protéine HOXB4 est toujours présente dans l'élution (Figure 3.11B).

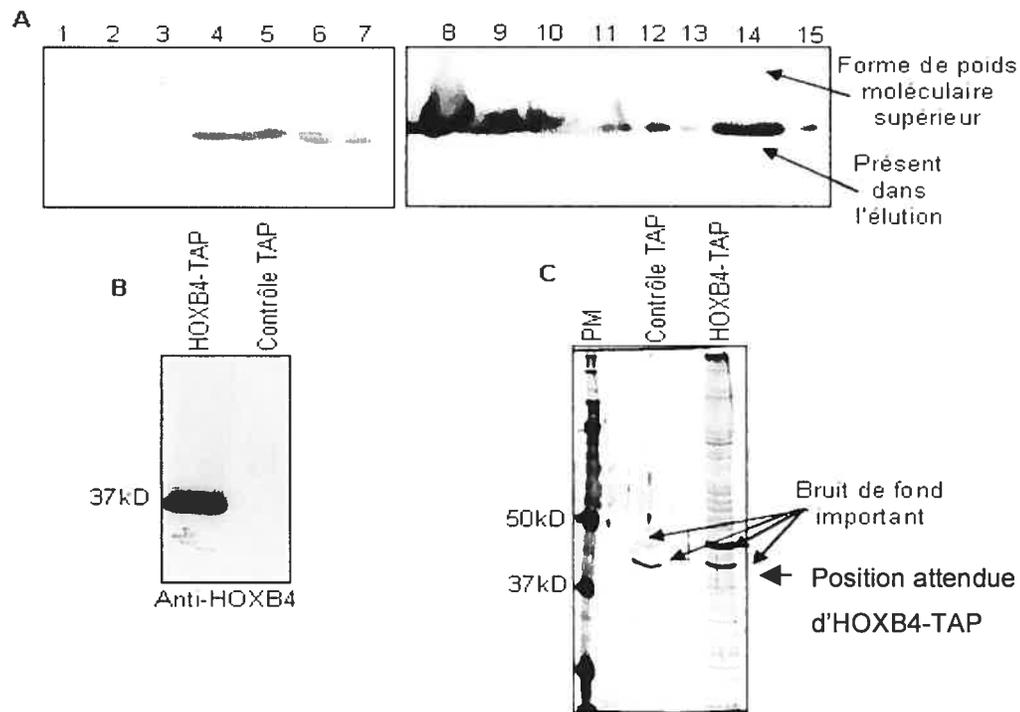


Figure 3.11 Validation de la stratégie de purification par affinité en tandem. (A) Analyse par western blot des fractions récupérées à différentes phases de la purification d'affinité en tandem réalisée à partir d'extraits totaux d'une lignée de cellules hématopoïétiques (BaF3) modifiées de façon à exprimer HOXB4-TAP (1. 1/800 du lysat initial, 2. 1/800 du lysat après colonne d'IgG, 3. 1/150 des billes d'IgG avant clivage, 4. 1/100 de l'éluat après clivage, 5. 1/150 des billes d'IgG avant la colonne Bio-Spin, 6. 1/100 de l'éluat après clivage après la colonne Bio-Spin, 7. 1/150 des billes d'IgG après clivage après la colonne Bio-Spin, 8. 100% de la portion non liée après la colonne de calmoduline, 9. 1/150 des billes de calmoduline avant les lavages, 10. 100% des lavages des billes de calmoduline en eppendorf, 11. 100% des lavages des billes de calmoduline sur colonne, 12. 1/150 des billes de calmoduline avant l'éluat, 13. 100% des 40 premiers μ l d'éluat, 14. 100% de l'éluat, 15. 1/150 des billes de calmoduline après l'éluat) (B) Analyse par western blot de 10% de l'éluat finale (C) Profil de coloration au nitrate d'argent représentent 90 % de l'éluat finale.

En examinant le profil de coloration à l'argent, on remarque qu'il existe plus de matériel (quantité total de protéine) dans l'élution de la condition HOXB4-TAP (Figure 3.11C). Il y a toutefois des bandes de bruit de fonds dans les deux conditions. Aussi, il est à remarquer que les bandes prédominantes ne correspondent pas à HOXB4, mais plutôt à deux bandes de bruits de fond présentes dans les deux conditions. Une analyse par spectrométrie de masse a pu déterminer que la bande de poids moléculaire plus faible (dessous) correspond à de l'actine (résultat non présenté). L'actine est un contaminant fréquent déjà observé dans d'autres études¹¹⁹. Finalement, bien que la protéine soit retrouvée à la fin de la purification, les conditions utilisées jusqu'à maintenant ne permettent pas d'identifier les partenaires d'HOXB4. De plus, étant donné qu'on ignore qu'elle bande correspond à HOXB4, il est difficile d'utiliser cette méthode pour séquencer la protéine HOXB4 à l'aide de la spectrométrie de masse.

2.6 La protéine HOXB4-Flag est retrouvée dans l'élution de la purification par immunoprécipitation

La qualité et le rendement de la purification par immunoprécipitation (Figure 2.2) ont été évalués en conservant et en analysant par western blot plusieurs fractions récupérées lors de la purification. À la figure 3.12A un profil représentatif d'une purification effectuée à partir de lysats protéiques totaux de cellules K562 exprimant la protéine HOXB4-Flag. La liaison d'HOXB4-Flag aux billes d'agarose couplées à l'anti-Flag semble efficace ce qui se manifeste par un très faible taux d'HOXB4 dans le surnageant (Figure 3.12A, ligne 2). De plus, il y a peu de perte d'HOXB4-Flag lors des lavages (Figure 3.12A, lignes 3 à 6). Lors des deux cycles d'élution à l'aide d'une compétition avec le peptide Flag, il y a un bon relâchement de la protéine HOXB4-Flag que l'on retrouve maintenant dans le surnageant (Figure 3.12A, lignes 8 et 9).

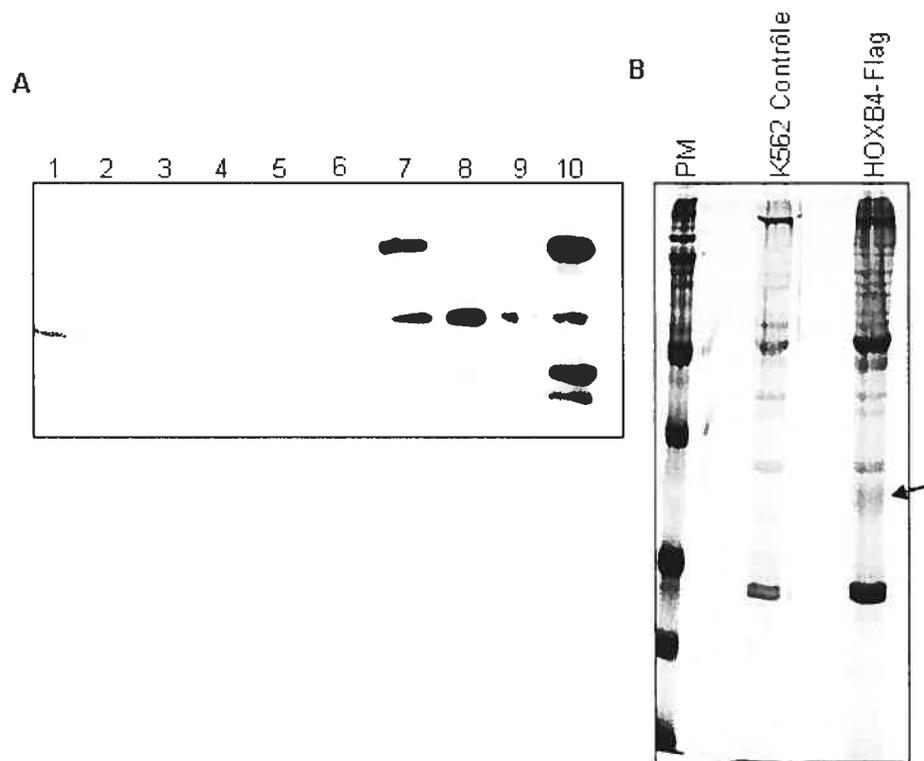


Figure 3.12 Validation de la stratégie de purification par immunoprécipitation.

(A) Analyse par western blot des fractions récupérées à différentes phases de la purification fait à partir d'une lignée de cellules hématopoïétiques (K562) modifiées de façon à exprimer la protéine de fusion HOXB4-Flag (1. 1/150 du lysat avant immunoprécipitation, 2. 1/150 du lysat après immunoprécipitation, 3. 1/10 du 1er lavage, 4. 1/10 du 2e lavage, 5. 1/10 du 3e lavage, 6. 1/10 du 4e lavage, 7. 1/20 des billes avant élution, 8. 1/13 de la première élution, 9. 1/13 de la deuxième élution, 10. 1/20 des billes après élution). (B) Profil de coloration au nitrate d'argent représentant 85% de l'élution finale.

Enfin, il est a remarqué que l'on perçoit une certaine quantité d'HOXB4-Flag dans la fraction contenant les billes après élution (Figure 3.12A, ligne 10) suggérant que la quantité de protéine immunoprécipitée n'est pas récupérée en entier lors des

étapes d'élution. Deux phénomènes sont susceptibles d'expliquer ce problème. Premièrement, il se peut que cette quantité d'HOXB4 soit toujours liée aux billes signifiant que la quantité de peptide Flag utilisée n'est pas suffisante pour tout éluer. Deuxièmement, il se peut que cette quantité d'HOXB4 soit détachée des billes, mais que ces dernières ne soient pas bien drainées lors de la récupération du surnageant. Enfin, en regardant la complexité de l'élution sur un gel de séparation coloré au nitrate d'argent (Figure 3.12B), on observe que la protéine HOXB4-Flag est bien visible contrairement aux purifications effectuées par affinité en tandem présentées précédemment. La bande correspondant à HOXB4-Flag a été découpée et analysée par spectrométrie de masse afin de confirmer qu'il s'agit bien d'HOXB4 ce qui c'est avéré être le cas (résultat non présenté). Néanmoins, il existe une quantité substantielle de bruit de fond dans les deux conditions correspondant entre autre aux chaînes lourdes de l'anticorps. Il est donc probable qu'une quantité de billes d'agarose couplées à l'anticorps se retrouve dans l'élution. Une méthode permettant de bien drainer les billes sans toutefois les récolter doit donc être optimisée.

Chapitre 4

Discussion et conclusion

Discussion

Afin de faciliter une éventuelle recherche des gènes cibles d'*HOXB4*, j'avais comme premier objectif de produire une forme activatrice et répressive d'*HOXB4* et d'évaluer si leur expression dans des cellules de moelle osseuse permettait d'observer une potentialisation de l'effet d'*HOXB4* sur les CSHs. Dans les différents essais réalisés, la protéine EN-*HOXB4* se comporte comme un simple contrôle GFP indiquant que le domaine de répression d'*Engrailed* est nuisible à l'activité d'*HOXB4*. Toutefois, il est difficile de dire si c'est l'activité même de répression de la transcription ou la taille imposante du domaine de répression qui nuit à l'activité de la protéine. Enfin, lors des essais effectués on a aussi noté que l'expression de la forme VP16-*HOXB4* n'entraîne pas un super phénotype, mais produit un phénotype intermédiaire. Conséquemment, l'utilisation de la protéine de fusion VP16-*HOXB4* ne faciliterait pas une future analyse d'expression.

Par ailleurs, il a été observé que les cellules de moelle osseuse modifiées de façon à surexprimer VP16-*HOXB4* expriment aussi fortement *HOXB4*. Deux hypothèses sont susceptibles d'expliquer ce phénomène. Premièrement, il se peut que la protéine *HOXB4* présente dans les cellules de moelle exprimant VP16-*HOXB4* provienne de la construction même et ne serait donc pas d'origine endogène. En effet, l'atg d'*HOXB4* est toujours présent dans la construction et la protéine sauvage est peut-être produite. Notamment, une certaine quantité d'*HOXB4*-Flag dans les cellules 293T exprimant EN-*HOXB4*-Flag et VP16-*HOXB4*-Flag est observée. Cette expression surprenante dans les cellules de moelle osseuse pourrait survenir au moment de la transcription qui produirait deux ARNm, un premier codant pour *VP16-HOXB4-IRES-GFP* et un second codant pour *HOXB4-IRES-GFP*. Enfin, ce problème peut aussi survenir au moment où le ribosome initie la traduction. Ce dernier est susceptible d'initier la synthèse protéique à tous les

atg présents sur un même ARNm si le contexte approprié nécessaire à l'initiation de la traduction est présent¹²⁰. Ainsi, le ribosome pourrait initier la traduction à l'atg de *VP16* et à l'atg d'*HOXB4* provenant du même ARNm produisant ainsi les deux protéines. Idéalement, il serait recommandé d'enlever cet atg de la construction afin de tester cette hypothèse. Enfin, il est aussi possible que seulement la protéine de fusion soit produite et qu'il y ait protéolyse entre les domaines de *VP16* et d'*HOXB4*. Afin de prévenir cette situation problématique, un segment peptidique avait été conservé afin d'éviter que le domaine de *VP16* nuise à la fonction d'*HOXB4*. Néanmoins, il pourrait être avantageux de repositionner le domaine *VP16* en C-terminal de la protéine de fusion et de tester l'effet de cette nouvelle protéine sur les cellules de moelle osseuse. Un domaine peptidique avait aussi été conservé entre le domaine de répression d'*Engrailed* et *HOXB4* afin de minimiser encore une fois les risques d'interférence avec la fonction de la protéine *HOXB4*. Il pourrait donc aussi être avantageux de repositionner le domaine de répression d'*Engrailed* en C-terminal de la protéine de fusion.

Toutefois, une seconde hypothèse permettrait aussi d'expliquer que les cellules de moelle osseuse exprimant *VP16-HOXB4* expriment aussi *HOXB4*. En effet, il se peut que la quantité d'*HOXB4* présente dans ces cellules soit en fait la forme endogène. La présence de cette forme endogène serait expliquée par une boucle d'autorégulation conservée au cours de l'évolution¹²¹. En effet, un circuit d'autorégulation du gène orthologue d'*HOXB4*, *Deformed*, a été bien défini chez la drosophile¹²². Par conséquent, la présence de *VP16-HOXB4* permettrait de réguler positivement le gène cible *Hoxb4*. L'ajout d'un épitope Flag en C-terminal de la protéine de fusion *VP16-HOXB4* permettrait de discriminer s'il s'agit de l'endogène ou d'une expression aberrante provenant de la construction.

Enfin, les niveaux d'expression de la forme *VP16-HOXB4* sont très faibles comparativement à la forme *HOXB4* dans les cellules de moelle modifiées de

façon à surexprimer HOXB4. La protéine VP16-HOXB4 est à peine détectée au jour 20 de l'essai de compétition *in vitro* bien que ces cellules soient infectées à 80%. Des études précédentes réalisées dans le laboratoire suggèrent que les niveaux de protéine HOXB4 disponibles sont critiques et influencent la magnitude de l'effet d'expansion sur les cellules souches hématopoïétiques⁶⁰. Ainsi, la faible disponibilité de VP16-HOXB4 dans les cellules de moelle osseuse pourrait expliquer le phénotype tempéré de ces cellules. Toutefois, les niveaux élevés d'HOXB4 dans ces mêmes cellules sont en contradiction avec cette hypothèse. Par ailleurs, d'autres résultats obtenus dans notre laboratoire (données non publiées) indiqueraient que bien qu'un certain seuil d'expression doit être atteint pour qu'HOXB4 puisse induire une expansion des CSHs, des niveaux trop élevés de cette protéine ne sont pas tolérés et seraient même toxiques. Il y aurait donc un mécanisme de sélection favorisant les cellules exprimant de faibles niveaux d'HOXB4. Les profils de FACS réalisés au jour 16 de l'essai de compétition *in vitro* indiquent que les cellules de moelle osseuse exprimant VP16-HOXB4 sont en fait divisées en trois populations dont une exprime des faibles niveaux du gène rapporteur GFP et l'autre des hauts niveaux. Le processus de sélection pour les cellules exprimant de faibles niveaux d'HOXB4 est peut être en cours dans cette population afin éventuellement de perdre les cellules exprimant de hauts niveaux. Il pourrait donc être intéressant de trier ces populations et de les comparer entre elles et avec la population exprimant HOXB4 sauvage dans des essais *in vitro* afin de mieux comprendre l'effet des niveaux d'expression de VP16-HOXB4.

Bien que fort intéressants, ces différents aspects concernant la protéine de fusion VP16-HOXB4 n'ont pas été approfondis étant donné que le but initial, soit de potentialiser l'effet d'HOXB4, n'était pas atteint. Cette protéine de fusion représentait donc moins d'intérêt. Néanmoins, ces résultats mettent en relief la complexité de la régulation de la transcription par les gènes *Hox* et de la difficulté d'identifier leurs cibles directes. La poursuite des gènes cibles demeure donc un

enjeu bien actuel et tous ces résultats rehaussent l'importance de bien choisir le modèle d'étude puisque le contexte cellulaire semble influencer le rôle d'HOXB4 au niveau de la transcription.

La deuxième approche permettant de percer les mécanismes moléculaires régissant l'effet d'HOXB4 sur les CSHs est d'identifier ses partenaires protéiques. Les deux stratégies, soit la purification par affinité en tandem et la purification par immunoprécipitation, ont permis de récupérer la protéine HOXB4 dans les éluions respectives. Les avantages de la purification par affinité en tandem sont sans aucun doute ses deux étapes de purification servant à éliminer une plus grande quantité de liaison non spécifique et son fonctionnement en conditions natives. Toutefois, les conditions utilisées jusqu'à présents ne permettent pas encore de tirer profit de ces avantages. Comme il a été mentionné, cette stratégie de purification permet de récupérer HOXB4 tel que confirmé par analyse par western blot. De plus, on observe lors de ces analyses par western blot une quantité substantielle de protéines HOXB4 dans l'éluion et peut-être même une quantité possédant des modifications post-traductionnelles ce qui est suggéré par le poids moléculaire plus élevé de ces formes (Figure 3.11A, ligne 14). Il est à noter que de récentes études réalisées dans le laboratoire suggèrent qu'HOXB4 serait ubiquitiné (résultats non publiés). Ainsi, une hypothèse serait que les formes de poids moléculaire plus élevé sont en fait HOXB4 ubiquitiné. Il serait donc tentant de valider cette hypothèse ainsi que de regarder pour d'autres modifications post-traductionnelles par spectrométrie de masse advenant la purification en quantité suffisante de la protéine HOXB4.

En effet, la quantité de protéine récoltée est pour le moment insuffisante. Une étape à laquelle il y a beaucoup de perte de protéine étiquetée est l'éluion des billes d'IgG après le clivage avec la TEV protéase. Il se peut que ce problème soit dû à un mauvais drainage des billes tel qu'il a été mentionné précédemment.

Toutefois, il est aussi possible que des interactions hydrophobes non spécifiques soient aussi responsables de la rétention de la protéine dans la colonne. Si tel est le cas, il est possible d'ajouter un détergent non-ionique dans le tampon d'élution pour prévenir ce problème. De plus, il est aussi possible d'éluer les billes d'IgG sans avoir recours à la TEV protéase en utilisant plutôt un peptide dérivé de la protéine A ¹²³ qui entrerait en compétition avec le complexe protéique. Ainsi, la purification par affinité en tandem permet de récupérer pour le moment des niveaux d'HOXB4-TAP détectables par analyse par western blot, mais le rendement final de ces purifications doit encore être optimisé.

Enfin, bien que ces résultats soient encourageants les conditions utilisées jusqu'à présent conservent encore beaucoup de bruit de fond dans la purification contrôle ainsi que dans la purification HOXB4-TAP ce qui rend impossible l'identification de la bande correspondant à HOXB4-TAP sur les gels de séparation colorés au nitrate d'argent. Une des composantes majeures de ce bruit de fond s'avère être l'actine. Ces résultats indiquent qu'il faudrait refaire des purifications pour optimiser les étapes de liaisons aux deux colonnes (IgG et calmoduline) afin de réduire le bruit de fond. Par conséquent, il faudrait tester le temps de liaison aux colonnes respectives et augmenter les lavages sans toutefois trop laver pour perdre le matériel lié ou allouer un temps trop court de liaison ce qui ferait diminuer la quantité de matériel lié.

Finalement, il est aussi possible que ce tag TAP ne corresponde pas à notre protéine d'intérêt et que les résultats obtenus soient en fait optimaux pour une purification avec ce tag. La purification par affinité en tandem est un terme générique qui peut-être adapté. En effet, deux tags différents peuvent être utilisés pour reproduire le même genre de stratégie permettant de combiner deux étapes de purification afin de limiter les liaisons non spécifiques. De nombreux tags sont disponibles, notons par exemple un tag His, ou un S-tag. Le nombre de

combinaison est presque infini. L'utilisation du tag Flag en combinaison avec un deuxième tag pourrait être une stratégie intéressante d'autant plus que ces tags sont beaucoup plus petits et qu'ils risquent de moins interférer avec la fonction d'HOXB4 comparativement au tag TAP qui est imposant en taille.

En effet, les résultats obtenus lors de la purification par immunoprécipitation à l'aide du tag Flag sont encourageants. Tout comme la purification par affinité en tandem, on récupère HOXB4-Flag dans l'élution. Avec cette stratégie, on est toutefois en mesure de visualiser HOXB4-Flag sur un gel de séparation coloré à l'argent. Le bruit de fond demeure un problème, mais celui-ci provient surtout des chaînes lourdes de l'anticorps couplés aux billes. Des méthodes devront être envisagées afin de bien drainer les billes sans toutefois les récupérer. Ainsi, le tag Flag semble être une bonne piste pour la construction d'une nouvelle stratégie de purification en deux étapes.

Jusqu'à présent, nous avons examiné des scénarios où la plupart des obstacles provenaient seulement des stratégies de purification. Toutefois, il se peut aussi que les problèmes soient inhérents aux modèles cellulaires utilisés. Bien qu'une surexpression de la protéine HOXB4-TAP confère un avantage prolifératif aux cellules de moelle osseuse, cet avantage prolifératif n'est pas conservé dans les lignées cellulaires utilisées. De plus, il se peut qu'une forte expression de la protéine HOXB4 soit même toxique pour ces cellules. Ces dernières seraient naturellement sélectionnées en fonction de leur niveau d'expression d'HOXB4-TAP. Une sélection favorisant les cellules exprimant de faibles niveaux d'HOXB4-TAP pourrait expliquer les difficultés éprouvées à récupérer de grande quantité de cette protéine à la fin des purifications. Les lignées cellulaires utilisées pour la purification par affinité en tandem soient les 293T et les BaF/3 ont fréquemment été évaluées par cytométrie en flux afin d'évaluer le pourcentage de la population exprimant le marqueur GFP. Toutefois, ce gène rapporteur est sous le contrôle

d'un promoteur PGK qui est indépendant du promoteur régulant l'expression de la protéine HOXB4-TAP. Ainsi, l'évaluation du pourcentage d'infection à l'aide du marqueur GFP n'est pas une indication de l'expression de la protéine HOXB4-TAP. Il serait avantageux d'utiliser des anticorps contre l'épitope TAP afin de tester directement les niveaux d'expression d'HOXB4-TAP dans notre population par cytométrie en flux.

Par ailleurs, les cellules utilisées pour la purification par immunoprécipitation soient les K562, expriment le marqueur GFP sous le contrôle d'un IRES. Ainsi, le marqueur GFP est sous le même contrôle que la protéine HOXB4-FLAG. Par conséquent, les niveaux d'expression de la protéine GFP correspondent directement aux niveaux d'expression de la protéine HOXB4-FLAG. La proportion de la population en culture exprimant notre protéine étiquetée était donc facilement évaluable par cytométrie en flux et cette analyse a été réalisée à plusieurs reprises. Néanmoins, bien que près de la totalité de la population expriment la protéine GFP, l'intensité d'expression reste faible suggérant encore une fois une sélection pour des cellules exprimant de faibles niveaux de la protéine HOXB4.

Enfin, les différentes lignées cellulaires utilisées possèdent des avantages et des inconvénients qui leur sont propres. Les cellules 293T sont en fait dérivées de fibroblastes de reins humains embryonnaires. Ces cellules expriment de faibles niveaux de la protéine HOXB4 endogène comparativement à la forme surexprimée. Bien que ces cellules ne soient pas d'origine hématopoïétique, elles ont été initialement choisies quant à leur capacité à surexprimer facilement la protéine HOXB4 et à la possibilité d'obtenir un grand nombre de cellules pour les purifications. D'un autre côté, les cellules BaF/3 sont une lignée de cellules pré-B hématopoïétiques d'origine murine. Ces cellules n'expriment pas la forme endogène de la protéine HOXB4. Ce modèle cellulaire avait été choisi en fonction de la possibilité d'obtenir une grande quantité de cellules. De plus, elles croissent

en suspension ce qui facilite l'expansion comparativement aux cellules 293T qui sont adhérentes. Enfin, les cellules K562 sont une lignée de cellules hématopoïétiques leucémiques humaines. Il est aussi possible d'obtenir un grand nombre de ces cellules en suspension. Comparativement aux BaF/3, elles expriment de faibles niveaux endogènes de la protéine HOXB4.

Ainsi, chacun des modèles cellulaires utilisés possède des avantages et des inconvénients. La présence de la forme HOXB4 endogène dans deux des trois types cellulaires peut entrer en compétition avec la forme étiquetée pour les partenaires d'HOXB4. D'un autre côté, l'absence d'expression de la protéine endogène peut être indicatif d'une absence d'expression des partenaires d'intérêt. Enfin, une surexpression de la protéine HOXB4 dans ces cellules ne confère aucun avantage prolifératif comparativement aux cellules de moelle osseuse. Comme il a été mentionné préalablement, l'utilisation de ces lignées cellulaires avait comme premier objectif de mettre au point les techniques de purification. Étant donné que l'expression d'HOXB4 dans ces cellules semble problématique à long terme, il pourrait être avantageux d'exprimer HOXB4 de façon transitoire dans une lignée cellulaire en utilisant des systèmes comme la lipofectamine ou le calcium phosphate plutôt que d'emprunter une approche rétrovirale. Une approche transitoire permettrait d'obtenir une grande surexpression de notre protéine étiquetée et par le fait même d'utiliser une plus faible quantité de cellules. Ainsi, on ne permettrait pas aux cellules d'exercer une sélection envers une population exprimant de faible niveau à long terme. Néanmoins, l'utilisation des cellules de moelle reste le meilleur modèle d'étude puisqu'HOXB4 exerce son effet spécifiquement dans ces cellules et que les partenaires recherchés participent au processus d'auto-renouvellement des CSHs.

Enfin, les obstacles rencontrés lors des purifications peuvent aussi provenir des propriétés même de notre protéine d'intérêt. Par exemple, la demi-vie d'HOXB4 est

d'une heure trente⁶⁰ et certaines précautions lors de la lyse des cellules doivent être considérées pour éviter que la protéine soit dégradée lors de la purification. Aussi, si l'on veut s'intéresser tel que mentionné précédemment aux modifications post-traductionnelles d'HOXB4, une synchronisation des cellules lors de la purification pourrait faciliter cette analyse. En effet, il est fort probable que ces événements soient ponctuels dans la cellule et qu'ils surviennent à une période précise du cycle cellulaire.

Conclusion

L'auto-renouvellement des cellules souches est un phénomène complexe perçu comme étant la fontaine de jouvence de l'organisme. Notre laboratoire a identifié un régulateur important de ce processus dont les possibilités d'applications cliniques futures sont bien réelles. Toutefois, les bases moléculaires de l'action d'HOXB4 sur les cellules souches hématopoïétiques demeurent obscures et beaucoup d'espoir sont placés dans la découverte des gènes cibles et des partenaires protéiques afin de mieux saisir son fonctionnement.

Les études réalisées à l'aide des protéines de fusion VP16-HOXB4 et EN-HOXB4 non pas permises de développer de nouvelles formes d'HOXB4 dans l'optique de faciliter de futures analyses afin d'identifier les gènes cibles. Néanmoins, ces travaux ont certainement mis en relief la complexité de la régulation de l'effet d'HOXB4 sur les CSHs.

Enfin, les études réalisées afin d'identifier les partenaires protéiques d'HOXB4 ont permis d'évaluer les différentes étapes des purifications qui requéraient une optimisation dans le futur. Plus particulièrement, les niveaux d'expression de la protéine HOXB4 devront être surveillés. Aussi, une approche de purification par affinité en tandem utilisant l'épitope Flag combiné avec un autre tag serait une avenue intéressante puisque ce tag est plus petit et que le rendement obtenu avec le tag Flag est supérieur. Finalement, la purification des partenaires protéiques à partir de lysats protéiques de cellules de moelle osseuse demeure le modèle idéal puisque seules ces cellules répondent à une surexpression d'HOXB4. Enfin, ces cellules sont aussi les plus adéquates pour identifier les partenaires d'intérêts impliquer dans l'auto-renouvellement des CSHs.

Bibliographie

1. Cantor, A. B. & Orkin, S. H. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 11, 513-9 (2001).
2. Palis, J. & Yoder, M. C. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 29, 927-36 (2001).
3. Godin, I. E., Garcia-Porrero, J. A., Coutinho, A., Dieterlen-Lievre, F. & Marcos, M. A. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364, 67-70 (1993).
4. Medvinsky, A. & Dzierzak, E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906 (1996).
5. Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Muller, A. M. & Dzierzak, E. A. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-7 (1993).
6. Godin, I., Garcia-Porrero, J. A., Dieterlen-Lievre, F. & Cumano, A. Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J Exp Med* 190, 43-52 (1999).
7. Orkin, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1, 57-64 (2000).
8. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-11 (2001).
9. Orlic, D. & Bodine, D. M. What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood* 84, 3991-4 (1994).
10. Becker, A. J., Mc, C. E. & Till, J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-4 (1963).
11. Siminovitch, L., McCulloch, E. A. & Till, J. E. The Distribution Of Colony-Forming Cells Among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* 62, 327-36 (1963).
12. 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, 1209-15 (1968).

13. Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L. & McCulloch, E. A. Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J Exp Med* 127, 455-64 (1968).
14. Worton, R. G., McCulloch, E. A. & Till, J. E. Physical separation of hemopoietic stem cells differing in their capacity for self-renewal. *J Exp Med* 130, 91-103 (1969).
15. Jones, R. J., Celano, P., Sharkis, S. J. & Sensenbrenner, L. L. Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood* 73, 397-401 (1989).
16. Uchida, N. & Weissman, I. L. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* 175, 175-84 (1992).
17. Weissman, I. L. The road ended up at stem cells. *Immunol Rev* 185, 159-74 (2002).
18. Kiel, M. J. et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-21 (2005).
19. Coulombel, L. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23, 7210-22 (2004).
20. Szilvassy, S. J. & Cory, S. Phenotypic and functional characterization of competitive long-term repopulating hematopoietic stem cells enriched from 5-fluorouracil-treated murine marrow. *Blood* 81, 2310-20 (1993).
21. Sorrentino, B. P. Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 4, 878-88 (2004).
22. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Jr., Cannon, J. H., Sahler, O. D. & Ferrebee, J. W. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 38, 1709-16 (1959).

23. Miller, D. G., Adam, M. A. & Miller, A. D. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 10, 4239-42 (1990).
24. Sauvageau, G., Iscove, N. N. & Humphries, R. K. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 23, 7223-32 (2004).
25. Miller, C. L. & Eaves, C. J. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13648-53 (1997).
26. McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A. & Gehring, W. J. A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* 308, 428-33 (1984).
27. Duboule, D. & Dolle, P. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *Embo J* 8, 1497-505 (1989).
28. Bateson. Materials for the study of variation treated with especial regard to discontinuity in the origin of species (In: Co. Ma, ed. London, 1894).
29. Garber, R. L., Kuroiwa, A. & Gehring, W. J. Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in *Drosophila*. *Embo J* 2, 2027-36 (1983).
30. Krumlauf, R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201 (1994).
31. Sauvageau, G. e. H. K. Expression et fonction des gènes Hox dans l'hématopoïèse normale et leucémique. *Hématologie* 3, 123-131(1997).
32. Kongsuwan, K., Webb, E., Housiaux, P. & Adams, J. M. Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian haemopoietic lineages. *Embo J* 7, 2131-8 (1988).
33. Giampaolo, A. et al. HOXB gene expression and function in differentiating purified hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 13 Suppl 1, 90-105 (1995).

34. Giampaolo, A. et al. Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 84, 3637-47 (1994).
35. 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. *Exp Hematol* 30, 49-57 (2002).
36. Sauvageau, G. et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12223-7 (1994).
37. Abramovich, C. & Humphries, R. K. Hox regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* 12, 210-6 (2005).
38. Wu, J. et al. Selective inhibition of normal murine myelopoiesis "in vitro" by a Hox 2.3 antisense oligodeoxynucleotide. *Cell Mol Biol* 38, 367-76 (1992).
39. Takeshita, K. et al. A homeobox gene of the Antennapedia class is required for human adult erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3535-8 (1993).
40. 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, 1922-30 (1997).
41. 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, 383-93 (1998).
42. So, C. W., Karsunky, H., Wong, P., Weissman, I. L. & Cleary, M. L. Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by MLL-GAS7 in the absence of Hoxa7 or Hoxa9. *Blood* 103, 3192-9 (2004).
43. Kappen, C. Disruption of the homeobox gene Hoxb-6 in mice results in increased numbers of early erythrocyte progenitors. *Am J Hematol* 65, 111-8 (2000).

44. Brun, A. C. et al. Hoxb4-deficient mice undergo normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* 103, 4126-33 (2004).
45. Perkins, A. C. & Cory, S. Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *Embo J* 12, 3835-46 (1993).
46. Sauvageau, G. et al. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 9, 1753-65 (1995).
47. Thorsteinsdottir, U. et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol* 17, 495-505 (1997).
48. Kroon, E. et al. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *Embo J* 17, 3714-25 (1998).
49. Sauvageau, G. et al. Overexpression of HOXB3 in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* 6, 13-22 (1997).
50. Thorsteinsdottir, U. et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 99, 121-9 (2002).
51. Harrison, D. E. & Astle, C. M. Loss of stem cell repopulating ability upon transplantation. Effects of donor age, cell number, and transplantation procedure. *J Exp Med* 156, 1767-79 (1982).
52. Harrison, D. E., Stone, M. & Astle, C. M. Effects of transplantation on the primitive immunohematopoietic stem cell. *J Exp Med* 172, 431-7 (1990).

53. Pawliuk, R., Eaves, C. & Humphries, R. K. Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* 88, 2852-8 (1996).
54. Iscove, N. N. & Nawa, K. Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. *Curr Biol* 7, 805-8 (1997).
55. Chabot, B., Stephenson, D. A., Chapman, V. M., Besmer, P. & Bernstein, A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335, 88-9 (1988).
56. 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, 2605-12 (1999).
57. Antonchuk, J., Sauvageau, G. & Humphries, R. K. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol* 29, 1125-34 (2001).
58. 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, 587-97 (1999).
59. Krosl, J. et al. Cellular proliferation and transformation induced by HOXB4 and HOXB3 proteins involves cooperation with PBX1. *Oncogene* 16, 3403-12 (1998).
60. Beslu, N. et al. Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood* 104, 2307-14 (2004).
61. 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. *Mol Cell Biol* 16, 1734-45 (1996).

62. Knoepfler, P. S., Lu, Q. & Kamps, M. P. Pbx-1 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 Res* 24, 2288-94 (1996).
63. Shen, W. F. et al. Hox homeodomain proteins exhibit selective complex stabilities with Pbx and DNA. *Nucleic Acids Res* 24, 898-906 (1996).
64. Chang, C. P., de Vivo, I. & Cleary, M. L. The Hox cooperativity motif of the chimeric oncoprotein E2a-Pbx1 is necessary and sufficient for oncogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 81-8 (1997).
65. Krosi, J., Beslu, N., Mayotte, N., Humphries, R. K. & Sauvageau, G. The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity* 18, 561-71 (2003).
66. Antonchuk, J., Sauvageau, G. & Humphries, R. K. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 109, 39-45 (2002).
67. Krosi, J. et al. In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* 9, 1428-32 (2003).
68. Nagahara, H. et al. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* 4, 1449-52 (1998).
69. Amsellem, S. et al. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* 9, 1423-7 (2003).
70. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269, 10444-50 (1994).
71. Buske, C. et al. Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells. *Blood* 100, 862-8 (2002).

72. Schiedlmeier, B. et al. High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. *Blood* 101, 1759-68 (2003).
73. Pearson, J. C., Lemons, D. & McGinnis, W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* 6, 893-904 (2005).
74. Pradel, J. & White, R. A. From selectors to realizators. *Int J Dev Biol* 42, 417-21 (1998).
75. Bromleigh, V. C. & Freedman, L. P. p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. *Genes Dev* 14, 2581-6 (2000).
76. Popperl, H. et al. Segmental expression of Hoxb-1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon exd/pbx. *Cell* 81, 1031-42 (1995).
77. Maconochie, M. K. et al. Cross-regulation in the mouse HoxB complex: the expression of Hoxb2 in rhombomere 4 is regulated by Hoxb1. *Genes Dev* 11, 1885-95 (1997).
78. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-97 (2004).
79. Yekta, S., Shih, I. H. & Bartel, D. P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594-6 (2004).
80. Morsi El-Kadi, A. S., in der Reiden, P., Durston, A. & Morgan, R. The small GTPase Rap1 is an immediate downstream target for Hoxb4 transcriptional regulation. *Mech Dev* 113, 131-9 (2002).
81. Pan, Q. & Simpson, R. U. c-myc intron element-binding proteins are required for 1, 25-dihydroxyvitamin D3 regulation of c-myc during HL-60 cell differentiation and the involvement of HOXB4. *J Biol Chem* 274, 8437-44 (1999).

82. Pan, Q. & Simpson, R. U. Antisense knockout of HOXB4 blocks 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of c-myc expression. *J Endocrinol* 169, 153-9 (2001).
83. Wilson, A. et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* 18, 2747-63 (2004).
84. Morgan, R., Nalliah, A. & Morsi El-Kadi, A. S. FLASH, a component of the FAS-CAPSASE8 apoptotic pathway, is directly regulated by Hoxb4 in the notochord. *Dev Biol* 265, 105-12 (2004).
85. Theokli, C., Morsi El-Kadi, A. S. & Morgan, R. TALE class homeodomain gene *lrx5* is an immediate downstream target for Hoxb4 transcriptional regulation. *Dev Dyn* 227, 48-55 (2003).
86. Gomez-Skarmeta, J. L., Glavic, A., de la Calle-Mustienes, E., Modolell, J. & Mayor, R. Xiro, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *Embo J* 17, 181-90 (1998).
87. Bellefroid, E. J. et al. Xiro3 encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois genes and functions in neural specification. *Embo J* 17, 191-203 (1998).
88. Zhang, C. C., Steele, A. D., Lindquist, S. & Lodish, H. F. Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2184-9 (2006).
89. Dorsam, S. T. et al. The transcriptome of the leukemogenic homeoprotein HOXA9 in human hematopoietic cells. *Blood* 103, 1676-84 (2004).
90. Ghannam, G. et al. The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *J Biol Chem* 279, 866-75 (2004).
91. Ferrell, C. M. et al. Activation of stem-cell specific genes by HOXA9 and HOXA10 homeodomain proteins in CD34+ human cord blood cells. *Stem Cells* 23, 644-55 (2005).

92. Kirito, K., Fox, N. & Kaushansky, K. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood* 102, 3172-8 (2003).
93. Reya, T. et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-14 (2003).
94. Graba, Y., Aragnol, D. & Pradel, J. Drosophila Hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. *Bioessays* 19, 379-88 (1997).
95. Mann, R. S. & Affolter, M. Hox proteins meet more partners. *Curr Opin Genet Dev* 8, 423-9 (1998).
96. Shen, W. F. et al. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* 17, 6448-58 (1997).
97. Rieckhof, G. E., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M. & Mann, R. S. Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* 91, 171-83 (1997).
98. 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, 618-26 (2001).
99. Hisa, T. et al. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *Embo J* 23, 450-9 (2004).
100. Sharkey, M., Graba, Y. & Scott, M. P. Hox genes in evolution: protein surfaces and paralog groups. *Trends Genet* 13, 145-51 (1997).
101. Shen, W. F., Krishnan, K., Lawrence, H. J. & Largman, C. The HOX homeodomain proteins block CBP histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol* 21, 7509-22 (2001).
102. Rebel, V. I. et al. Distinct roles for CREB-binding protein and p300 in hematopoietic stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14789-94 (2002).

103. Kataoka, K., Yoshitomo-Nakagawa, K., Shioda, S. & Nishizawa, M. A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities. *J Biol Chem* 276, 819-26 (2001).
104. Hullinger, T. G., Pan, Q., Viswanathan, H. L. & Somerman, M. J. TGFbeta and BMP-2 activation of the OPN promoter: roles of smad- and hox-binding elements. *Exp Cell Res* 262, 69-74 (2001).
105. Prevot, D. et al. The leukemia-associated protein Btg1 and the p53-regulated protein Btg2 interact with the homeoprotein Hoxb9 and enhance its transcriptional activation. *J Biol Chem* 275, 147-53 (2000).
106. Luo, L., Yang, X., Takihara, Y., Knoetgen, H. & Kessel, M. The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions. *Nature* 427, 749-53 (2004).
107. Vijapurkar, U. et al. Protein kinase C-mediated phosphorylation of the leukemia-associated HOXA9 protein impairs its DNA binding ability and induces myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 24, 3827-37 (2004).
108. Eklund, E. A., Goldenberg, I., Lu, Y., Andrejic, J. & Kakar, R. SHP1 protein-tyrosine phosphatase regulates HoxA10 DNA binding and transcriptional repression activity in undifferentiated myeloid cells. *J Biol Chem* 277, 36878-88 (2002).
109. Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M. & McGinnis, W. The *Drosophila* Hox gene *deformed* sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell* 110, 457-66 (2002).
110. Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C. & McKnight, S. L. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev* 2, 718-29 (1988).
111. Smith, S. T. & Jaynes, J. B. A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, Nk1-, Nk2- and msh-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* 122, 3141-50 (1996).

112. Vickers, E. R. & Sharrocks, A. D. The use of inducible engrailed fusion proteins to study the cellular functions of eukaryotic transcription factors. *Methods* 26, 270-80 (2002).
113. Rigaut, G. et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-2 (1999).
114. Chang, C. P. et al. Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev* 9, 663-74 (1995).
115. Kroon, E., Thorsteinsdottir, U., Mayotte, N., Nakamura, T. & Sauvageau, G. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *Embo J* 20, 350-61 (2001).
116. Harrison, D. E. & Lerner, C. P. Most primitive hematopoietic stem cells are stimulated to cycle rapidly after treatment with 5-fluorouracil. *Blood* 78, 1237-40 (1991).
117. Thorsteinsdottir, U. et al. The oncoprotein E2A-Pbx1a collaborates with Hoxa9 to acutely transform primary bone marrow cells. *Mol Cell Biol* 19, 6355-66 (1999).
118. Jeronimo, C. et al. RPAP1, a novel human RNA polymerase II-associated protein affinity purified with recombinant wild-type and mutated polymerase subunits. *Mol Cell Biol* 24, 7043-58 (2004).
119. Forler, D. et al. An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat Biotechnol* 21, 89-92 (2003).
120. Kozak, M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 15, 1109-23 (1978).
121. Li, X., Murre, C. & McGinnis, W. Activity regulation of a Hox protein and a role for the homeodomain in inhibiting transcriptional activation. *Embo J* 18, 198-211 (1999).

122. Kuziora, M. A. & McGinnis, W. Autoregulation of a *Drosophila* homeotic selector gene. *Cell* 55, 477-85 (1988).
123. Strambio-de-Castillia, C. et al. A method for the rapid and efficient elution of native affinity-purified protein A tagged complexes. *Journal of Proteome Research* 4, 2250-2256 (2005).

